

HLA-typekits

Gebruiksaanwijzing

PCR-versterking en sequencing van HLA-klasse I- en II-loci

Versienummer: 1.4

Publicatiedatum: 27 mei 2020

IVD



CareDx Pty
20 Collie St.
Fremantle 6160
Western Australia
Australië



Qarad bvba
Cipalstraat 3
B-2440 Geel
België

Inhoud

PRINCIPE	3
BEOOGD GEBRUIK	3
KIT-SAMENSTELLING	4
OPSLAGVOORSCHRIFTEN	9
MATERIALEN, REAGENTIA EN NIET-GELEVERDE APPARATUUR	10
VEREISTEN VOOR HET MONSTER	11
WAARSCHUWINGEN EN VEILIGHEIDSMATREGELEN	12
SYMBOLEN	12
PROCEDURE	13
1. PCR	13
2. ELEKTROFORESE MET AGAROSE-GEL	13
3. ZUIVERING VAN PCR-PRODUCTEN	14
4. SEQUENCING-REACTIE	15
5. ZUIVERING VAN SEQUENCING-REACTIEPRODUCTEN	16
6. DENATURATIE EN ELEKTROFORESE VAN REACTIEPRODUCTEN	17
7. BEWERKING EN ANALYSE VAN ELEKTROFEROGRAMMEN	18
PRESTATIEKENMERKEN	20
NAUWKEURIGHEID	20
DETECTIEGRENSEN	21
SPECIFICITEIT	21
STORENDE STOFFEN	21
BEPERKINGEN EN WAARSCHUWINGEN	22
LICENTIE	23
BIBLIOGRAFIE	24
PROBLEMEN OPLOSSEN	25
AANVERWANTE PRODUCTEN	27
OLERUP SBT™ HARP®S	27
CONTACTGEGEVENS	28














Principe








De hier beschreven HLA Sequencing Based Typing (SBT) procedure werd oorspronkelijk ontwikkeld door D. Sayer in 2001¹ en ontwikkeld tot een singletubetest in 2004². De procedure omvat de initiële versterking van de doelsequentie, gevolgd door een enzymatische behandeling om niet-geïncorporeerde primers en dNTP's te verwijderen. Het amplicon wordt vervolgens gebruikt als een sjabloon voor directe geautomatiseerde fluorescerende DNA-sequencing met behulp van speciale sequencingprimers en de Big Dye[®] Terminator-sequencing-chemie die verkrijgbaar is bij Applied Biosystems[™] van Life Technologies[™]. De versterkingsproducten worden gezuiverd volgens de ethanolprecipitatie-methode en gedatureerd met behulp van Hi-Di[™]-formamide, verkrijgbaar bij Applied Biosystems[™] van Life Technologies[™], vóór scheiding en detectie met een geautomatiseerde fluorescerende DNA-sequencer. Het wordt aanbevolen om de resulterende gegevens vervolgens te analyseren met ASSIGN[™] SBT-sequentieanalyse software van CareDx Pty Ltd³⁻⁵.


Beoogd gebruik


De OLERUP SBT[™] HLA SBT-kits van CareDx Pty Ltd worden gebruikt voor het typeren van HLA klasse I (HLA-A, -B, en -C) en klasse II (HLA-DRB1, -DQB1 en -DPB1) -genen in een laboratoriumomgeving uit genomisch DNA. Elke kit bevat reagentia die de PCR-amplificatie en DNA-sequentie van een bepaald gen vergemakkelijken. De resulterende sequentiegegevens worden vervolgens geïnterpreteerd met behulp van de ASSIGN[™] SBT-software van CareDx Pty Ltd. Opgemerkt moet worden dat deze SBT-kits niet worden gebruikt voor de diagnose van ziekte, maar kunnen worden gebruikt als onderdeel van het proces bij het bepalen van de compatibiliteit tussen donoren en ontvangers. De test is een DNA-sequentietest die een DNA-sequentie van een deel van een HLA-gen produceert. De beoogde gebruikers van het hulpmiddel zijn adequaat gekwalificeerde personen die kennis hebben van de frequentie van HLA-typen in hun populatie. De tests moeten worden uitgevoerd in laboratoria die onder controle staan.


Kit-samenstelling

Kit	Catalogusnummer		Pre-PCR-inhoud [†] (aantal flacons)	Post-PCR-inhoud (aantal flacons)		
Klasse I						
HLA-A	XH-PD1.1-2 (20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A-</div>	1 x 25  1 x 352 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1R</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2R</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3R</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4R</div> </div> </div>	1 x 44  elk
	XH-PD1.1-2 (50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A-</div>	1 x 60  1 x 880 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX1R</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX2R</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX3R</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AEX4R</div> </div> </div>	1 x 110  elk
HLA-B	BS-PD2.1-2 (20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B-</div>	1 x 25  1 x 352 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2F</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3F</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX4F</div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div> </div>	1 x 44  elk
	BS-PD2.1-2 (50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B-</div>	1 x 60  1 x 880 	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2F</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3F</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">BEX4F</div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div> </div>	1 x 110  elk

Kit	Catalogusnummer		Pre-PCR-inhoud [†] (aantal flacons)		Post-PCR-inhoud (aantal flacons)	
HLA-C	HH-PD 3.2-2 (20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-C</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C-</div>	1 x 25  1 x 352 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 44  elk
	HH-PD 3.2-2 (50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-C</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C-</div>	1 x 60  1 x 880 	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 110  elk

Kit	Catalogusnummer		Pre-PCR-inhoud [†] (aantal flacons)	Post-PCR-inhoud (aantal flacons)
Klasse II				
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5 (20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> 1 x 10 μ l <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1-</div> 1 x 370 μ 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> 1 x 44 μ l elk <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>
	HH-PD5.2-5 (50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> 1 x 20 μ l <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1-</div> 1 x 920 μ 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> 1 x 110 μ l elk <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>
	LG-PD5.2-7 (20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> 1 x 10 μ l <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1-</div> 1 x 370 μ 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> 1 x 44 μ l elk <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>
	LG-PD5.2-7 (50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DRB1</div> 1 x 20 μ l <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DRB1-</div> 1 x 920 μ 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> 1 x 110 μ l elk <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>
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2 (20)	20 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DQB1</div> 1 x 10 μ l <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1-</div> 1 x 370 μ 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> 1 x 44 μ l elk <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>
	PQ-PD6.2-2 (50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DQB1</div> 1 x 20 μ l <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DQB1-</div> 1 x 920 μ 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> 1 x 110 μ l elk <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>

Kit	Catalogusnummer		Pre-PCR-inhoud [†] (aantal flacons)		Post-PCR-inhoud (aantal flacons)		
	AN-PD6.2-3 (20)	20 tests	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1-	1 x 10 ² l 1 x 370 ² l	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 44 ² l elk
	AN-PD6.2-3 (50)	50 tests	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1-	1 x 20 ² l 1 x 920 ² l	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 110 ² l elk
HLA-DPB1	HH-PD10.1 (20)	20 tests	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1-	1 x 10 ² l 1 x 370 ² l	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 44 ² l elk
	HH-PD10.1 (50)	50 tests	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1-	1 x 20 ² l 1 x 920 ² l	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 110 ² l elk
	KD-PD10.2-1 (20)	20 tests	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1-	1 x 10 ² l 1 x 370 ² l	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F PB-AG341-R	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	1 x 44 ² l elk

Kit	Catalogusnummer		Pre-PCR-inhoud [†] (aantal flacons)		Post-PCR-inhoud (aantal flacons)		
	KD-PD10.2-1 (50)	50 tests	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DPB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DPB1-</div>	1 x 20µl 1 x 920µl	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">PB-AG341-R</div>	1 x 110µl elk	

[†]De Pre-PCR-kit bevat een flacon met een locus-specifiek PCR-mengsel (b.v.

HLA-A-

) bestaande uit PCR-buffer, dNTP's, MgCl₂ en locus-specifieke PCR-primers, samen met een enkele flacon met DNA-polymerase (b.v.

DNA POL – HLA-

).

De post-PCR-kit bevat sequentie-primers (b.v.

AEX1F

).

Opslagvoorschriften

De PRE- en POST-PCR dozen kunnen worden gescheiden en opgeslagen in daarvoor bestemde PRE- en POST-PCR-vriestkasten. Bij opslag bij -20 °C (temperatuurbereik van -15 °C to -25 °C is aanvaardbaar) kunnen de onderdelen van de kit worden gebruikt tot de op de buitenste verpakking aangegeven vervaldatum en kunnen ze tot 25 vries-dooi cycli verdragen.

Versnelde stabiliteitstests voor de HLA-A-, -B-, -C-, -DRB1-, -DQB1- en -DPB1-kits gaven een houdbaarheid van twee en een half jaar aan vanaf de productiedatum wanneer ze bij -20 °C worden opgeslagen. Bevestigende real-timetesten zijn uitgevoerd. Niet gebruiken na de vervaldatum.

Om de optimale prestaties van de kit te behouden moeten de onderdelen van de kit voor gebruik worden opgehaald uit de -20 °C-opslaglocatie en snel worden ontdooid bij kamertemperatuur. De componenten van de kit, met uitzondering van de polymerase, moeten dan voorzichtig worden gewerveld om ervoor te zorgen dat de componenten van de diverse buizen na het ontdooien goed worden gemengd. Na gebruik moeten de kits/onderdelen onmiddellijk worden teruggebracht naar -20 °C.

Materialen, reagentia en niet-geleverde apparatuur

PCR

1. Steriel water
2. Elektronische of mechanische pipetten en aerosolbestendige tips
3. Thermische cycler met verwarmd deksel
Deze kits zijn gevalideerd met behulp van de volgende thermische cyclers:
MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, thermische cycler van Applied Biosystems™ van Life Technologies™, Veriti™, Gene Amp® PCR System 9700 en Eppendorf Mastercycler® Pro.
Het gebruik van andere thermische cyclers met deze kits vereist validatie door de gebruiker.
4. Dunwandige thermocycleeerreactiebuizen van 0,2 ml (8 bronstrips of 96 bronplaten). Gebruik de aanbevolen onderdelen voor gebruik met uw thermische cycler.
5. Steriele 1,5 ml-buizen
6. Steriel werkgebied, zoals biologische veiligheidskast of -kap.
7. Tafelcentrifuge met plaatadapters en genoeg capaciteit voor 2500 x g
8. Wervelaar

Elektroforese met agarose-gel

9. Apparaten voor de elektroforese van agarose-gel
10. 1% agarose (moleculaire biologische kwaliteit) TBE gel bevattende 0,1 µg/ml ethidium-bromide.
11. Laadbuffer
12. PCR-marker geschikt voor een bereik van 300 - 1300 bp
13. UV-transilluminator

Zuivering van PCR-producten

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT® cat nr. 78200 voor 100 reacties of Illustra™ ExoProStar™ Cat No US77702 voor 100 reacties)
15. 2 mM MgCl₂ (verkrijgbaar bij CareDx Pty Ltd, productcode MgCl2-1.0 (50) of MgCl2-1.0 (3000))
16. Schudbeker

Het gebruik van alternatieve PCR-zuiveringstechnieken vereist validatie door de gebruiker vóór gebruik.

Sequencing-reactie

17. BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 of v1.1, Applied Biosystems™ van Life Technologies™.

18. 5x sequencing-reactiebuffer (CareDx Pty Ltd, productcode SEQ BUF-2.0(400) of SEQ BUF-2.0(5000)) van BigDye® Terminator v3.1 of v1.1 5X Sequencing Buffer, Applied Biosystems™ van Life Technologies™.

Zuivering van sequencing-reactieproducten

19. 125 mM EDTA, pH 8,0 (verkrijgbaar bij CareDx Pty Ltd, productcode EDTA-3.0(200) of EDTA-3.0(5000)).
20. Absolute en 80% ethanol. Elke bewerking vereist vers bereide 80% ethanol bestaande uit absolute ethanol en steriel water. **GEBRUIK GEEN GEDENATUREERDE ETHANOL** (in sommige landen ook wel methylalcohol genoemd).

Het gebruik van alternatieve sequencing-reinigingstechnieken vereist validatie door de gebruiker voorafgaand aan het gebruik.

Denaturatie en elektroforese van sequencing-reactieproducten

21. Hi-Di™-formamide, Applied Biosystems™ van Life Technologies™, productcode 4311320
22. Geautomatiseerde DNA-sequencer en toebehoren (b.v. Applied Biosystems™ van Life Technologies™ ABI Prism® 3730), met inbegrip van gegevensverzameling en software.

Deze kits zijn getest en gevalideerd op de capillaire sequencers en software 3100, 3730 en 3730xl van Applied Biosystems™ van Life Technologies™.

Het gebruik van andere denaturatietechnieken en sequencing-platforms vereist validatie door de gebruiker voorafgaand aan het gebruik.

23. HLA Sequencing Analysis Software (b.v. ASSIGN™ SBT, versie 4.7 of hoger, CareDx Pty Ltd).

Vereisten voor het monster

1. Steriel water (negatief / geen sjablooncontrole)
2. Humaan genomisch DNA met een hoog molecuulgewicht (concentratiebereik van 20 - 100 ng/μL in tris-/EDTA-buffer en $OD_{260/280} > 1,8$), geëxtraheerd uit ACD- of EDTA-anticoagulerende volbloedmonsters. Gebruik geen volbloedmonsters die heparine bevatten.

De gebruikte DNA-isolatiemethode vereist validatie door de gebruiker vóór gebruik.


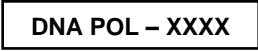




Waarschuwingen en Veiligheidsmaatregelen

- Deze kit moet worden gebruikt door opgeleid en bevoegd laboratoriumpersoneel.
- Alle monsters, apparatuur en reagentia moeten in overeenstemming met goede laboratoriumwerkwijzen worden gehanteerd. In het bijzonder dient alle patiëntmateriaal als potentieel besmettelijk te worden beschouwd. Het gebruik van handschoenen en laboratoriumjassen wordt sterk aanbevolen. Behandel en verwijder al het monstermateriaal volgens de lokale en nationale regelgeving.
- Er zijn GEEN gevaarlijke stoffen in een van de kitcomponenten.
- Gebruik GEEN reagentia na de vervaldatum.
- Het gebruik van kit-onderdelen uit verschillende kit-partijen wordt NIET aanbevolen. Dit gebruik kan van invloed zijn op de prestaties van de test.
- Het gebruik van reagentia die niet in deze kit zijn opgenomen of die niet zijn vermeld onder 'Materialen, reagentia en niet-geleverde apparatuur' (b.v. alternatieve *Taq* DNA-polymerasen) wordt NIET aanbevolen. Dit gebruik kan van invloed zijn op de prestaties van de test.
- Voorkom kruisbesmetting van DNA-monsters. Vervang de tips tussen DNA-monsters.
- Pre-en post-PCR-activiteiten moeten strikt fysiek gescheiden zijn. Gebruik specifiek ontworpen apparatuur, reagentia en laboratoriumjassen.
- Ethidium-bromide is mogelijk kankerverwekkend. Bij het bereiden en hanteren van gels moeten altijd beschermende handschoenen worden gebruikt. Verwijder ethidium-bromidegels en -buffers volgens lokale en nationale richtlijnen.
- Vermijd tijdens het bekijken en fotograferen van agarose-gels onder UV-licht altijd directe belichting en gebruik geschikte UV-blokkerende gezichtsbescherming, wegwerphandschoenen en laboratoriumjassen.

Symbolen

De volgende niet-standaardsymbolen zijn gebruikt:

Symbol	Beschrijving
	Locusspecifiek PCR-mengsel
	DNA-polymerase
	HLA-a exon 1, forwardsequencingprimer. Zie 'Kit-compositie' en Tabel 4 voor andere sequentie-primers.
	Fabricagedatum (vereist voor verkoopgebieden buiten de EU).

Procedure

1. PCR

- 1.1. Er moet een aparte PCR-reactie worden opgezet voor elke te versterken locus en voor elk afzonderlijk te testen monster. Elke reeks moet de juiste positieve controle(s) van het bekende genotype bevatten, en ten minste één negatieve controle voor elke locus die wordt versterkt.
- 1.2. Bereid elke keer als een PCR wordt uitgevoerd een verse oplossing van PCR-hoofdmengsel. Ontdooi het locus-specifieke PCR-mengsel snel bij kamertemperatuur. Eenmaal ontdooid, wervel kortstondig.
- 1.3. Doe het vereiste volume PCR-mengsel en DNA-polymerase in een steriel buisje voor het aantal te testen monsters (zie tabel 1 hieronder voor het volume per reactie). Pulsvervel de oplossing 3-4 keer.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Locusspecifiek PCR-mengsel	16 μ l	16 μ l	16 μ l	16,7 μ l	16,7 μ l	16,7 μ l
b.v. HLA-A-						
DNA-polymerase	1 μ l	1 μ l	1 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l
b.v. DNA POL – HLA-A						

Tabel 1: Samenstelling van het vereiste basismengsel per monster.

- 1.4. Doe 17 μ l van het hoofdmengsel in elk reactievaatje.
- 1.5. Voeg 3 μ l DNA-monster of geschikte positieve controle(s) toe aan elk reactievaatje. Voeg 3 μ l steriel water toe aan het reactievaatje met negatieve controle.
- 1.6. Verzegel de reactievaten. Meng voorzichtig door te wervelen en centrifugeer kortstondig.
- 1.7. Plaats de reactievaten in een thermocycler en verwerk ze volgens de onderstaande thermocyclingcondities.

95 °C: 10 minuten	} 33 cycli
96 °C: 20 sec.	
60 °C: 30 sec.	
72 °C: 3 minuten	
15 °C: vasthouden	

- 1.8. De versterking duurt ongeveer 2,5 uur.
- 1.9. Als de PCR is voltooid, verwijder dan de reactievaten/-plaat uit de thermische cyclus en ga ofwel direct naar gel-elektroforese of bewaar bij 4 °C tot nodig.

OPMERKING: Zuivering van amplicons door behandeling met ExoSAP dient plaats te vinden binnen 24 uur na voltooiing van de PCR.

2. Elektroforese met agarose-gel

- 2.1. Bevestig succesvolle versterking door agarose-gel-elektroforese met behulp van 2 μ l van elk PCR-product in combinatie met 5 μ l laadbuffer (alternatieve volumes

laadbuffer moeten vóór gebruik worden gevalideerd). Het gebruik van 1% agarosegels wordt aanbevolen.

2.2. Het aantal en de verwachte omvang van de resulterende amplicons variëren naargelang de locus en het monster-genotype. De verwachte PCR amplicongroottes zijn aangegeven in tabel 2.

Locus	Verwachte bandafmetingen
HLA-A	≈ 2 kbp
HLA-B	≈ 2 kbp
HLA-C	≈ 1,1 kbp en 1,4 kbp
HLA-DRB1	≈ 450 bp - 850 bp (HH-PD5.2-5) ≈ 630 bp - 980 bp (LG-PD5.2-7) Het bandpatroon zal variëren afhankelijk van de aanwezigheid van specifieke allelengroepen
HLA-DQB1	≈ 300 bp en 500 bp (PQ-PD6.2-2) ≈ 400 bp en 500 bp (AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp (HH-PD10.1) ≈ 400 bp, ≈ 780 bp en ≈ 1470 bp (KD-PD10.2-1)

Tabel 2: Verwachte productgroottes voor elke test.

3. Zuivering van PCR-producten

OPMERKING: Andere zuiveringssystemen dan ExoSAP-IT[®] of ExoProStar[™] (bv. Agencourt[®] AMPure[®] XP of kolomgebaseerde systemen) kunnen worden gebruikt om deze PCR-producten te zuiveren. Het wordt sterk aanbevolen om deze procedures te valideren voordat verder wordt gegaan. Als behandeling met ExoSAP moet worden gebruikt, wordt aanbevolen dat gebruikers de hierna beschreven procedure volgen.

3.1. Bereid een hoofdmengsel bestaande uit 4 μ l ExoSAP-IT[®] of ExoProStar[™] en 8 μ l van 2 mM MgCl₂ per monster dat moet worden gezuiverd. Puls wervel voorzichtig om te mengen. Voeg 12 μ l van het hoofdmengsel toe aan het reactievat van elk reactief monster. Verzegel de vaten, wervel en plaats ze dan ofwel op een schudapparaat ofwel wervel zachtjes gedurende 2 minuten. Centrifugeer kort voor het plaatsen in de thermocycler. Laat de thermocycler draaien volgens het volgende profiel:

37 °C: 30 min.
80 °C: 15 min.
4 °C: vasthouden

3.2. Verdun na voltooiing het gezuiverde product 1:4 met steriel water. Deze verdunningsstap zorgt ervoor dat er voldoende sjabloon is om de sequenceringsreacties uit te voeren en ervoor te zorgen dat de concentratie van het sjabloon voldoende is om gegevens van goede kwaliteit te produceren.

OPMERKING: Een hogere verdunningsfactor (bv. 1:8) kan nodig zijn als constant hoge signalen en daarmee verband houdend geluid en artefacten worden waargenomen. Zwakkere PCR-producten kunnen een lagere verdunningsfactor vereisen.

3.3. De met ExoSAP behandelde monsters mogen worden bewaard bij 4 °C tot gebruiksklaar. Deze monsters kunnen tot een week voor gebruik bij 4 °C worden bewaard, maar moeten bij -20 °C worden bewaard voor langdurige opslag⁹.

4. Sequencing-reactie

OPMERKING: In gevallen waarin heterozygote ambiguïteiten moeten worden opgelost met hemizygoten sequencingprimers zoals HARP[®]s, verwijzen wij naar de gebruiksaanwijzing bij OLERUP SBT™ HARP[®]s.

4.1. Tabel 3 bevat de volgorde van de primers die voor de diverse loci moeten worden gebruikt.

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		

Of		Of		Of	
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 [*]	

Tabel 3: Sequencing-primers die voor diverse loci worden gebruikt.

[†]RB-TG344-R is een HARP[®] gericht op het codon 86-dimorfisme. Het gebruik is optioneel.

^{*}PB-AG341-R is een HARP[®] gericht op het codon 85-dimorfisme in DPB1. Het gebruik is ook optioneel.

[^]DRB1EX3R-2 is een DRB1-sequencingprimer in de HH-PD5.2-5-kits die zich vergelijkbaar gedraagt met een HARP en ontworpen is om de volgende allelengroepen te sequencen: *03, *08, *11, *12, *13, *14, *15 en *16. Deze primer levert heterozygote, hemizygoten of geen sequence-gegevens op, afhankelijk van het genotype van het getypeerde monster. Bij de analyse van DRB1EX3R-2-gegevens in ASSIGN™ tegenover de DRB1-FullX2-referentie, worden de resulterende exon 3-

gegevens in een aparte laag geanalyseerd en is het mogelijk een aantal allel-ambigüiteiten in exon 3 op te lossen, zoals de DRB1*14:01- vs. *14:54-ambigüiteiten. Het gebruik ervan is facultatief, afhankelijk van de typeringsstrategie die door het laboratorium wordt gebruikt. Dit is niet van toepassing op de LG-PD5.2-7-kits, aangezien er bidirectionele sequencing voor exon 3 beschikbaar is.

4.2. Bereid een verse oplossing van sequencingprimermengsel op ijs elke keer dat een sequence-reactie wordt uitgevoerd. De samenstelling en de volumes van het hieronder vermelde mengsel zijn **per monster**.

Component	Volume
Sequencing-primer	2 µl
Steriel water	11,5 µl
BigDye® Terminators	1 µl
5x Seq Rxn Buffer	3,5 µl

4.3. Meng elk opeenvolgend reactiemengsel voorzichtig door pulswervelen.

4.4. Doe 18µl van de sequencing-reactiemix in elke toepasselijk reactievat.

OPMERKING: Voor runs waarbij weinig monsters met veel sequentie-primers betrokken zijn, is het aanvaardbaar om de sequentie-primer (2µl) direct in de individuele reactievaten te doen. Er kan dan een hoofdmengsel worden gemaakt met steriel water, BigDye® Terminators en 5x Seq Rxn Buffer, waarvan 16µl in elk reactievat moet worden gedaan. Het wordt sterk aanbevolen dat het gebruik van deze alternatieve procedure door de gebruiker wordt gevalideerd vóór de implementatie.

4.5. Voeg 2µl gezuiverd PCR-product toe aan elk geschikt reactievat.

OPMERKING: Let erop dat kruisbesmetting van sequence-reacties wordt voorkomen.

4.6. Sluit de reactievaten af, meng voorzichtig en centrifugeer kort om er zeker van te zijn dat er onderin elk reactievat inhoud zit.

4.7. Plaats de reactievaten in een thermische cycler en start volgens het volgende profiel:

Aantal cycli	Temperatuur en tijd
25	96 °C: 10 sec. 50 °C: 5 sec. 60 °C: 2 min.
1	4 °C: vasthouden

4.8. Wanneer het programma is voltooid, verwijdert u de reactievaten/-plaat uit de thermocycler en gaat u direct over tot het zuiveren van de reactieproducten of slaat u deze in het donker op bij 4 °C totdat ze nodig zijn. Aanbevolen wordt de monsters binnen 24 uur te zuiveren en op de DNA-sequencer te laten lopen.

5. Zuivering van sequencing-reactieproducten

OPMERKING: Het zuiveren van de reactieproducten kan worden uitgevoerd met behulp van andere procedures dan de hier beschreven methode met ethanolneerslag. Het wordt sterk aanbevolen om deze procedures te valideren voordat verder wordt gegaan.

- 5.1. Centrifugeer de reactievaten/-platen kort voordat u verder gaat. Indien tijdens de thermische cycli herbruikbare deksels/doppen zijn gebruikt, label dan de deksels/doppen om kruisbesmetting te voorkomen.
- 5.2. Verwijder voorzichtig de zegels.
- 5.3. Voeg bij elk reactievat 5 µl van 125mM EDTA, pH8,0. Zorg ervoor dat de EDTA de onderkant van het reactievat goed bereikt.
- 5.4. Voeg 60 µl ethanol 100% toe aan elk reactievat. Verzegel de reactievaten/-plaat en wervel kort maar grondig om een grondige menging te garanderen.
- 5.5. Laat de versterkingsproducten neerslaan door te centrifugeren bij 2000 g gedurende 45 minuten. **GA ONMIDDELIJK NAAR DE VOLGENDE STAP**. Indien dit niet mogelijk is, moet u 10 minuten extra centrifugeren voordat u verder gaat.
- 5.6. Verwijder de afdichtingen van de reactievaten en gooi het supernatans weg door de reactievaten om te keren op een vel keukenpapier of tissue.
- 5.7. Plaats de omgekeerde reactievaten en de keukenrol of tissue in de centrifuge. Centrifugeer gedurende 1 minuut bij 350 g om overgebleven supernatans te verwijderen.
- 5.8. Verwijder de reactievaten uit de centrifuge en plaats ze rechtopstaand op de werkbank. Gooi de keukenrol of de tissues weg.
- 5.9. Bereid een verse oplossing van 80% ethanol met absolute ethanol en steriel water.
- 5.10. Voeg 60 µl ethanol 80% toe aan elk reactievat. Verzegel de reactievaten opnieuw en wervel kort.
- 5.11. Draai bij 2000 g gedurende 5 minuten.
- 5.12. Herhaal de stappen 5.6 en 5.7.
- 5.13. Verwijder de reactievaten uit de centrifuge en gooi de papieren doek weg. Verzegel de reactievaten en ga verder met de denatureringsstap. Bewaar anders bij -20 °C in het donker¹⁰. Het wordt aanbevolen dat de versterkingsproducten binnen 24 uur na het instellen van de sequencing-reacties op de DNA-sequencer worden uitgevoerd.

6. Denaturatie en elektroforese van reactieproducten

OPMERKING: De hier beschreven procedure voor de denaturatie van versterkingsproducten in Hi-Di™-formamide is mogelijk niet nodig als er andere zuiveringsprocedures dan de neerslag van ethanol zijn gebruikt. Het wordt sterk aanbevolen dat gebruikers alternatieve procedures valideren alvorens verder te gaan.

- 6.1. Voeg 12 µl Hi-Di™-formamide toe aan elk reactievat. Wervel en centrifugeer de reactievaten/plaat kort.
- 6.2. Incubeer de reactievaten bij 98 °C gedurende 5 minuten. Zorg er na de incubatie voor dat de reactievaten snel worden afgekoeld tot kamertemperatuur (bijv. op ijs plaatsen of de thermische cycler gebruiken om de denaturatie- en afkoelingsstappen uit te voeren) voordat ze op de sequencer worden geplaatst. Als het monster eenmaal is geresuspendeerd in Hi-Di-formamide, is het aan te raden

om het direct op het instrument te laden. Het monster is gedurende 24 uur stabiel op het instrument⁸.

OPMERKING: Zorg ervoor dat er geen luchtbelletjes in de reactievaten zitten. Deze kunnen de capillair binnendringen en beschadigen.

6.3. Laad de reactievaten/-plaat op de geautomatiseerde sequencer en bereid het gegevensverzamelingsbestand voor volgens de specificaties van de fabrikant van de sequencer.

6.4. De volgende instrumentparameters zijn door de fabrikant gevalideerd met gebruik van Big Dye[®] Terminator Sequencing Kit v3.1 en POP-7[™]. Voor deze parameters kan een gebruikersvalidatie nodig zijn voor andere polymeren, sequencing-chemie en instrumenten. Raadpleeg de gebruikershandleiding van het betreffende instrument voor gedetailleerde instructies en richtlijnen (zorg er bijvoorbeeld voor dat de kleurstofset-instelling geschikt is voor de gebruikte chemie, bijvoorbeeld v1.1 Big Dye[®] Terminator-sequencingchemie vereist een andere kleurstofset).

<u>Parameter</u>	<u>Instelling</u>
Kleurstofset	Z_BigDyeV3
Mobiliteitsbestand	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Run-module	Reguliere FastSeq50_POP7
Injectietijd	15 sec.
Runtime	3000 sec.

6.5. Gebruik de software voor het verzamelen van gegevens van het instrument om de ruwe verzamelde gegevens te verwerken en de sequence-bestanden te creëren. Voor gedetailleerde instructies en hulp wordt verwezen naar de desbetreffende gebruikershandleiding van het instrument.

7. Bewerking en analyse van elektroferogrammen

De OLERUP SBT[™]-kits zijn ontworpen, ontwikkeld en gevalideerd met behulp van de OLERUP ASSIGN[™] SBT-software die is ontwikkeld door CareDx Pty Ltd. Gebruikers wordt aangeraden ASSIGN[™] SBT versie 3.6+ en hoger (ASSIGN[™] SBT V4.7 of OLERUP ASSIGN[™] SBT V471) te gebruiken, aangezien deze versies van de software gebruik maken van instel- en referentiebestanden die speciaal zijn ontworpen voor de OLERUP SBT[™]-typeringskits en HARP[®]s. Voor meer details over de werking van deze software kunt u terecht bij de betreffende gebruikershandleidingen die te downloaden zijn vanaf de CareDx-website (<http://www.CareDx.com>).

De op sequencing gebaseerde typegegevens die met behulp van de OLERUP SBT[™]-typeringskits worden gegenereerd, moeten worden geanalyseerd aan de hand van de volgende ASSIGN[™] SBT-referentiebestanden die door CareDx Pty Ltd worden geleverd:

<u>Test</u>	<u>Productcode</u>	<u>ASSIGN - referentiebestand</u>
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 of 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

Prestatiekenmerken

Nauwkeurigheid

Panels van maximaal 93 monsters van het UCLA International DNA Exchange Proficiency Testing-programma (2008 - 2010), gebruikt voor interne tests voor de OLERUP SBT™-kits, leverden de volgende resultaten op:

Locus	Aantal geteste monsters	Diagnostische gevoeligheid (% van succesvolle PCRs)	Diagnostische specificiteit (% van de verkregen genotypen)	Aantal dissonante monsters	Aantal heterozygote monsters	Aantal unieke allelen
HLA-A	81	100%	100%	0	74	20
HLA-B	82	100%	98,8%	0	79	81
HLA-C	39	97,5%	97,5%	0	35	21
HLA-DRB1	93	96,7%	96,7%	0	84	39
HLA-DQB1 (PQ-PD6. 2-2)	42	100%	100%	0	36	14
HLA-DQB1 (AN-PD6. 2-3)	38	100%	100%	0	34	15
HLA-DPB1 (HH-PD10.1)	77	100%	100%	0	60	18
HLA-DPB1 (KD-PD10. 2-1)	16	100%	100%	2*	14	13

* De twee dissonante monsters bevatten extra sequentie-informatie buiten exon 2 die niet werd gerapporteerd door het UCLA International DNA Exchange proficiency-testprogramma. Eén monster bevatte 131:01 maar werd gerapporteerd als 13:01 door het UCLA International DNA Exchange proficiency-testprogramma. De allelen verschillen in exons 3 en 4. Het andere monster bevatte 107:01 maar werd gemeld als 13:01 door het UCLA International DNA Exchange proficiency-testprogramma. Deze allelen verschillen in exon 1.

Voor de OLERUP SBT™ HLA-DRB1-kits (productcode LG-PD5.2-7) werd een panel van 23 goed gekarakteriseerde monsters gebruikt voor interne tests. Daarnaast is er een panel van 293 extern extern verworven monsters getypeerd zonder *a priori* kennis te hebben van andere HLA-typeringsgegevens. Deze monsters werden ook getest met de OLERUP SBT™ HLA-DQB1-test (PQ-PD6.2-2). In die gevallen waarin een homozygoot resultaat werd verkregen, werden de DQB1/DRB1-associaties voor die monsters onderzocht om het resultaat te bevestigen en om gevallen op te sporen waarin allel-dropout kan zijn opgetreden.

De proeven leverden de volgende resultaten op:

Locus	Aantal geteste monsters	Diagnostische gevoeligheid	Diagnostische specificiteit	Aantal dissonante monsters	Aantal heterozygote monsters	Aantal unieke allelen
HLA-DRB1	23	100%	100%	0	23	12

286* 97,9% 99,6% 0 253 33

* Zes monsters konden niet worden versterkt als gevolg van slechte kwaliteit van de DNA-monsters. Eén monster bleek besmet DNA te bevatten, waarvan de bron zich voordeed in het laboratorium waar de monsters waren verkregen. Als gevolg van de verontreiniging kon voor dat monster geen genotype worden verkregen.

De sequentieanalyse van PCR- en sequentie-primerlocaties en het prestatie-evaluatieonderzoek hebben geen veel voorkomende en goed gedocumenteerde allelen geïdentificeerd die niet zijn versterkt door het aanbevolen gebruik van deze kits. Voor meer informatie raadpleegt u het document *OLERUP SBT™ Primer Analysis* dat beschikbaar is bij elke OLERUP ASSIGN™ SBT-referentie-uitgave, te downloaden vanaf de CareDx-website. (<http://www.CareDx.com>).

Detectiegrens

De aanbevolen concentratie van humaan genomisch DNA met een hoog molecuulgewicht is 20 - 100 ng/µl. Uit interne tests is gebleken dat ook monsters met een concentratie van 5 ng/µl kunnen worden gebruikt. De juiste genotypen werden ook verkregen van DNA van slechte kwaliteit of van gescheurd DNA.

Specificiteit

De OLERUP SBT™-kits van CareDx Pty Ltd zijn locus-specifieke tests. Het gebruik van de kits volgens deze instructies mag slechts één enkele locus versterken. In de meeste gevallen zal het gebruik van de sequencingprimers in elke kit een HLA-typing opleveren voor de meeste monsters zonder dat er een verdere resolutie nodig is. In die gevallen waar heterozygote ambiguïteiten blijven bestaan, wordt het gebruik van resolving sequentie-primers (zoals OLERUP SBT™ HARP®s) aanbevolen.

Opgemerkt moet worden dat mutaties bij versterkings- of sequentie-primer-plaatsen mogelijk zijn en kunnen leiden tot uitval van allel. Monsters die wijzen op een homozygote typering moeten worden bevestigd door middel van alternatieve procedures.

Storende stoffen

CareDx Pty Ltd heeft alle bekende mogelijk storende stoffen geïdentificeerd die van invloed kunnen zijn op de test. Zie onderstaande tabel.

Inhibitor	Potentiële bron	Risico	Commentaar
EDTA	TE-buffer, bloedcollectiebuisjes	Zeer laag	Resuspendeer het DNA in Tris-HCl pH8 of TE met <1mM EDTA. Gebruik commerciële DNA-preparaatkits en/of vermijd EDTA-bloedafnamebuisjes
Alcohol	Ethanol, isopropanol, isoamylalcohol	Laag	Zorg ervoor dat DNA-pellets of -kralen luchtgedroogd en visueel geïnspecteerd worden op ethanoldruppeltjes (1% ethanol = 1,25µl 80% ethanol in een 100µl PCR-reactie).
Overtollige zouten	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Zeer laag	Zorg voor grondig wassen van DNA-pellets of -kralen met 80% ethanol. Zorg ervoor dat OD 230/260 begint met genomisch DNA ~2
Chaotrope zouten	Guanidinium Cl; MgCl ₂ ; ureum	Zeer laag	Zorg voor grondig wassen van DNA-pellets of -kralen met 80% ethanol. Zorg ervoor dat OD 230/260 begint met genomisch DNA ~2

Inhibitor	Potentiële bron	Risico	Commentaar
Fenol: chloroform	Biologische overdracht	Zeer laag	Een onderdeel van de veel gebruikte commerciële Trizol DNA-extractieprocedure. Zorg voor grondig wassen van DNA-pellets of -kralen met 80% ethanol. Zorg ervoor dat OD 230/260 begint met genomisch DNA ~2
Eiwitten	BSA, PEG, bloedalbumine	Zeer laag	Gebruik commerciële bloed-DNA-preparaatkits. Zorg ervoor dat OD 260/280 begint met genomisch DNA >1,8
Heme, hemoglobine, immunoglobulinen	Bloed	Zeer laag	Vermijd het gebruik van bloedmonsters die ernstige hemolyse vertonen. Gebruik commerciële bloed-DNA-preparaatkits. Zorg ervoor dat OD 260/280 begint met genomisch DNA >1,8
Detergentia / DDT	Na-deoxycholaat, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-octylglucoside	Zeer laag	Zorg voor grondig wassen van DNA-pellets of -kralen met 80% ethanol. Zorg ervoor dat OD 230/260 begint met genomisch DNA ~2
Proteasen	Proteïnase K, monsterbehandeling	Zeer laag	Gebruik commercieel bloed of speeksel-DNA-preparaatkits. Draag altijd handschoenen
Nucleasen	Behandeling van monsters, restrictie-enzymen, micrococcus-nuclease	Zeer laag	Gebruik commerciële bloed-DNA-preparaatkits. Draag altijd handschoenen
Exogeen DNA / RNA	Overdracht, besmetting	Zeer laag	Bereid genomisch DNA voor in een speciale pre-PCR-zone
Dragers	RNA, heparine, glycogeen	Zeer laag	Gebruik commerciële DNA-preparaatkits en/of vermijd heparine-bloedafnametubes
Overtollige metaalionen	Mg ²⁺ uit PCR-buffer, Fe-ionen	Zeer laag	Zorg voor grondig wassen van DNA-pellets of -kralen met 80% ethanol. Zorg ervoor dat OD 230/260 begint met genomisch DNA ~2
Antivirale geneesmiddelen (bv. acyclovir)	Bloed	Zeer laag	Gebruik commerciële bloed-DNA-preparaatkits. Zorg ervoor dat OD 260/280 begint met genomisch DNA >1,8
Handschoenpoeder	Gepoederde handschoenen	Zeer laag	Gebruik poedervrije handschoenen
Uv-bestraalde PCR-tubes	Uv-behandeling van PCR-tubes	Zeer laag	Vermijd uv-behandeling van plastic voorwerpen

Beperkingen en waarschuwingen

- Het wordt ten zeerste aanbevolen dat deze kits door de gebruiker worden gevalideerd voordat ze in het laboratorium worden gebruikt met behulp van monsters waarvan het HLA-type is bepaald met behulp van andere moleculaire procedures. Met name afwijkingen van deze procedure (bv. het gebruik van alternatieve PCR- of DNA-sequentiezuiveringsprocedures) moeten vóór de implementatie door de gebruiker worden gevalideerd.
- Deze kits zijn gevalideerd met behulp van panels van monsters waarvan de genotypen een breed scala aan allelen bestrijken. Er moet echter worden opgemerkt dat zeldzame allelen en allelen met polymorfismen in versterkings- en sequentieprimerplaatsen kunnen worden aangetroffen en deze mogen niet worden versterkt of gesequencerd.

- De aard van de op HLA-sequentie gebaseerde typering is zodanig dat andere factoren dan het PCR-mengsel kunnen leiden tot een voorkeursversterking of het wegvallen van het allel. Als gevolg daarvan moeten de schijnbaar homozygote typeringsresultaten worden bevestigd met behulp van alternatieve methoden en/of familie-genotypering.
- Een positieve controle (menselijk DNA) en een negatieve controle (steriel water) moeten bij elke PCR-run worden opgenomen. De positieve controle moet een PCR-product opleveren van de juiste grootte, afhankelijk van de versterkte locus en de resulterende sequentie moet in overeenstemming zijn met het genotype van het monster. Er mogen geen PCR-producten in de negatieve sjablooncontrole voor elk experiment aanwezig zijn. Als een band duidelijk verontreinigd is, kan dit op een bepaald niveau zijn gebeurd en moet de run worden herhaald.
- Af en toe kunnen er extra, flauwere PCR-producten zichtbaar zijn. Deze extra banden verstoren de sequentieresultaten of de kwaliteit niet.

Licentie

De OLERUP SBT™ kits bevatten GoTaq® Hot Start Polymerase (DNA POL), dat wordt geproduceerd door Promega Corporation voor distributie door CareDx Pty Ltd. Gelicentieerd aan Promega onder de Amerikaanse octrooinummers 5.338.671 en 5.587.287 en de overeenkomstige buitenlandse octrooien.

Bibliografie

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 Gebruiksaanwijzing, CareDx Pty Ltd*
6. Meer informatie over het UCLA DNA-uitwisselingsprogramma is te vinden op: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. De huidige HLA-allelen zijn te vinden op <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.
8. Thermo Fisher- website (<https://www.thermofisher.com/search/results?query=4311320&persona=DocSupport&type=Product+FAQs> , antwoord-id: E15311)
9. Current Protocols in Molecular Biology (2001)3, Unit 15.2.5
10. Thermo Fisher-website <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 (zie ook citaten daarin)
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 (zie ook citaten daarin)
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 rapport Storende stoffen* 2018

Problemen oplossen

Probleem	Mogelijke oorzaak	Oplossing
Geen of zwak PCR-product	Slechte kwaliteit DNA	Beoordeel de DNA-kwaliteit met gelelektroforese. Intact DNA dient ong. 3kb te zijn met weinig of geen bewijs van smering op gel. Extraheer het DNA opnieuw en herhaal zo mogelijk de PCR.
	Onvoldoende DNA toegevoegd aan PCR.	Controleer of de DNA-concentratie tussen 20 - 100 ng/μl is. Extraheer het DNA opnieuw en herhaal zo mogelijk de PCR.
	PCR-remmers aanwezig in genomisch DNA	PCR-remmers zijn aanwezig in alle lichaamsvloeistoffen, inclusief bloed, serum en plasma. PCR-remmers vertegenwoordigen een diverse groep stoffen met verschillende eigenschappen en werkingsmechanismen. De meest voorkomende remmers in het bloed zijn hemoglobine, IgG en Lactoferrine. Daarnaast kunnen hormonen of anti-virale stoffen zoals acyclovir, evenals sommige antibiotica ook invloed hebben op genversterking ^{12,13} . Vermijd het gebruik van volbloedmonsters die heparine bevatten. Voor details, zie de manuscripten waarnaar verwezen wordt ^{12,13} . EDTA: kan Mg ²⁺ concentraties wijzigen en kan bij bepaalde concentraties DNA-polymerase remmen ¹³ . In het algemeen leiden Na-citraatbuisjes tot DNA ¹¹ van hoge kwaliteit. DNA-extractie-/zuiveringsmethoden kunnen PCR-remmers efficiënt verwijderen. De klant moet de DNA-extractie-/zuiveringsmethoden evalueren om de zuiverheid van het monster te waarborgen. Extraheer het DNA opnieuw en herhaal zo mogelijk de PCR.
	DNA-polymerase niet toegevoegd aan het hoofdmengsel of onvoldoende vermenging van hoofdmengsel vóór toevoeging aan de monsters.	Herhaal PCR. Zorg ervoor dat hoofdmengselcomponenten voldoende worden toegevoegd en gemengd door wervelen.
	Problemen met thermisch cycleren	Controleer de parameters van de thermische cyclusrun. Controleer de run-geschiedenis om ervoor te zorgen dat de run niet vroegtijdig werd beëindigd. Zorg ervoor dat de thermische cyclus volgens de specificaties van de fabrikant werkt en regelmatig wordt onderhouden.
	Geen ethidium-bromide toegevoegd aan de gel.	Dompel de gel onder in een kleurstofbad dat 1X TBE bevat met 0,5 mg/ml ethidium-bromide. Ontvlek in 1X TBE voordat u het gelbeeld maakt. Zorg ervoor dat ethidium-bromide vóór het gieten

		aan de gel wordt toegevoegd.
	DNA-monsters worden geëluëerd of verdund in water dat een licht zure pH kan hebben.	Gebruik waar mogelijk steriel water met een neutrale pH.
Geen of een zwak PCR-product voor de exon 3-5-band voor de KD-PD10.2-1-test	Slechte kwaliteit DNA	Versterking van monsters van zeer slechte kwaliteit kan resulteren in een zwakke versterking van de exon 3-5-amplicon. Typing kan nog steeds worden bereikt met behulp van exon 1- en 2-sequentiegegevens. Extraheer zo mogelijk het DNA opnieuw en herhaal de PCR.
Onjuiste bandmaten	Onjuiste kit gebruikt	Controleer of de juiste kit is gebruikt.
	Onjuist thermisch cyclisch programma gebruikt.	Controleer de parameters van de thermische cyclus.
	PCR-besmetting	Controleer de negatieve controle op sporen van besmetting. Onsmet het werkgebied en herhaal de PCR. Herhaal de PCR om de bron van besmetting te identificeren. Overweeg een nieuwe kit te gebruiken. Als het genomische DNA van een monster besmet blijkt te zijn, extraheer dan opnieuw of verkrijg een alternatieve bron van DNA.
Zwakke signaalintensiteit van elektroferogrammen	Zwak PCR-product	Controleer het gel-beeld. Het sequencen van zwakke PCR-banden wordt NIET aanbevolen omdat de sequentiekwaliteit onvoldoende kan zijn voor SBT. Overweeg na PCR-zuivering een lagere verdunningsfactor (b.v. 1:2, 1:3) te gebruiken.
	Onvoldoende reactieproducten toegepast op sequencer	Controleer de sequentieparameters. Het kan nodig zijn de injectietijd en de spanning te verhogen.
	Problemen bij de zuivering van sequentieproducten	Wees uiterst voorzichtig bij het weggooien van de supernatans omdat het de pellet kan losmaken.
Signaalintensiteit is te hoog (aanwezigheid van hoge fluorescerende pieken – artefacten)	Te veel PCR-product	Controleer het gel-beeld. Overweeg om na PCR-zuivering een hogere verdunningsfactor te gebruiken. Controleer de hoeveelheid DNA-polymerase die in de PCR wordt gebruikt.
	Te veel reactieproducten toegepast op de sequencer.	Controleer de instrumentparameters. Overweeg om de injectietijd en -spanning te verminderen.
Ruis in basislijn (hoge achtergrond)	Verontreinigd PCR-product	Zie de hierboven vermelde corrigerende maatregelen.
	Versterking van nauw verwante HLA-genen	Controleer de parameters van de thermische cycli.
	Slechte PCR-	Zorg ervoor dat de behandeling met ExoSAP

	zuivering	wordt uitgevoerd volgens de gebruiksaanwijzing van kit. Zorg ervoor dat het PCR-mengsel grondig wordt gemengd met ExoSAP Overweeg het gebruik van ExoSAP volgens de procedure van de fabrikant (verhoging van de hoeveelheid enzym) of overweeg een alternatieve zuiveringstechniek.
	Verontreinigde sequentiereacties	Neem alle maatregelen om kruisbesmetting te voorkomen. Vervang wanneer maar mogelijk de pipettips. Voeg vloeistoffen toe bovenaan de reactievaten. Voorkom aerosolen.
	Verontreinigde sequentie-primer	Controleer de sequentie-kwaliteit van de andere sequentie-primers en andere monsters met dezelfde primer. Overweeg het gebruik van een nieuw aliquot van sequentie-primer.
	Verontreinigd kleurstof-terminatormengsel of sequentie-buffer	Herhaal de sequencing met verse aliquot van reagentia.
	Slechte zuivering van sequentie-producten.	Herhaal de sequencing en zorg ervoor dat de zuivering volgens de instructies van de fabrikant wordt uitgevoerd.
Aanwezigheid van kleurstofvlekken	Slechte zuivering van sequentie-producten	Reinig de producten volgens de kit-instructies. Zorg ervoor dat de producten voldoende met 80% ethanol worden gewassen.

Aanverwante producten

IVD's met CE-markering:

ASSIGN™ SBT 3.6+ Productcode: CGX0036+

ASSIGN™ SBT v4.7 Productcode: CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Productcode: CGX00471

OLERUP SBT™ HARP®s

Voor de volledige productlijst, zie de OLERUP SBT™ HARP®s instructies voor gebruik

Uitsluitend voor onderzoek:

OLERUP SBT™ HLA-typeringskits

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

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

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

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

Opmerking: de hierboven vermelde producten hebben in Australië een vergunning als IVD's

Laboratoriumreagentia voor algemeen gebruik

MgCl ₂ – 1.0(50)	2mM MgCl ₂
MgCl ₂ – 1.0(3000)	
SEQ BUF – 2.0(400)	5x Seq Rxn Buffer
SEQ BUF – 2.0(5000)	
EDTA – 3.0(200)	125 mM EDTA, pH 8,0
EDTA – 3.0(5000)	

Neem contact op met uw lokale distributeur voor meer informatie.



Zelfgecertificeerde kits:

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

Contactgegevens

Fabrikant

CareDx Pty Ltd
Postbus 1294
Fremantle 6959
West-Australië
Australië
Tel: +61-08-9336-4212
E-mail: orders-aus@caredx.com
Website: www.CareDx.com

Voor ondersteuning en bestelgegevens, zie de CareDx-website (<http://www.caredx.com>).