

## Súpravy na typizáciu HLA

### Návod na použitie

Amplifikácia a sekvenovanie PCR lokusov tried I a II HLA

Č. verzie: 1.4

Dátum vydania: 27. mája 2020

**IVD**



CareDx Pty  
20 Collie St.  
Fremantle 6160  
Západná Austrália  
Austrália

**ES** | **OZN**

Qarad bvba  
Cipalstraat 3  
B-2440 Geel  
Belgicko

# Obsah

<b>PRINCÍP</b> .....	<b>3</b>
<b>ÚČEL POUŽITIA</b> .....	<b>3</b>
<b>ZLOŽENIE SÚPRAVY</b> .....	<b>4</b>
<b>POŽIADAVKY NA SKLADOVANIE</b> .....	<b>9</b>
<b>NEDODANÉ MATERIÁLY, REAGENCIE A ZARIADENIA</b> .....	<b>10</b>
<b>POŽIADAVKY NA VZORKY</b> .....	<b>11</b>
<b>VAROVANIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA</b> .....	<b>12</b>
<b>SYMBOLY</b> .....	<b>12</b>
<b>METÓDA</b> .....	<b>13</b>
1. PCR .....	13
2. ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVOM GÉLI .....	14
3. PURIFIKÁCIA VÝROBKU PCR .....	14
4. SEKVENČNÁ REAKCIA .....	15
5. PURIFIKÁCIA SEKVENČNÝCH REAKČNÝCH PRODUKTOV .....	17
6. DENATURALIZÁCIA A ELEKTROFORÉZA SEKVENČNÝCH REAKČNÝCH PRODUKTOV .....	17
7. ÚPRAVA A ANALÝZA ELEKTROFEROGRAMOV .....	18
<b>VÝKONNOSTNÉ VLASTNOSTI</b> .....	<b>20</b>
PRESNOSŤ .....	20
DETEKČNÉ LIMITY .....	21
ŠPECIFICKOSŤ .....	21
<b>INTERFERUJÚCE LÁTKY</b> .....	<b>21</b>
<b>OBMEDZENIA A UPOZORNENIA</b> .....	<b>22</b>
<b>LICENCIA</b> .....	<b>23</b>
<b>LITERATÚRA</b> .....	<b>24</b>
<b>RIEŠENIE PROBLÉMOV</b> .....	<b>25</b>
<b>PODOBNE PRODUKTY</b> .....	<b>27</b>
<b>OLERUP SBT™ HARPS®</b> .....	<b>27</b>
<b>KONTAKTNÉ INFORMÁCIE</b> .....	<b>28</b>


## Princíp

Metódu typizácie na základe sekvenovania (SBT) HLA opísanú v tomto dokumente pôvodne vytvoril D. Sayer v roku 2001<sup>1</sup>, ktorý v roku 2004<sup>2</sup> vytvoril aj jednoskúmavkový test. Táto metóda zahŕňa počiatočnú amplifikáciu cieľovej sekvencie, po ktorej nasleduje enzymatické spracovanie s cieľom odstránenia nezačlenených primerov a dNTP. Amplikón sa následne používa ako templát na priame automatizované fluorescenčné sekvenovanie DNA pomocou prispôsobených sekvenčných primerov a sekvenčnej chemickej látky terminátora Big Dye<sup>®</sup>, zo zariadenia Applied Biosystems<sup>™</sup> spoločnosti Life Technologies<sup>™</sup>. Extenčné produkty sa purifikujú v súlade s metódou etanolovej precipitácie a denaturujú pomocou formamidu Hi-Di<sup>™</sup>, zo zariadenia Applied Biosystems<sup>™</sup> spoločnosti Life Technologies<sup>™</sup>, pred separáciou a detekciou v automatizovanom zariadení na fluorescenčné sekvenovanie DNA. Odporúča sa, aby sa výsledné údaje následne analyzovali pomocou softvéru na analýzu sekvencie ASSIGN<sup>™</sup> SBT od CareDx Pty Ltd<sup>3-5</sup>.

## Účel použitia

Súpravy OLERUP SBT<sup>™</sup> HLA SBT spoločnosti CareDx Pty Ltd sa používajú na typizáciu génov triedy I (HLA-A, -B a -C) a triedy II (HLA-DRB1, -DQB1 a -DPB1) HLA v laboratórnych podmienkach z genómovej DNA. Každá súprava obsahuje reagentie, ktoré zjednodušujú amplifikáciu PCR a sekvenovanie DNA daného génu. Výsledné sekvenčné údaje sa potom interpretujú pomocou softvéru ASSIGN<sup>™</sup> SBT spoločnosti CareDx Pty Ltd. Je potrebné poznamenať, že tieto súpravy SBT sa nepoužívajú na diagnostiku ochorení, ale môžu sa používať ako súčasť procesu pri určovaní kompatibility medzi darcami a príjemcami. Test predstavuje sekvenčný test DNA, ktorého výsledkom je sekvencia DNA časti génu HLA. Určení používateľa zariadenia sú vhodne vyškolené osoby, ktoré majú znalosti týkajúce sa frekvencie typov HLA vo svojej populácii. Testy sa musia vykonávať v regulovaných laboratóriách.

## Zloženie súpravy

Súprava	Katalógové č.		Obsah PRE-PCR <sup>†</sup> (Počet vialiek)	Obsah POST-PCR (Počet vialiek)		
<b>Trieda I</b>						
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 testov	<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× 25 $\square$ 1× 352 $\square$	<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× 44 $\square$ , každá
	XH-PD1.1-2(50)	50 testov	<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× 60 $\square$ 1× 880 $\square$	<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× 110 $\square$ , každá
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 testov	<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× 25 $\square$ 1× 352 $\square$	<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× 44 $\square$ , každá
	BS-PD2.1-2(50)	50 testov	<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× 60 $\square$ 1× 880 $\square$	<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× 110 $\square$ , každá

Súprava	Katalógové č.	Σ	Obsah PRE-PCR <sup>†</sup> (Počet vialiek)		Obsah POST-PCR (Počet vialiek)	
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 testov	<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× 25 <sup>2</sup> l 1× 352 <sup>2</sup> l	<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× 44 <sup>2</sup> l, každá
	HH-PD 3.2-2(50)	50 testov	<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× 60 <sup>2</sup> l 1× 880 <sup>2</sup> l	<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× 110 <sup>2</sup> l, každá

Súprava	Katalógové č.	Σ	Obsah PRE-PCR <sup>†</sup> (Počet vialiek)	Obsah POST-PCR (Počet vialiek)		
<b>Trieda II</b>						
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 testov	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1× 10 <sup>2</sup> l 1× 370 <sup>2</sup> l	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-2 RB-TG344-R	1× 44 <sup>2</sup> l, každá
	HH-PD5.2-5(50)	50 testov	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1× 20 <sup>2</sup> l 1× 920 <sup>2</sup> l	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-2 RB-TG344-R	1× 110 <sup>2</sup> l, každá
	LG-PD5.2-7(20)	20 testov	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1× 10 <sup>2</sup> l 1× 370 <sup>2</sup> l	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7 DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1× 44 <sup>2</sup> l, každá
	LG-PD5.2-7(50)	50 testov	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1× 20 <sup>2</sup> l 1× 920 <sup>2</sup> l	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7 DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1× 110 <sup>2</sup> l, každá
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 testov	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1× 10 <sup>2</sup> l 1× 370 <sup>2</sup> l	DQB1EX2F DQB1EX2R DQB1EX3F DQB1EX3R	1× 44 <sup>2</sup> l, každá
	PQ-PD6.2-2(50)	50 testov	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1× 20 <sup>2</sup> l 1× 920 <sup>2</sup> l	DQB1EX2F DQB1EX2R DQB1EX3F DQB1EX3R	1× 110 <sup>2</sup> l, každá

Súprava	Katalógové č.	Σ	Obsah PRE-PCR <sup>†</sup> (Počet vialiek)		Obsah POST-PCR (Počet vialiek)		
	AN-PD6.2-3(20)	20 testov	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1× 10 <sup>2</sup> 1× 370 <sup>2</sup>	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1× 44 <sup>2</sup> , každá
	AN-PD6.2-3(50)	50 testov	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1× 20 <sup>2</sup> 1× 920 <sup>2</sup>	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1× 110 <sup>2</sup> , každá
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 testov	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1× 10 <sup>2</sup> 1× 370 <sup>2</sup>	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1× 44 <sup>2</sup> , každá
	HH-PD10.1(50)	50 testov	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1× 20 <sup>2</sup> 1× 920 <sup>2</sup>	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1× 110 <sup>2</sup> , každá
	KD-PD10.2-1(20)	20 testov	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1× 10 <sup>2</sup> 1× 370 <sup>2</sup>	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	1× 44 <sup>2</sup> , každá
					PB-AG341-R		

Súprava	Katalógové č.	Σ	Obsah PRE-PCR <sup>†</sup> (Počet vialiek)		Obsah POST-PCR (Počet vialiek)		
	KD-PD10.2-1(50)	50 testov	<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 MIX</div>	1× 20µl 1× 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× 110µl, každá	

<sup>†</sup>Súprava PRE-PCR obsahuje vialku so zmesou PCR špecifickou pre daný lokus (napr. 

HLA-A MIX

), ktorá pozostáva z tlmivého roztoku PCR, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> a primerov PCR špecifických pre daný lokus, ako aj z jednej vialky polymerázy DNA (napr. 

DNA POL – HLA-

).

Súprava POST-PCR obsahuje sekvenčné primery (napr. 

AEX1F

).



## Požiadavky na skladovanie

Nádoby na PRE- a POST-PCR môžu byť oddelené a môžu sa skladovať v mrazničkách určených pre PRE- a POST-PCR. V prípade skladovania pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (teplota v rozsahu  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  je prijateľná) sa zložky súpravy môžu používať do expirácie uvedenej na vonkajšej nádobe súpravy a dokážu tolerovať až 25 cyklov zmrazovania a rozmrazovania.

Zrýchlené testovanie stability súpravy HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 a -DPB1 uvádza čas skladovateľnosti dva a pol roka od dátumu výroby, ak sa skladujú pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ukončený potvrdzujúci skutočný čas testovania. Nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie.

Ak chce zachovať optimálnu účinnosť súpravy, pred použitím by sa zložky súpravy mali vybrať z úložného priestoru s teplotou  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a mali by sa rýchlo rozmraziť pri izbovej teplote. Zložky súpravy, okrem polymerázy, by sa mali opatrne vortexovať, aby sa zaručilo, že sa zložky každej skúmavky vhodne zmiešajú po každom rozmrazení. Súpravy/zložky po použití sa musia okamžite vrátiť do prostredia s teplotou  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Nedodané materiály, reagenty a zariadenia

### PCR

1. Sterilná voda
2. Elektronické alebo mechanické pipety a hroty odolné proti aerosólom
3. Termálny cyklér s ohrevným vekom  
Tieto súpravy boli schválené na používanie s nasledujúcimi termálnymi cyklérmi:  
MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Applied Biosystems™ spoločnosti Life Technologies™ Veriti™ termálny cyklér, Gene Amp® PCR System 9700 a Eppendorf Mastercycler® Pro.  
**Používanie iných termálnych cyklérov s týmito súpravami si vyžaduje schválenie používateľom.**
4. Reakčné skúmavky termálneho cykléra s 0,2 ml tenkými stenami (pásky s 8 jamkami alebo platničky s 96 jamkami).  
Používajte tie, ktoré sa odporúčajú s vaším termálnym cyklérom.
5. Sterilná skúmavka 1,5 ml
6. Sterilné pracovné prostredie, ako napríklad biologická bezpečnostná skrinka alebo kryt.
7. Centrifúga navrch stola s adaptéromi platní a schopnosťou dosiahnuť 2 500 x g
8. Vortex

### Elektroforéza v agarózovom géli

9. Prístroj na elektroforézu v agarózovom géli
10. 1 % agarózový (molekulárna biologická trieda) gél TBE s obsahom 0,1 µg/ml etidíumbromidu.
11. Nanášací tlmivý roztok
12. Marker PCR vhodný na pokrytie rozsahu 300 – 1 300 bp
13. Presvecovač UV

### Purifikácia výrobku PCR

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT®, kat. č. 78200 pre 100 reakcií alebo Illustra™ ExoProStar™, kat. č. US77702 pre 100 reakcií)
15. 2 mM MgCl<sub>2</sub> (predáva spoločnosť CareDx Pty Ltd, kód produktu MgCl<sub>2</sub>-1.0(50) alebo MgCl<sub>2</sub>-1.0(3000))
16. Trepáčka

**Používanie alternatívnych purifikačných techník PCR si vyžaduje schválenie zo strany používateľa pred ich použitím.**

## Sekvenčná reakcia

17. Sekvenčná súprava pomocou terminátor BigDye® v3.1 alebo v1.1, Applied Biosystems™ spoločnosti Life Technologies™.
18. 5× sekvenčný reakčný tlmivý roztok (CareDx Pty Ltd, kód produktu SEQ BUF-2.0(400) alebo SEQ BUF-2.0(5000)) alebo terminátor BigDye® v3.1 alebo v1.1 5 X sekvenčný tlmivý roztok, Applied Biosystems™ spoločnosti Life Technologies™.

## Purifikácia sekvenčných reakčných produktov

19. 125 mM EDTA, pH 8 (predáva spoločnosť CareDx Pty Ltd, kód produktu EDTA-3.0(200) alebo EDTA-3.0(5000)).
20. Čistý a 80 % etanol. Každý cyklus vyžaduje čerstvo pripravený 80 % etanol s obsahom čistého etanolu a sterilnej vody. **NEPOUŽÍVAJTE DENATUROVANÝ ETANOL** (tiež známy v niektorých krajinách ako denaturovaný alkohol).

**Používanie alternatívnych sekvenčných purifikačných techník vyžaduje schválenie zo strany používateľa pred ich použitím.**

## Denaturalizácia a elektroforéza sekvenčných reakčných produktov

21. Fomamid Hi-Di™, divízia Applied Biosystems™ spoločnosti Life Technologies™, kód produktu 4311320
22. Automatické zariadenie na sekvenovanie DNA a príslušenstvo (napr. Applied Biosystems™ spoločnosti Life Technologies™ ABI Prism® 3730) vrátane zhromažďovania údajov a softvéru.

Tieto súpravy boli testované a schválené pre kapilárne sekvenčné zariadenia Applied Biosystems™ spoločnosti Life Technologies™ 3100, 3730 a 3730xl a softvér.

**Používanie iných denaturalizačných techník a sekvenčných platforiem vyžaduje schválenie zo strany používateľa pred ich použitím.**

23. Analytický softvér na sekvenovanie HLA (napr. ASSIGN™ SBT, verzia 4.7 alebo novšia, CareDx Pty Ltd).

## Požiadavky na vzorky

1. Sterilná voda (negatívna/kontrola bez templátu)
2. Ľudská genómová DNA s vysokou molekulárnou hmotnosťou (rozsah koncentrácie 20 – 100 ng/μl v tlmivom roztoku Tris/EDTA a  $OD_{260/280} > 1,8$ ), extrahovaná zo vzoriek celej krvi antikoagulovanej ACD alebo EDTA. **NEPOUŽÍVAJTE** vzorky celej krvi obsahujúce heparín.

**Používaná metóda na izoláciu DNA vyžaduje schválenie zo strany používateľa pred jej použitím.**

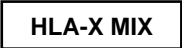
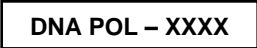




## Varovania a bezpečnostné opatrenia

- Túto súpravu musí používať vyškolený a oprávnený laboratórny personál.
- So všetkými vzorkami, zariadeniami a reagensiami sa musí manipulovať v súlade s dobrými laboratórnymi praktikami. Predovšetkým všetok patientsky materiál sa musí považovať za potenciálne infekčný. Dôrazne sa odporúča používať rukavice a laboratórne plášte. So všetkými vzorkami manipulujte a likvidujte ich v súlade s lokálnymi a národnými regulačnými predpismi.
- V žiadnej zložke týchto súprav sa NENACHÁDZAJÚ žiadne nebezpečné látky.
- NEPOUŽÍVAJTE reagentie po dátume ich expirácie.
- NEODPORÚČA sa používať zložky súprav z rôznych šarží súprav. V danom prípade by mohlo dôjsť k ovplyvneniu účinnosti testu.
- NEODPORÚČA sa používať reagentie, ktoré nie sú súčasťou tejto súpravy alebo ktoré nie sú uvedené v časti „Nedodané materiály, reagentie a zariadenia“ (napr. alternatívne polymerázy *Taq* DNA). V danom prípade by mohlo dôjsť k ovplyvneniu účinnosti testu.
- Dbajte na to, aby sa predišlo krížovej kontaminácii vzoriek DNA. Vymeňte hroty medzi vzorkami DNA.
- Aktivity pred a po PCR musia byť bezpodmienečne fyzicky oddelené. Používajte špecificky určené zariadenie, reagentie a laboratórne plášte.
- Etidiumbromid je potenciálne karcinogénny. Pri príprave a manipulácii s gélni sa vždy musia používať ochranné rukavice. Etidiumbromidové gély a tlmivé roztoky likvidujte v súlade s lokálnymi a národnými predpismi.
- Pri zobrazovaní a fotografovaní agarózových gélov pod UV svetlom sa vždy vyhýbajte priamej expozícii a používajte vhodnú ochranu tváre blokujúcu UV, jednorazové rukavice a laboratórne plášte.

## Symbole

Používajú sa nasledujúce neštandardné symboly:

Symbol	Opis
	Zmes PCR špecifická pre lokus
	Polymeráza DNA
	Priamy sekvenčný primer pre exón 1 HLA-A. Informácie o iných sekvenčných primeroch nájdete v časti „Zloženie súpravy“ a v tabuľke 4.
	Dátum výroby (vyžadujte sa pre trhy mimo EÚ).

# Metóda

## 1. PCR

- 1.1. Pre každý lokus, ktorý sa má amplifikovať, ako aj pre každú individuálnu vzorku, ktorá sa má testovať, bude potrebné nastaviť samostatnú reakciu PCR. Každý cyklus musí zahŕňať vhodné pozitívne kontrolné vzorky známeho genotypu a minimálne jednu negatívnu kontrolnú vzorku pre každý lokus, ktorý sa má amplifikovať.
- 1.2. Pripravte čerstvý roztok hlavnej zmesi PCR pri každej realizácii PCR. Rýchlo pri izbovej teplote rozmrazte zmes PCR špecifickú pre lokus. Po rozmrazení krátko zmiešajte vortexovaním.
- 1.3. Požadovaný objem zmesi PCR a polymerázy DNA nadávajte do sterilnej skúmavky pre počet vzoriek, ktoré sa majú testovať (pozrite tabuľku 1 uvedenú nižšie, kde sú uvedené objemy daných reakcií). Roztok 3- až 4-krát zmiešajte pulzným vortexovaním.

Lokus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Zmes PCR špecifická pre lokus	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16,7 $\mu$ l	16,7 $\mu$ l	16,7 $\mu$ l
napr. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">HLA-A MIX</span>						
Polymeráza DNA	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
napr. <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">DNA POL – HLA-A</span>						

**Tabuľka 1: Zloženie hlavnej zmesi potrebnej pre vzorku.**

- 1.4. 17 $\mu$ l hlavnej zmesi nadávajte do každej reakčnej jamky.
- 1.5. Do každej reakčnej jamky pridajte 3 $\mu$ l vzorky DNA alebo vhodnej pozitívnej kontrolnej vzorky. Do reakčnej jamky s negatívnou kontrolnou vzorkou pridajte 3 $\mu$ l sterilnej vody.
- 1.6. Reakčné jamky utesnite. Jemne zmiešajte vortexovaním a krátko centrifúgujte.
- 1.7. Reakčné jamky vložte do termálneho cykléra a spustite cyklus v súlade s nižšie uvedenými podmienkami termálneho cykléra.

95 °C – 10 min.  
96 °C – 20 s  
60 °C – 30 s  
72 °C – 3 min.  
15 °C – skladovanie

} 33 cyklov

- 1.8. Kompletná amplifikácia trvá približne 2,5 hodiny.
- 1.9. Po ukončení PCR odstráňte reakčné jamky/platničky z termálneho cykléra a rovno pristúpte ku gélovej elektroforéze alebo ich skladujte pri teplote 4 °C dovtedy, kým sa to vyžaduje.

**POZNÁMKA:** Purifikácia amplikónov spracovaním ExoSAP by sa mala vykonať do 24 hodín od ukončenia PCR.

## 2. Elektroforéza v agarózovom géli

- 2.1. Úspešnú amplifikáciu pomocou elektroforézy v agarózovom géli potvrdíte pomocou 2 µl každého produktu PCR skombinovaného s 5 µl nanášacieho tlmivého roztoku (alternatívne objemy nanášacieho tlmivého roztoku musia byť schválené pred použitím). Odporúča sa používať 1 % agarózový gél.
- 2.2. Počet a očakávané veľkosti výsledných amplikónov sa budú líšiť v závislosti od lokusu a vzorky genotypu. Očakávané veľkosti amplikónov PCR sú uvedené v tabuľke 2.

Lokus	Očakávané veľkosti prúžkov
HLA-A	≈ 2 kbp
HLA-B	≈ 2 kbp
HLA-C	≈ 1,1 kbp a 1,4 kbp
HLA-DRB1	≈ 450 bp – 850 bp (HH-PD5.2-5) ≈ 630 bp – 980 bp (LG-PD5.2-7) Vzor prúžkov sa bude líšiť v závislosti od prítomnosti špecifických skupín alel.
HLA-DQB1	≈ 300 bp a 500 bp (PQ-PD6.2-2) ≈ 400 bp a 500 bp (AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp (HH-PD10.1) ≈ 400 bp, ≈ 780 bp a ≈ 1470 bp (KD-PD10.2-1)

Tabuľka 2: Očakávané veľkosti produktov pre každý test.

## 3. Purifikácia výrobku PCR

**POZNÁMKA:** Purifikačné systémy iné ako ExoSAP-IT® alebo ExoProStar™ (napr. Agencourt® AMPure® XP alebo systémy založené na stĺpcoch) sa môžu používať na purifikáciu týchto produktov PCR. Dôrazne sa odporúča, aby používatelia schválili tieto metódy pred ich použitím. Ak sa má používať spracovanie ExoSAP, odporúča sa, aby používatelia dodržiavali nižšie uvedený postup.

- 3.1. Pripravte hlavnú zmes s obsahom 4 µl prípravku ExoSAP-IT® alebo ExoProStar™ a 8 µl prípravku 2 mM MgCl<sub>2</sub> pre vzorku, ktorá sa má purifikovať. Jemne zmiešajte impulzným vortexovaním. Do každej reakčnej jamky každej reakčnej vzorky nadávajte 12 µl hlavnej zmesi. Jamky utesnite, zmiešajte vortexovaním a potom buď vložte do trepačky, alebo jemne zmiešajte vortexovaním počas 2 minút. Pred vložením do termálneho cykléra krátko centrifugujte. Termálny cyklér spustíte v súlade s nasledujúcim profilom:

37 °C – 30 min.  
80 °C – 15 min.  
4 °C – skladovanie

- 3.2. Po ukončení purifikovaný produkt rozriedzte sterilnou vodou v pomere 1 : 4. Táto etapa riedenia zaručí, že existuje dostatočný templát na vykonanie sekvenčných reakcií, ako aj to, že koncentrácia templátu je dostatočná na generovanie sekvenčných údajov dobrej kvality.

**POZNÁMKA:** Môže sa vyžadovať vysoký faktor riedenia (napr. 1 : 8), ak sa konštantne zisťujú vysoké signály, príslušný šum a artefakty. Slabšie produkty PCR môžu vyžadovať nižší faktor riedenia.

3.3. Vzorky spracované pomocou ExoSAP sa môžu skladovať pri 4 °C dovedy, kým nebudú pripravené na použitie. Tieto vzorky sa môžu skladovať pri teplote 4 °C maximálne jeden týždeň pred použitím, ale dlhodobo<sup>9</sup> sa môžu skladovať pri teplote -20 °C.

#### 4. Sekvenčná reakcia

**POZNÁMKA:** V prípade, že sa musia vyriešiť heterozygotné nejednoznačnosti s hemizygotnými sekvenčnými primermi, ako napríklad HARPS<sup>®</sup>, pozrite si návod na použitie OLERUP SBT™ HARPS<sup>®</sup>.

4.1. V tabuľke 3 sa nachádzajú sekvenčné primery, ktoré sa majú používať pre každý 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		
Alebo		Alebo		Alebo	
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>	

**Tabuľka 3: Sekvenčné primery dodané na použitie pre každý lokus.**

<sup>†</sup>RB-TG344-R je HARP<sup>®</sup> určený pre dimorfizmus kodónu 86. Jeho použitie je voliteľné.

<sup>\*</sup>PB-AG341-R je HARP<sup>®</sup> určený pre dimorfizmus kodónu 85 v DPB1. Jeho použitie je tiež voliteľné.

^DRB1EX3R-2 je sekvenčný primer DRB1 v súpravách HH-PD5.2-5, ktorý funguje podobne ako HARP a je určený na sekvenovanie nasledujúcich skupín alel: \*3, \*8, \*11, \*12, \*13, \*14, \*15 a \*16. Tento primer bude generovať buď heterozygotné, hemizygotné, alebo žiadne sekvenčné údaje v závislosti od genotypu vzorky, ktorá sa typizovala. Pri analýze údajov DRB1EX3R-2 v ASSIGN™ v porovnaní s referenciou DRB1-FullX2 sa výsledné údaje exónu 3 budú analyzovať v samostatnej vrstve a povolia rozlíšenia počtu nejednoznačných alel v exóne 3, ako napríklad nejednoznačnosť DRB1\*14:01 vs. \*14:54. Jeho použitie je voliteľné v závislosti od stratégie typizácie používanej v laboratóriu. Toto neplatí pre súpravy LG-PD5.2-7, pretože je k dispozícii dvojsmerné sekvenovanie pre exón 3.

4.2. Pri vykonávaní každej sekvenčnej reakcie pripravte čerstvý roztok zmesi sekvenčného primeru na ľade. Zloženia a objemy zmesi sú uvedené nižšie pre **každú vzorku**.

Zložka	Objem
Sekvenčný primer	2 µl
Sterilná voda	11,5 µl
Terminátory BigDye®	1 µl
Tlmivý roztok 5x Seq Rxn	3,5 µl

4.3. Opatrne premiešajte každú sekvenčnú reakčnú zmes impulzným vortexovaním.

4.4. Do každej vhodnej reakčnej jamky nadávajte 18 µl sekvenčnej reakčnej zmesi.

**POZNÁMKA:** Pri cykloch, ktoré vyžadujú malý počet vzoriek s mnohými sekvenčnými primermi, je prijateľné nadávkať sekvenčný primer (2 µl) priamo do individuálnych reakčných jamiek. Následne je možné vytvoriť hlavnú zmes zloženú zo sterilnej vody, terminátora BigDye® a tlmivého roztoku 5x Seq Rxn, z ktorej sa musí do každej reakčnej jamky nadávkať 16 µl. Dôrazne sa odporúča, aby používateľ pred implementáciou schválil používanie tejto alternatívnej metódy.

4.5. Do každej reakčnej jamky pridajte 2 µl purifikovaného produktu PCR.

**POZNÁMKA:** Postupujte opatrne, aby sa predišlo krížovej kontaminácii sekvenčných reakcií.

4.6. Reakčné jamky utesnite, opatrne zamiešajte a krátko odstredujte, aby sa zaručilo, že obsah sa nachádza na dne každej reakčnej jamky.

4.7. Reakčné jamky vložte do termálneho cykléra a spustite cyklus v súlade s nasledujúcim profilom:

Počet cyklov	Teplota a čas
25	96 °C – 10 s 50 °C – 5 s 60 °C – 2 min.
1	4 °C – skladovanie

4.8. Po ukončení programu odstráňte reakčné jamky/platničky z termálneho cykléra a buď rovno pristúpte k purifikácii reakčných produktov, alebo ich skladujte na tmavom mieste pri teplote 4 °C dovtedy, kým je to potrebné. Odporúča sa, aby sa vzorky purifikovali a spracovali v zariadení na sekvenovanie DNA do 24 hodín.



## 5. Purifikácia sekvenčných reakčných produktov

**POZNÁMKA:** Purifikácia reakčných produktov sa môže realizovať aj pomocou iných metód, ako je tu opísaná metóda etanolovej precipitácie. Dôrazne sa odporúča, aby používatelia schválili tieto metódy pred ich použitím.

- 5.1. Reakčné jamky/platničky krátko centrifúgujte pred ich spracovaním. Ak sa počas cyklu termálneho cykléra používali opakovane použiteľné veká/uzávery, veká/uzávery označte, aby sa predišlo krížovej kontaminácii.
- 5.2. Opatrne odstráňte tesnenia.
- 5.3. Do každej reakčnej jamky pridajte 5 µl prípravku 125 mM EDTA, pH 8. Dbajte na to, aby sa prípravok EDTA dostal na dno reakčnej jamky.
- 5.4. Do každej reakčnej jamky pridajte 60 µl 100 % etanolu. Jamky/platničky utesnite a krátko, no dôkladne zmiešajte vortexovaním, aby sa zaručilo dôkladné premiešanie.
- 5.5. Extenčné produkty centrifúgujte 45 minút pri 2 000 x g. **OKAMŽITE PREJDITE NA ĎALŠIU ETAPU.** V prípade, že to nie je možné, znova centrifúgujte ďalších 10 minút pred pokračovaním.
- 5.6. Z reakčných jamiek odstráňte tesnenia a supernant zlikvidujte otočením reakčných jamiek na papierovú utierku alebo vreckovku.
- 5.7. Invertované reakčné jamky a papierové utierky alebo vreckovky dajte do centrifúgy. Centrifúgujte 1 minútu pri 350 x g s cieľom odstránenia zvyšného supernantu.
- 5.8. Reakčné jamky odstráňte z centrifúgy a položte ich v kolmej polohe na pracovný stôl. Zlikvidujte papierové utierky alebo vreckovky.
- 5.9. Pripravte čerstvý roztok 80 % etanolu s čistým etanolom a sterilnou vodou.
- 5.10. Do každej jamky pridajte 60 µl 80 % etanolu. Jamky znova utesnite a krátko zamiešajte vortexovaním.
- 5.11. Centrifúgujte 5 minút pri 2 000 x g.
- 5.12. Zopakujte kroky 5.6 a 5.7.
- 5.13. Reakčné jamky vyberte z centrifúgy a zlikvidujte papierovú utierku. Znova utesnite reakčné jamky a pristúpte k denaturalizačnému kroku. V opačnom prípade skladujte pri teplote -20 °C na tmavom mieste<sup>10</sup>. Odporúča sa, aby sa extenčné produkty spracovali v zariadení na sekvenovanie DNA do 24 hodín po nastavení sekvenčných reakcií.

## 6. Denaturalizácia a elektroforéza sekvenčných reakčných produktov

**POZNÁMKA:** Metóda denaturalizácie extenčných produktov vo formamide Hi-Di™ opísaná v tomto dokumente nemusí byť potrebná, ak sa používali iné metódy purifikácie ako etanolová precipitácia. Dôrazne sa odporúča, aby používatelia schválili alternatívne metódy pred pokračovaním.

- 6.1. Do každej reakčnej jamky pridajte 12 µl formamidu Hi-Di™. Jamky/platničky krátko vortexujte a centrifúgujte.

6.2. Reakčné jamky inkubujte 5 minút pri 98 °C. Po inkubácii zaručte, aby sa reakčné jamky rýchlo schladili na izbovú teplotu (napr. položte ich na ľad alebo použite termálny cyklér na vykonanie denaturácie a chladenia) pred ich umiestnením do zariadenia na sekvenovanie. Po opätovnej resuspendácii vzorky do formamidu Hi-Di sa odporúča, aby sa okamžite vložila do prístroja. Vzorka bude v prístroj stabilná 24 hodín<sup>8</sup>.

**POZNÁMKA:** Zaručte, aby sa v reakčných jamkách nenachádzali žiadne vzduchové bubliny. Mohli by vojsť do kapilár a poškodiť ich.

6.3. Reakčné jamky/platničky vložte do automatického zariadenia na sekvenovanie a pripravte súbor na zhromažďovanie údajov v súlade so špecifikáciami výrobcu zariadenia na sekvenovanie.

6.4. Nasledujúce parametre prístroja boli schválené výrobcom pri používaní sekvenčnej súpravy s terminátorom Big Dye<sup>®</sup> v3.1 a POP-7<sup>™</sup>. Tieto parametre môžu vyžadovať schválenie zo strany používateľa pre ostatné polyméry, sekvenčné chemické látky a prístroje. Podrobný návod a pokyny nájdete v príslušnej používateľskej príručke prístroja (napr. zaručte, aby nastavenia súpravy farbiva boli vhodné pre používané chemické látky, napríklad sekvenčná chemická látka s terminátorom v1.1 Big Dye<sup>®</sup> vyžaduje inú súpravu farbiva).

Parameter	Nastavenie
Súprava farbiva	Z_BigDyeV3
Súbor mobility	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Modul cyklu	Regular FastSeq50_POP7
Čas vstrekovania	15 s
Čas cyklu	3 000 s

6.5. Použite softvér na zhromažďovanie údajov s cieľom spracovania nespracovaných zhromaždených údajov a na vytvorenie sekvenčných súborov. Podrobný návod a pokyny nájdete v príslušnej používateľskej príručke prístroja.

## 7. Úprava a analýza elektroferogramov

Súpravy OLERUP SBT<sup>™</sup> sú navrhnuté, určené a schválené na používanie so softvérom OLERUP ASSIGN<sup>™</sup> SBT vytvoreným spoločnosťou CareDx Pty Ltd. Používateľom sa odporúča, aby používali softvér ASSIGN<sup>™</sup> SBT verzie 3.6+ a novšej (ASSIGN<sup>™</sup> SBT V4.7 alebo OLERUP ASSIGN<sup>™</sup> SBT V471), pretože tieto verzie softvéru používajú nastavenia a referenčné súbory špeciálne určené pre typizáciu súpravy OLERUP SBT<sup>™</sup> a HARPS<sup>®</sup>. Podrobnosti o používaní týchto softvérov nájdete v príslušných používateľských príručkách dostupných na prebratie na webovej lokalite spoločnosti CareDx (<http://www.CareDx.com>).

Sekvenovanie založené na údajoch typizácie vygenerovaných pomocou súprav OLERUP SBT<sup>™</sup> na typizáciu sa musia analyzovať v porovnaní s nasledujúcimi referenčnými súborami ASSIGN<sup>™</sup> SBT, ktoré poskytuje spoločnosť CareDx Pty Ltd:

Test	Kód produktu	Referenčný súbor ASSIGN
OLERUP SBT <sup>™</sup> 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 or 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

---

## Výkonnostné vlastnosti

### Presnosť

Panely s maximálne 93 vzorkami z programu výkonového testu UCLA International DNA Exchange (2008 – 2010) použitými na interné testovanie pre súpravy OLERUP SBT™ poskytli nasledujúce výsledky:

Lokus	Počet testovaných vzoriek	Diagnostická citlivosť (% úspešných PCR)	Diagnostická špecifickosť (% získaných genotypov)	Počet nezhodných vzoriek	Počet heterozygotných vzoriek	Počet jedinečných alel
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

\* Dve nezhodné vzorky obsahovali informácie o doplnkovej sekvencii mimo exónu 2, ktoré neboli hlásené programom výkonového testu UCLA International DNA Exchange. Jedna vzorka obsahovala 131:01, ale bola nahlásená ako 13:01 programom výkonového testu UCLA International DNA Exchange. Alely sa líšili pri exónoch 3 a 4. Iná alela obsahovala 107:01, ale bola nahlásená ako 13:01 programom výkonového testu UCLA International DNA Exchange. Tieto alely sa líšili pri exóne 1.

Pokiaľ ide o súpravy OLERUP SBT™ HLA-DRB1 (kód produktu LG-PD5.2-7), pri internom testovaní sa používal panel 23 dobre charakteristických vzoriek, ktoré pokrývajú širokú škálu alel. Okrem toho sa typizácia realizovala aj na paneli s 293 externe získanými vzorkami bez *a priori* v znalosti iných údajov o typizácii HLA. Tieto vzorky sa tiež testovali pomocou testu OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2) V týchto prípadoch sa dosiahli homozygotné výsledky, analyzovala sa asociácia DQB1/DRB1 týchto vzoriek, aby sa potvrdil výsledok a zdetegovali prípady, keď mohli chýbať údaje o alelách.

Z testovania vyplynuli nasledujúce výsledky:

Lokus	Počet testovaných vzoriek	Diagnostická citlivosť	Diagnostická špecifickosť	Počet nezhodných vzoriek	Počet heterozygotných vzoriek	Počet jedinečných alel
HLA-DRB1	23	100 %	100 %	0	23	12
	286*	97,9 %	99,6 %	0	253	33

\* Šesť vzoriek sa nedokázalo amplifikovať kvôli slabej kvalite vzoriek DNA. Zistilo sa, že jedna vzorka obsahovala kontaminovanú DNA, ktorej zdroj bol v laboratóriu, kde sa získavali vzorky. Kvôli kontaminácii nebolo možné zo vzorky získať genotyp.

Sekvenčná analýza PCR, miesta sekvenčných primerov a štúdie na hodnotenie výkonnosti neidentifikovali žiadne spoločné a dobre dokumentované alely, ktoré neboli amplifikované odporúčaným spôsobom používania týchto súprav. Podrobnejšie informácie nájdete v dokumente *OLERUP SBT™ Primer Analysis*, ktorý je dostupný pre každé referenčné vydanie OLERUP ASSIGN™ SBT a ktorý si môžete prebrať z webovej lokality CareDx (<http://www.CareDx.com>).

## Detekčné limity

Odporúčaná koncentrácia ľudskej genómovej DNA s vysokou molekulárnou hmotnosťou 20–100 ng/μl. Z interného testovania vyplýva, že sa môžu používať aj vzorky s koncentraciami nižšími ako 5 ng/μl. Správne genotypy sa získali aj z DNA slabej alebo narušenej kvality.

## Špecifickosť

Súpravy OLERUP SBT™ spoločnosti CareDx Pty Ltd predstavujú testy špecifické pre daný lokus. Používanie súprav v súlade s týmito pokynmi môže amplifikovať iba jeden lokus. Vo väčšine prípadov sa pri používaní sekvenčných primerov zahrnutých v každej súprave vytvorí typizácia HLA pre väčšinu vzoriek bez potreby ďalšieho rozlíšenia. V týchto prípadoch, kde sa i naďalej zaznamenávajú heterozygetné nejednoznačnosti, sa odporúča používať rozlišovacie sekvenčné primery (ako napríklad OLERUP SBT™ HARPS®).

Je potrebné poznamenať, že v oblastiach amplifikácie alebo sekvenovania primerov sa môžu objaviť mutácie a tie môžu spôsobiť chýbajúce informácie o alelách. Vzorky, ktoré poskytujú homozygotné výsledky typizácie, sa musia potvrdiť alternatívnymi metódami.

## Interferujúce látky

Spoločnosť CareDx Pty Ltd identifikovala dobre známe potenciálne interferujúce látky, ktoré môžu ovplyvniť test. Pozrite tabuľku nižšie.

Inhibítor	Potenciálny zdroj	Riziko	Poznámky
EDTA	Tlmivý roztok TE, skúmavku na odber krvi	Veľmi nízke	DNA resuspendovaná v Tris-HCl pH8 alebo TE s < 1 mM EDTA. Používajte komerčne dostupné súpravy na prípravu DNA krvi a/alebo vyhýbajte sa používaniu skúmaviek EDTA na odber krvi.
Alkoholy	Etanol, izopropanol, izoamyl alkohol	Nízke	Zaručte, aby sa pelety alebo guľôčky DNA vysušili na vzduchu a vizuálne skontrolujte kvapôčky etanolu (1 % etanol = 1,25 μl 80 % etanolu v 100 μl reakcie PCR).
Nadmerné množstvo soli	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Veľmi nízke	Zaručte dôkladné prepláchnutie peliet alebo guľôčok DNA v 80 % etanole. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 230/260 ~2.
Chaotropické soli	Guanídiinium Cl; MgCl <sub>2</sub> ; urea	Veľmi nízke	Zaručte dôkladné prepláchnutie peliet alebo guľôčok DNA v 80 % etanole. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 230/260 ~2.
Fenol: chloroform	Organický prenos	Veľmi nízke	Komponent často používaných a komerčne dostupných extrakčných metód Trizol DNA. Zaručte dôkladné

Inhibítor	Potenciálny zdroj	Riziko	Poznámky
			prepláchnutie peliet alebo guľôčok DNA v 80 % etanole. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 230/260 ~2.
Proteíny	BSA, PEG, krvný albumín	Veľmi nízke	Použite komerčne dostupné súpravy na príkladu DNA krvi. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 260/280 > 1,8.
Heme, hemoglobín, imunoglobulíny	Krv	Veľmi nízke	Nepoužívajte krvné vzorky, ktoré sa vyznačujú veľkou hemolýzou. Použite komerčne dostupné súpravy na príkladu DNA krvi. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 260/280 > 1,8.
Detergenty/DDT	Deoxicholát sodný, sarkosyl, SDS, NP40, Twin 20, Triton X-100, N-oktyl glukozid	Veľmi nízke	Zaručte dôkladné prepláchnutie peliet alebo guľôčok DNA v 80 % etanole. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 230/260 ~2.
Proteázy	Proteáza K, manipulácia so vzorkami	Veľmi nízke	Použite komerčne dostupné súpravy na prípravu DNA krvi alebo slín. Vždy používajte rukavice.
Nukleázy	Manipulácia so vzorkami, reštrikčné enzýmy, mikrokokálna nukleáza	Veľmi nízke	Použite komerčne dostupné súpravy na príkladu DNA krvi. Vždy používajte rukavice.
Exogénna DNA/RNA	Prenos, kontaminácia	Veľmi nízke	Prípravte genómovú DNA v špecifickom prostredí pred PCR
Prenášače	RNA, heparín, glykogén	Veľmi nízke	Použite komerčne dostupné súpravy na prípravu DNA krvi a/alebo vyhýbajte sa používaniu skúmaviek na odber krvi s heparínom.
Nadmerné množstvo iónov kovu	Mg <sup>2+</sup> z tlmivého roztoku PCR, ióny Fe	Veľmi nízke	Zaručte dôkladné prepláchnutie peliet alebo guľôčok DNA v 80 % etanole. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 230/260 ~2.
Antivirálné lieky (napr. acyklovir)	Krv	Veľmi nízke	Použite komerčne dostupné súpravy na príkladu DNA krvi. Zaručte, aby sa dosiahla genómová DNA s OD 260/280 > 1,8.
Púdrované rukavice	Púdrované rukavice	Veľmi nízke	Používajte rukavice bez púdrov.
Skúmavky PCR ožiarené UV	UV úprava skúmaviek PCR	Veľmi nízke	Vyhýbajte sa úprave UV plastových nádob.

## Obmedzenia a upozornenia

- Dôrazne sa odporúča, aby tieto súpravy schválil používateľ pred ich implementáciou v laboratóriu pomocou vzoriek, ktorých typ HLA bol určený inými molekulárnymi metódami. Predovšetkým akékoľvek odchýlky od tejto metódy (napr. používanie alternatívnych sekvenčných purifikačných metód PCR alebo DNA) musí schváliť používateľ pred ich implementáciou.
- Tieto súpravy boli schválené panelmi vzoriek, ktorých genotypy pokrývajú širokú škálu alel. Avšak je potrebné poznamenať, že v miestach amplifikácie a sekvenovania

primerov je možné zistiť zriedkavé alely a alely s polymorfizmami a tie sa nemusia amplifikovať ani sekvenovať.

- Princíp typizácie HLA založený na sekvenovaní spočíva v tom, že faktory iné ako zmesi PCR môžu spôsobiť preferenčnú amplifikáciu alebo neposkytnú dostatok údajov o alelách. V dôsledku toho je potrebné potvrdiť zdanlivé homozygotné výsledky typizácie pomocou alternatívnych metód a/alebo genotypizácie skupín.
- Súčasťou každého cyklu PCR musí byť pozitívna kontrolná vzorka (ľudská DNA) aj negatívna kontrolná vzorka (sterilná voda). Pozitívna kontrolná vzorka musí generovať produkt PCR vhodnej veľkosti v závislosti od amplifikovaného miesta a výsledná sekvencia musí byť v súlade s genotypom vzorky. Pri žiadnom experimente sa v negatívnej kontrolnej vzorke templátu nesmú nachádzať žiadne produkty PCR. Ak je prúžok evidentný, ku kontaminácii mohlo dôjsť na niektorej úrovni a cyklus bude potrebné zopakovať.
- Niekedy môžu byť evidentné doplnkové, slabšie produkty PCR. Tieto doplnkové prúžky neinterferujú s výsledkami ani kvalitou sekvencie.

## Licencia

Súpravy OLERUP SBT™ obsahujú hot-start polymerázu GoTaq® (DNA POL), ktorú vyrába spoločnosť Promega Corporation a distribuuje spoločnosť CareDx Pty Ltd. Licenciu má na ňu spoločnosť Promega na základe patentu USA č. 5, 338, 671 a 5, 587, 287 a ďalších príslušných zahraničných patentov.

## Literatúra

1. Sayer D, Whidborne R, Brestovac B, Trimboli F, Witt C, Christiansen F (2001): *HLA-DRB1 DNA sequencing based typing: an approach suitable for high throughput typing including unrelated bone marrow registry donors*. Tissue Antigens **57**: 46-54.
2. Sayer D, Whidborne R, DeSantis D, Rozemuller EH, Christiansen F, Tilanus MG (2004). *A multicentre international evaluation of single-tube amplification protocols for sequencing-based typing of HLA-DRB1 and HLA-DRB3, 4, 5*. Tissue Antigens **63**: 412-423.
3. *ASSIGN™ SBT v3.6+ Operator Manual, CareDx Pty Ltd*
4. *ASSIGN™ SBT v4.7 Operator Manual, CareDx Pty Ltd*
5. *OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Operator Manual, CareDx Pty Ltd*
6. Viac informácií o programe UCLA DNA Exchange Program nájdete na adrese: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Aktuálne alely HLA nájdete na adrese <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.
8. Webová lokalita Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/search/results?query=4311320&persona=DocSupport&type=Product+FAQs>, Answer Id: E15311)
9. Aktuálne protokoly molekulárnej biológie (2001)3, jednotka 15.2.5
10. Webová lokalita 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 *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 (pozrite aj citácie v tomto dokumente)
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 (pozrite aj citácie v tomto dokumente)
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*



## Riešenie problémov

Problém	Možné príčiny	Riešenie
Žiaden alebo slabý produkt PCR	Nízka kvalita DNA	Zhodnoďte kvalitu DNA pomocou gélovej elektroforézy. Neporušená DNA musí byť približne 3 kb s malým alebo žiadnym znečistením gélu. Znova extrahujte DNA, a ak je to možné, zopakujte PCR.
	Nedostatočné množstvo DNA pridané do PCR.	Skontrolujte, či sa koncentrácia DNA nachádza v rozmedzí 20 – 100 ng/μl. Znova extrahujte DNA, a ak je to možné, zopakujte PCR.
	Prítomnosť inhibítorov PCR v genómovej DNA.	Inhibítory PCR sú prítomné vo všetkých telesných tekutinách vrátane krvi, séra a plazmy. Inhibítory PCR predstavujú rôzne skupiny látok s rôznymi vlastnosťami a mechanizmami reakcie. Najčastejšie inhibítory v krvi sú hemoglobín, IgG a laktoferín. Okrem toho hormóny alebo antivirálne látky, ako je napríklad acyklovir, ako aj niektoré antibiotiká môžu ovplyvniť amplifikáciu génu <sup>12, 13</sup> . Nepoužívajte vzorky celej krvi s obsahom heparínu. Špecifikácie nájdete v referenčných rukopisoch <sup>12, 13</sup> . EDTA: môže tiež ovplyvniť koncentrácie Mg <sup>2+</sup> a blokovať polymerázu DNA pri niektorých koncentráciách <sup>13</sup> . Vo všeobecnosti platí, že skúmavky s citrátom sodným poskytujú DNA vysokej kvality <sup>11</sup> . Metódy na extrakciu/purifikáciu DNA môžu účinne odstrániť inhibítory PCR. Zákazník by mal zhodnotiť metódy na extrakciu/purifikáciu DNA, aby sa zaručila purifikácia vzorky. Znova extrahujte DNA, a ak je to možné, zopakujte PCR.
	Polymeráza DNA nepridaná do hlavnej zmesi alebo nedostatočne zmiešaná hlavná zmes pred pridaním do vzoriek.	Zopakujte PCR. Zaručte, aby zložky hlavnej zmesi boli pridané a dostatočne premiešané vortexovaním.
	Problémy s termálnym cyklérom	Skontrolujte prevádzkové parametre termálneho cykléra Skontrolujte prevádzkovú históriu, aby sa zaručilo, že cyklus nebol predčasne ukončený. Zaručte, aby sa termálny cyklér používal v súlade so špecifikáciami výrobcu a bol pravidelne udržiavaný.
	Do gélu nebol pridaný žiaden etidiumbromid.	Gél ponorte do farbiaceho kúpeľa s obsahom 1X TBE s 0,5 mg/ml etidiumbromidu. Odfarbte v 1X TBE pred zosnímaním obrazu gélu. Zaručte, aby sa etidiumbromid pridal do gélu pred naliatím.
	Vzorky DNA sú	Kedykoľvek je to možné, používajte sterilnú

	vymyté alebo zriedené vo vode, ktorá môže mať mierne kyslé pH.	vodu s neutrálnym pH.
Žiaden alebo slabý produkt PCR pre prúžok exónov 3 – 5 pri teste KD-PD10.2-1	Nízka kvalita DNA	Amplifikácia vzoriek veľmi slabej kvality môže viesť k slabej amplifikácii amplikónu exónov 3 – 5. Typizácia sa stále môže dosiahnuť pomocou sekvenčných údajov exónov 1 a 2. Alternatívne znova extrahujte DNA, a ak je to možné, zopakujte PCR.
Nesprávna veľkosť prúžkov	Používanie nesprávnej súpravy	Skontrolujte, či sa používa vhodná súprava.
	Používanie nesprávneho programu termálneho cykléra.	Skontrolujte parametre termálneho cykléra.
	Kontaminácia PCR	Skontrolujte negatívnu kontrolnú vzorku, či nedošlo ku kontaminácii. Dekontaminujte pracovný priestor a zopakujte PCR. Zopakujte PCR s cieľom identifikácie zdroja kontaminácie. Zvážte použitie čerstvej súpravy. Ak sa zistí, že genómová DNA vzorky je kontaminovaná, znova extrahujte alebo získajte alternatívny zdroj DNA.
Stala intenzita signálu na elektroferogramoch	Slabý produkt PCR	Skontrolujte obraz gélu. NEODPORÚČA sa sekvenovať slabé prúžky PCR, pretože kvalita sekvencie nemusí byť dostatočná na SBT. Skúste po purifikácii PCR použiť nižší faktor riedenia (napr. 1 : 2, 1 : 3).
	Do zariadenia na sekvenovanie boli vložené nedostatočné reakčné produkty.	Skontrolujte parametre zariadenia na sekvenovanie. Možno bude potrebné zvýšiť čas vstrekovania a napätie.
	Problémy počas purifikácie produktov zariadenia na sekvenovanie	Buďte mimoriadne opatrní pri likvidácii supernantu, pretože sa môže vypudíť z pelety.
Intenzita signálu je veľmi vysoká (prítomnosť vysokofluorescenčných vrcholov – artefaktov)	Veľmi veľa produktu PCR	Skontrolujte obraz gélu. Po purifikácii PCR použite vyšší faktor riedenia. Skontrolujte množstvo polymerázy DNA použitej v PCR.
	Veľmi veľa reakčných produktov použitých v zariadení na sekvenovanie.	Skontrolujte parametre prístroja. Skúste skrátiť čas vstrekovania a napätie.
Základná línia zašumená (výrazné poradie)	Kontaminovaný produkt PCR	Pozrite si vyššie uvedené nápravné kroky.

	Amplifikácia veľmi blízka génom HLA	Skontrolujte parametre termálneho cykléra.
	Slabá purifikácia PCR	Zaručte, aby sa spracovanie pomocou ExoSAP vykonalo v súlade s používateľskou príručkou súpravy. Zaručte, aby sa zmes PCR dôkladne zmiešala pomocou ExoSAP Skúste použiť ExoSAP v súlade s postupmi výrobcov (zvýšte množstvo enzýmov) alebo použite alternatívnu techniku purifikácie.
	Kontaminované sekvenčné reakcie	Zaručte, aby sa všetky etapy vykonali tak, aby sa predišlo krížovej kontaminácii. V prípade potreby vymeňte hroty pipiet. Navrch reakčných jamiek pridajte kvapaliny. Vyhýbajte sa aerosólom.
	Kontaminovaný sekvenčný primer	Skontrolujte kvalitu sekvencie iných sekvenčných primerov a iných vzoriek pomocou rovnakého primeru. Skúste použiť čerstvý alikvót sekvenčného primeru.
	Kontaminovaná zmes terminátora farbiva alebo kontaminovaný sekvenčný tlmivý roztok.	Sekvenovanie zopakujte s čerstvým alikvótom reagensí.
	Slabá purifikácia sekvenčných produktov.	Sekvenovanie zopakujte a zaručte, aby sa purifikácia vykonala v súlade s pokynmi výrobcu.
Prítomnosť škvŕniak farbiva	Slabá purifikácia sekvenčných produktov	Vykonajte purifikáciu produktov v súlade s pokynmi na používanie súpravy. Zaručte, aby sa produkty dostatočne premyli v 80 % etanole.

## Podobné produkty

IVD označené CE:

**ASSIGN™ SBT 3.6+**                      Kód produktu: CGX0036+

**ASSIGN™ SBT v4.7**                      Kód produktu: CGX00470

**OLERUP ASSIGN™ SBT v471** Kód produktu: CGX00471

### OLERUP SBT™ HARPS®

Celý zoznam produktov nájdete v návode na použitie OLERUP SBT™ HARPS®.

Iba na výskumné účely:

### Súpravy na typizovanie HLA OLERUP SBT™

AN-PD11.0-0(20)      Súprava na HLA-DRB3 OLERUP SBT™ (20 a 50  
AN-PD11.0-0(50)      testov)

AN-PD12.0-0(20)	Súprava OLERUP SBT™ HLA-DRB4 (20 a 50 testov)
AN-PD12.0-0(50)	
AN-PD13.0-0(20)	Súprava OLERUP SBT™ HLA-DRB5 (20 a 50 testov)
AN-PD13.0-0(50)	
LC-PD2.9(20)	Súprava OLERUP SBT™ HLA-B57 (20 a 50 testov)
LC-PD2.9(50)	

Poznámka: Vyššie uvedené produkty sú licencované ako IVD v Austrálii.

## Laboratórne reagensie na všeobecné účely

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

Podrobnosti vám poskytne lokálny distribútor.



## Samohodnotiace súpravy:

HH-PD3.2-2(20)	Súprava OLERUP SBT™ HLA-C (20 a 50 testov)
HH-PD3.2-2(50)	
PQ-PD6.2-2(20)	Súprava OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (20 a 50 testov)
PQ-PD6.2-2(50)	
AN-PD6.2-3(20)	
AN-PD6.2-3(50)	
HH-PD10.1(20)	Súprava OLERUP SBT™ HLA-DPB1 (20 a 50 testov)
HH-PD10.1(50)	
KD-PD10.2-1(20)	
KD-PD10.2-1(50)	

## Kontaktné informácie

### Výrobca

CareDx Pty Ltd

PO Box 1294

Fremantle 6959

Západná Austrália

Austrália

Tel.: +61-08-9336-4212

E-mail: [orders-aus@caredx.com](mailto:orders-aus@ caredx.com)

Webová lokalita: [www.CareDx.com](http://www.CareDx.com)

Podrobnosti o podpore a objednávaní nájdete na webovej lokalite CareDx

(<http://www.caredx.com>).