

INNO-LiPA HLA-B Update Plus

IVD

Manufactured by:

INNOGENETICS N.V.
Technologiepark 6
9052 Ghent
Belgium
☎+32-9 329 13 29



Distributed by:

INNOGENETICS GmbH
Lembecker Straße 19
46359 Heiden (Westfalen)
Germany
☎+49-2867 99 07 0

INNOGENETICS s.a.r.l.
8, Rue du Maréchal de Lattre-de-Tassigny
59800 Lille
France
☎+33-1 49 93 26 18

INNOGENETICS S.r.l.
Via del Mare 36
00040 Pomezia (Roma)
Italy
☎+39-06 911 80 375

INNOGENETICS Diagnostica y Terapeutica
(IDT) S.A.
Calle Botánica 146
08908 Hospitalet de Llobregat (Barcelona)
Spain
☎+34-93 600 8000

INNOGENETICS N.V.
Technologiepark 6
9052 Ghent
Belgium
☎+32-9 329 13 29



TABLE OF CONTENTS

Symbols used	5
English	
Intended use	7
Test Principle	7
Reagents	8
Description, preparation for use and recommended storage conditions	8
Materials required but not provided	10
Safety and environment	10
Specimens	11
Manipulations procedures	11
Strip handling	11
Directions for manual incubation	11
Directions for manual changing liquid in the troughs	12
Remarks and precautions	12
Manual test procedure	12
Samples	13
Denaturation and hybridization	13
Stringent wash	13
Color development	14
Automated test procedure: <i>Auto-LiPA</i>	14
Results	15
Reading	15
Validation	15
Interpretation of results	16
Interpretation software: LiRAS™	16
Limitations of the procedure	16
Test performance	16
Test performance using DNA amplified with the HLA-B Multiplex Primer Solution	16
Test performance using DNA Amplified with the HLA-Bw4 Primer Solution	18
Français	
But du test	19
Principe du test	19
Réactifs	20
Description, préparation et conditions de conservation	20
Matériel nécessaire non fourni	22
Consignes de sécurité	22
Echantillons	23
Procédures de manipulation	23
Bandelettes	23
Directives pour incubation manuelle	24
Directives pour changement des solutions	24
Remarques et Précautions	24
Procédure manuelle	25
Echantillons	25
Dénaturation et hybridation	25
Lavage Stringent	26
Révélation	26
Procédure automatisée: <i>Auto-LiPA</i>	26
Résultats	27
Lecture	27

Validation	27
Interprétation	28
Logiciel d'interprétation: LiRAS™	28
Limites du test	28
Performances	28
Performance du test basée sur l'utilisation de la solution d'amorces multiplex HLA-B	28
Performance du test basée sur l'utilisation de la solution d'amorce HLA-Bw4	30
Deutsch	
Verwendungszweck	31
Funktionsweise des Tests	31
Reagenzien	32
Beschreibung, Vorbereitung und empfohlene Lagerung und Haltbarkeit	32
Zusätzliche benötigte Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind	34
Sicherheits- und Umwelthinweise	35
Herstellung der Proben	36
Handhabung	36
Handhabung der Teststreifen	36
Hinweise zur manuellen Inkubation	36
Anleitung für das manuelle Auswechseln der Flüssigkeit in den Wannen	37
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	37
Manuelles Testverfahren	37
Proben	37
Denaturierung und Hybridisierung	38
Stringent-Waschlösung-Schritt	38
Farbentwicklung	39
Automatisches Testverfahren: <i>Auto-LiPA</i>	39
Ergebnisse	39
Ablesen	39
Validierung	40
Interpretation der Ergebnisse	40
Interpretationssoftware: LiRAS™	41
Grenzen der Methode	41
Leistungsfähigkeit des Tests	41
Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit Hilfe der HLA-B Multiplex-Primerlösung amplifiziert wurde	41
Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit Hilfe der HLA-Bw4 Multiplex-Primerlösung amplifiziert wurde	43
Italiano	
Uso previsto	44
Principio del test	44
Reagenti	45
Descrizione, preparazione per l'uso e condizioni di conservazione raccomandate	45
Materiali richiesti ma non forniti	47
Sicurezza e ambiente	47
Campioni	48
Procedure di manipolazione	48
Trattamento delle strisce	48
Indicazioni per l'incubazione manuale	49
Indicazioni per il cambio manuale del liquido nelle vaschette	49
Note e precauzioni	49
Procedura manuale del test	50
Campioni	50
Denaturazione e ibridazione	50
Lavaggio stringente	51

Sviluppo del colore	51
Procedura automatica del test: <i>Auto-LiPA</i>	52
Risultati	52
Lettura	52
Validazione	52
Interpretazione dei risultati	53
Software d'interpretazione: LiRAS™	53
Limiti della procedura	53
Performance del Test	53
Esecuzione del test usando DNA ottenuto con la Soluzione Primer HLA-B Multiplex	53
Esecuzione del test usando DNA ottenuto con la Soluzione Primer HLA-Bw4.	55
Español	
Uso al que está destinado	56
Principio del ensayo	56
Reactivos	57
Descripción, preparación para el uso y condiciones de almacenamiento recomendadas	57
Materiales necesarios pero no suministrados	59
Seguridad y medio ambiente	60
Muestras	60
Procedimientos de manipulación	61
Manipulación de tiras	61
Instrucciones para la incubación manual	61
Instrucciones para el cambio manual del líquido de las cubetas	61
Observaciones y precauciones	62
Procedimiento de ensayo manual	62
Muestras	62
Desnaturalización e hibridación	62
Lavado astringente	63
Revelado de color	63
Procedimiento de ensayo automatizado: <i>Auto-LiPA</i>	64
Resultados	64
Lectura	64
Validación	64
Interpretación de los resultados	65
Software de interpretación: LiRAS™	65
Limitaciones del procedimiento	65
Eficacia del ensayo	66
Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de primers HLA-B Multiplex	66
Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de primers HLA-Bw4.	67
Português	
Utilização	69
Princípio do teste	69
Reagentes	70
Descrição, preparação para utilização e condições de conservação recomendadas	70
Material necessário não fornecido	71
Segurança e ambiente	72
Amostras	73
Procedimentos de manipulação	73
Manipulação das tiras	73
Instruções para a incubação manual	73
Instruções para mudar manualmente o líquido nas cavidades	74

Observações e precauções	74
Procedimento para teste manual	74
Amostras	74
Desnaturação e hibridização	75
Lavagem rigorosa	75
Revelação da cor	76
Procedimento de teste automatizado: <i>Auto-LiPA</i>	76
Resultados	76
Leitura	76
Validação	77
Interpretação dos resultados	77
Software de interpretação: LiRAS™	78
Limites do procedimento	78
Desempenho do teste	78
Desempenho do teste utilizando ADN obtido com solução de iniciadores	
HLA-B Multiplex	78
Desempenho do teste utilizando ADN obtido com solução de iniciadores	
HLA-Bw4	80

Symbols used



Manufactured by
But du test
Hersteller
Prodotto da
Fabricado por



In vitro diagnostic medical device
Produit pour diagnostic *in vitro*
Hilfsmittel für die medizinische *in-vitro*-Diagnostik
Dispositivo medico - diagnóstico *in vitro*
Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Lot number
Réactifs
Chargennummer
Numero di lotto
Número de lote



Catalog number
Référence catalogue
Katalognummer
Codice
Número del catálogo
Número de catálogo



Use by
Matériel nécessaire non fourni
Verwendbar bis
Utilizzare entro
Para ser usado hasta
Usado por



Consult instructions for use
Consignes de sécurité
Für Anwendung siehe Gebrauchsanleitung
Consultare le istruzioni per l'uso
Consulte las instrucciones de uso
Consultar instruções de utilização



Temperature limits
 Limites de température
 Temperaturbereich
 Limiti di temperatura
 Límites de temperatura
 Limites de temperatura



Contains sufficient for < X > tests
 Conditionnement suffisant pour < X > tests
 Inhalt ausreichend für < X > Tests
 Contenuto sufficiente per < X > test
 Contenido suficiente para < X > ensayos
 Contém material suficiente para < X > testes

STRIPS 1

Strips 1
 Bandelettes 1
 Streifen 1
 Striscia 1
 Tiras 1

STRIPS 2

Strips 2
 Bandelettes 2
 Streifen 2
 Striscia 2
 Tiras 2

CONTROL LiPA

LiPA Control
 Contrôle LiPA
 LiPA-Kontrolle
 Controllo LiPA
 Control LiPA
 Controlo LiPA

DENAT SOLN

Denaturation Solution
 Solution de Dénaturation
 Denaturierungslösung
 Soluzione di Denaturazione
 Solución de desnaturalización
 Solução de desnaturação

HYBRIDIZ SOLN

Hybridization Solution
 Solution d'Hybridation
 Hybridisierungslösung
 Soluzione di Ibridazione
 Solución de hibridación
 Solução de hibridização

STRIN WASH SOLN

Stringent Wash Solution
 Solution de Lavage Stringent
 Stringent- Waschlösung
 Soluzione di lavaggio Stringente
 Solución de lavado astringente
 Solução para lavagem rigorosa

CONJ 100x

Conjugate 100x
 Conjugué (100x)
 100x konzentriertes Konjugat
 Coniugato 100x
 Conjugado 100x

CONJ DIL	Conjugate Diluent Diluant Conjugué Konjugatverdünner Diluyente del Coniugato Diluyente de conjugado Diluyente de conjugado
SUBS BCIP/NBT 100x	Substrate BCIP/NBT 100x Substrat BCIP/NBT 100x 100x konzentriertes BCIP/NBT-Substrat Substrato BCIP/NBT 100x Sustrato BCIP/NBT 100x Substrato BCIP/NBT 100x
SUBS BUF	Substrate Buffer Tampon Substrat Substratpuffer Tampone Substrato Tampón sustrato Tampão de substrato
RINSE SOLN 5x	Rinse Solution 5x Solution de Rinçage 5x 5x konzentrierte Spüllösung Soluzione di Risciacquo 5x Solución de lavado 5x Solução de lavagem 5x

English

Intended use

The INNO-LiPA HLA-B Update Plus is a line probe assay, for *in vitro* use, designed for the molecular typing of the human leukocyte antigen (HLA) B alleles at the allele group level.

Test Principle

The INNO-LiPA HLA typing tests are based on the reverse hybridization principle. Amplified biotinylated DNA material is chemically denatured, and the separated strands are hybridized with specific oligonucleotide probes immobilized as parallel lines on membrane-based strips. This is followed by a stringent wash step to remove any mismatched amplified material. After the stringent wash, streptavidin conjugated with alkaline phosphatase is added and bound to any biotinylated hybrid previously formed. Incubation with a substrate solution containing a chromogen results in a purple/brown precipitate. The reaction is stopped by a wash step, and the reactivity pattern of the probes is recorded.

With the INNO-LiPA HLA-B Update Plus, an amplification kit (INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) is available for standardized preparation of biotinylated amplified material. The amplification kit is based on the polymerase chain reaction (PCR*).

Amplification products are subsequently hybridized using 2 typing strips on which 66 sequence-specific probe lines and 2 control lines are fixed (Figure 1).

* Use of this product is covered by a license from F. Hoffmann - La Roche Ltd. and Roche Molecular Systems, Inc.

INNO-LiPA HLA-B Update Plus: steps involved

- step 1 Multiplex amplification of exons 2 to 4 of the HLA-B alleles.
 step 2 Hybridization and stringent wash with 67 probes immobilized on two INNO-LiPA HLA-B Update Plus strips (56°C).
 step 3 Color development.
 step 4 Interpretation of the probe reactivity pattern.
 step 5 If required, the LiRAS™ interpretation software advises for a further amplification and hybridization step.

Using the INNO-LiPA HLA-B Update Plus kit, it is advised to start with (a) and proceed to (b), if ambiguities involving Bw4/Bw6 alleles occur. This will be advised by the LiRAS™ Interpretation Software.

- (a) the amplification of exons 2, 3 and 4 of the HLA-B alleles with the HLA-B Multiplex primer solution prior to analysis with the INNO-LiPA HLA-B Update Plus strips 1 and 2.
 (b) group-specific amplification of exon 2 of the HLA-Bw4 alleles with primer solution HLA-Bw4 prior to analysis with the INNO-LiPA HLA-B Update Plus strip 1.
 The HLA-Bw4 primer solution provided, amplifies exon 2 of the HLA-Bw4 alleles. Exon 2 of other HLA-B alleles will not be amplified, except for the alleles B*4411, B*4703 and B*5708.

The INNO-LiPA HLA-B Update Plus is designed to give the best possible resolution, using the reverse hybridization assay format, at the allele group level (this means the first two digits after the asterisk in an allele name when following standard HLA nomenclature e.g. HLA-B*07).

In addition to the allele group interpretation, the software will give all possible allele combinations. This information however, should be considered as extra and not as decisive.

Reagents**Description, preparation for use and recommended storage conditions**

- If kept at 2 - 8°C, opened and unopened, and stored in the original vials, the reagents are stable until the expiry date of the kit. Do not freeze reagents. Do not use the reagents beyond the expiry date.
- The kit should be stored isolated from any source of contaminating DNA, especially amplified products.
- All reagents should be brought to room temperature (20 - 25°C) approximately 60 minutes before use and should be returned to the refrigerator immediately after use.
- Alterations in physical appearance of the kit components may indicate instability or deterioration.
- To minimize the possibility that strips curl before use, it is recommended to store the tube horizontally.

Reagents supplied:

Component	Quantity	Ref.	Description
Strips 1	1 x 20	58188	Containing 20 strips for INNO-LiPA HLA-B Update Plus marked with a brown marker line.
Strips 2	1 x 20	58189	Containing 20 strips for INNO-LiPA HLA-B Update Plus marked with a chrome colored marker line.
LiPA Control	1 x 0.05 ml	58190	Containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.01% methylisothiazolon (MIT) 0.1% chloroacetamide (CAA) as preservative.

Denaturation Solution	1 x 1 ml	56718	Alkaline solution containing EDTA. The vial should be closed immediately after use; prolonged exposure of this solution to air leads to a rapid deterioration of the denaturing strength.
Hybridization Solution	2 x 80 ml	56719	Saline sodium phosphate EDTA (SSPE) buffer containing 0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS). The Hybridization Solution should be pre-warmed to a temperature of at least 37°C and must not exceed 56°C (all crystals should be dissolved before use).
Stringent Wash Solution	2 x 200 ml	56720	SSPE buffer containing 0.1% SDS. The Stringent Wash Solution should be pre-warmed to a temperature of at least 37°C and must not exceed 56°C (all crystals should be dissolved before use).
Conjugate Diluent	1 x 150 ml	55671	Phosphate buffer containing NaCl, Triton®, protein stabilizers, and 0.01% MIT/0.1% CAA as preservative.
Conjugate 100x	1 x 1.5 ml	56716	Streptavidin labeled with alkaline phosphatase in Tris buffer containing protein stabilizers and 0.01% MIT/0.098% CAA as preservative, to be diluted 1/100 in Conjugate Diluent before use. Prepare 2 ml Conjugate working solution for each test trough + 2 ml in excess (Conjugate working solution can be prepared during stringent wash) for manual testing. For <i>Auto</i> -LiPA, make 10 ml in excess. The Conjugate working solution is stable for 24 hours at room temperature (20 - 25°C) if stored in the dark.
Substrate Buffer	1 x 235 ml	55732	Tris buffer containing NaCl, MgCl ₂ and 0.01% MIT/0.1% CAA as preservative.
Substrate BCIP/NBT 100x	1 x 1.5 ml	55723	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt (BCIP) and 4-nitroblue tetrazolium (NBT) in dimethylformamide (DMF), to be diluted 1/100 in Substrate buffer before use. Prepare 2 ml Substrate working solution for each test trough + 2 ml in excess (Substrate working solution can be prepared during conjugate incubation) for manual testing. For <i>Auto</i> -LiPA, make 10 ml in excess. The Substrate working solution is stable for 24 hours at room temperature (20 - 25°C) if stored in the dark.
Rinse Solution 5x	2 x 80 ml	56721	Phosphate buffer containing NaCl, Triton®, and 0.05% MIT/0.48% CAA as preservative, to be diluted 1/5 (1 part + 4 parts) in distilled or deionized water before use. Prepare 8 ml Rinse working solution for each test trough + 10 ml in excess. For <i>Auto</i> -LiPA, make 20 ml in excess. The Rinse working solution is stable for 2 weeks at 2 - 8°C.
Incubation tray	5	-	Containing 8 troughs each.
Reading card	1	-	For identification of positive probes.
Data reporting sheet	2	-	For storage of developed strips.

Materials required but not provided

- Water bath with shaking platform (80 rpm; with inclined lid; temperature adjustable to 56°C ± 0.5°C).
- Aspiration apparatus.
- Calibrated thermometer.
- Orbital, reciprocal or rocking platform shaker.

Recommendations:**For an orbital shaker:**

- the diameter of the circular motion should be equal or superior to 13 mm
- recommended speed for a 13 mm circular motion is 160 rpm.

For a reciprocal shaker:

- recommended speed for the to and from motion is 80 movements per minute.

For a rocking platform shaker:

- the shaking angle should not exceed 13° to avoid spilling of liquid
- recommended speed is 50 rpm.

- Vortex mixer or equivalent.
- Graduated cylinders (10, 25, 50, and 100 ml).
- Distilled or deionized water.
- Disposable gloves.
- Disposable sterile pipette tips (preferably cotton-plugged).
- Forceps for strip handling.
- Adjustable pipettes to deliver 1 - 20 µl, 20 - 200 µl, and 200 - 1000 µl.
- Dispensing Multipipette (Eppendorf, optional).
- Timer, 2 hours (± 1 minute).

Safety and environment

- **Please refer to the manufacturer's safety data sheet and product labeling for information on potentially hazardous components.**



R20/21, R36, R45, R61, S36/37, S45-53

Toxic! (T) Harmful by inhalation and in contact with skin. Irritating to eyes. May cause cancer. May cause harm to the unborn child. Wear suitable protective clothing and gloves. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible). Avoid exposure - obtain special instructions for use. Restricted to professional users.

Contains Dimethylformamide, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-Toluidine salt:
Substrate BCIP/NBT 100x.



R43, S24-37

Irritant! (Xi) Avoid contact with skin. May cause sensitization by skin contact. Wear suitable gloves.

Contains 2-Chloroacetamide: Rinse Solution, Substrate Buffer, Conjugate Diluent and LiPA Control.



R36/38, S23-24-26

Irritant! (Xi) Irritating to eyes and skin. Do not breathe vapour. Avoid contact with skin. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
Contains sodium hydroxide: Denaturation Solution.

- Specimens should be handled as potentially infectious. Therefore, all blood components and biological materials should be considered as being potentially infectious and should be handled as such. Only adequately trained personnel should be permitted to perform the test procedure. All blood components and biological materials should be disposed of in accordance with established safety procedures.
 - Autoclave for at least 15 minutes at 121°C.
 - Incinerate disposable material.
 - Mix liquid waste with sodium hypochlorite so that the final concentration is $\pm 1\%$ sodium hypochlorite. Allow to stand overnight before disposal.
CAUTION: Neutralize liquid waste that contains acid before adding sodium hypochlorite.
- Use of personal protective equipment is necessary: gloves and safety spectacles when manipulating dangerous or infectious agents.
- Waste should be handled according to the institution's waste disposal guidelines. All federal, state, and local environmental regulations should also be observed.

Specimens

Since the LiPA test utilizes biotinylated amplified DNA material as specimen, an amplification kit, INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus, is available as an accompanying tool.

Manipulations procedures

Strip handling

- The strips are designed to be used only once!
- Do not touch the strips with bare hands; use clean forceps.
- Use a **pencil** for identification of the test strips. Do not use ballpoints, etc. Write the ID above the marker line on the strips.
- Throughout the different incubation steps, test strips should always remain in the same trough.
- Unused or developed strips should be kept away from intense light and heat.
- Allow the developed strips to dry completely before interpretation, covering, and storing.
- Developed dry strips should be stored preferably in the dark at 20 - 25°C.
- Do not reuse the troughs.

Directions for manual incubation

- Incubation at 56°C \pm 0.5°C during hybridization and stringent wash are the most critical steps in avoiding false positive (temperature too low) or false negative/very weak signals (temperature too high). A shaking water bath with inclined lid allows a good control of temperature variations. Strict temperature control with a calibrated thermometer is necessary.
- Always **close** the lid of the water bath during incubations in order to avoid false positive signals.
- **Do not use a hot air shaker** for the hybridization and stringent wash.
- For hybridization and stringent wash, the troughs should be placed on the shaking platform of the water bath. Adjust the water level between 1/3 and 1/2 of the height of the trough. Make sure that the troughs do not float on the water. The water should be in direct contact with the troughs.
- Incubation steps for the color development should be between 20 and 25°C. If the temperature is below 20°C, weaker results may be obtained. If the temperature is above 25°C, high background and/or false positive signals may be obtained.
- Always incubate exactly for the duration as mentioned in the protocol.
- The amplitude of the motion generated by both the shaking water bath (hybridization procedure) and the shaker (color development procedure) is critical in achieving maximum sensitivity and homogeneous staining. The strip surface should be completely submerged.

The amplitude should be as high as possible. **However, spilling of liquid over the edges of the troughs should be avoided!** This can lead to cross-contamination and invalid results.

- Shaking during incubation of the strips should be performed in such a way that both the liquid and the test strips move back and forth in the trough, without liquid being spilled over the edge of the troughs.
- Do not cover the tray. During hybridization and stringent wash incubations, the troughs can be left uncovered in the water bath. Covering the troughs with microplate sealers may cause cross-contamination.

Directions for manual changing liquid in the troughs

- The liquid is aspirated from the trough with a pipette, preferably attached to a vacuum aspirator. The tray is held at an angle to allow all liquid to flow to one end of the trough.
- Add 2 ml of the appropriate solution to each trough and follow the protocol. A dispensing Multipipette (Eppendorf) is useful for this purpose.
- Repeat this step as many times as indicated in the test procedure.

NOTE:

- Do not allow the strips to dry between two steps.
- Make sure not to damage the surface of the strips when aspirating. Aspirate the liquid at the top of the strip above the marker line.
- Make sure all liquid is aspirated.
- Make sure the whole strip is thoroughly washed by complete submersion in the solution.
- Adapt the speed of the shaker when necessary.

Remarks and precautions

- For professional use only.
- In order to avoid DNA contamination, a maximum physical separation between the pre- and post-amplification steps is recommended: separate rooms, separate pipettes and other lab material, separate lab coats and gloves (and their stock) are minimum precautions for a good laboratory practice.
- Avoid any return from the post-amplification room to the pre-amplification room.
- The use of autoclaved disposable lab material is recommended.
- Do not reuse disposable lab material.
- Use a new sterile pipette tip for each aliquoted specimen.
- Do not use the reagents beyond the expiry date.
- Do not mix reagents between kits, unless the components have identical lot numbers.
- Avoid microbial contamination of reagents.

Manual test procedure

NOTE:

- Throughout the different incubation steps, the test strips should always remain in the same trough.

Before incubation, check the temperature of the water bath using a calibrated thermometer, and adjust the temperature if necessary before placing the tray in the water bath. Always close the lid.

The LiPA Control should be included in each test run.

Samples

1. HLA-B amplified product (use 10 μ l). For sample preparation: see INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus instructions for use.
NOTE:
 - Make sure exactly 10 μ l of amplified sample is added. Too much or too little sample may lead to a wrong typing result.
2. LiPA Control sample for INNO-LiPA HLA-B Update Plus (use 10 μ l; **amplification is not required!**).
3. Blank amplified control sample (negative control; use 10 μ l).

Denaturation and hybridization

1. Heat a shaking water bath to $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Check the temperature using a calibrated thermometer, and adjust the temperature if necessary. Do not exceed the indicated temperature. Pre-warm the Hybridization Solution and Stringent Wash Solution in a water bath of at least 37°C and do not exceed 56°C . Mix before use. All crystals should be dissolved.
2. Using forceps, remove the required number of INNO-LiPA HLA-B Update Plus Strip 1 and Strip 2 from the tube (one strip 1 and one strip 2 per test sample for the INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus, one strip 1 for the INNO-LiPA HLA-Bw4 amplicon). Include both strips for the LiPA Control sample for INNO-LiPA HLA-B Update Plus and for the blank amplified control sample. Pencil an identification number above the brown/chrome colored marker line on the strip.
3. Take the required number of test troughs (two troughs per test sample for HLA-B Multiplex Plus and one trough per test sample for HLA-Bw4) and place them into the tray.
4. Pipette 10 μ l Denaturation Solution into the upper corner of each trough.
NOTE:
 - Close the vial immediately after use.
5. Add 10 μ l sample (see Samples; see Instructions for use of INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) and carefully mix by pipetting up and down. Always use sterile pipette tips. Allow denaturation to proceed for **5 minutes** at $20 - 25^{\circ}\text{C}$.
6. Shake the pre-warmed Hybridization Solution and **gently** add 2 ml to the denatured amplified product into each trough. Mix by gentle shaking. Take care not to contaminate neighboring troughs during pipetting.
7. Immediately place the strip into the trough. The strips should be completely submerged in the solution.
NOTE:
 - Wear disposable gloves and use forceps.
8. Place the tray into the $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ shaking water bath (80 rpm; see Directions for manual incubation), close the lid, and incubate for **30 minutes**.
NOTE:
 - Avoid splashing water from the water bath into the trough. Adjust the water level between 1/3 and 1/2 of the height of the trough. To prevent the tray from sliding, immobilize the tray between two heavy weights.

Stringent wash

1. After hybridization, remove the tray from the water bath.
2. Hold the tray at a low angle and aspirate the liquid from the trough with a pipette, preferably attached to a vacuum aspirator. Add 2 ml pre-warmed Stringent Wash Solution into each trough, place the tray into the $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ shaking water bath, close the lid and incubate for **3 minutes**.
3. After incubation, remove the tray from the water bath and aspirate the liquid from the trough.
4. Repeat the **3 minutes** incubation step and the aspiration step once.

- At last, add 2 ml pre-warmed Stringent Wash Solution into each trough and place the tray into the $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ shaking water bath, close the lid and incubate for **4 minutes**.

Before incubation, check the temperature of the water bath using a calibrated thermometer, and adjust the temperature if necessary. Always close the lid.

NOTE:

- Dilute the concentrated Rinse Solution 5x and Conjugate 100x during stringent wash. See Reagents.

Color development

All subsequent incubations are carried out at **20 - 25°C on a shaker**.

During the incubations, the liquid and test strips should move back and forth in the trough for homogeneous staining.

- Wash each strip twice for 1 minute using 2 ml of the Rinse working solution (see Directions for changing liquid in the troughs).
- Add 2 ml of the Conjugate working solution to each trough and incubate for **30 minutes** while agitating the tray on the shaker.

NOTE:

- Dilute the Substrate BCIP/NBT 100x solution about 10 minutes prior to the end of the conjugate incubation. See Reagents.
- Wash each strip twice for **1 minute** using 2 ml of the Rinse working solution and wash once more using 2 ml Substrate Buffer.
 - Add 2 ml of the Substrate working solution to each trough and incubate for **30 minutes** while agitating the tray on the shaker.

CAUTION:

- Wear gloves and protective goggles.
- Stop the color development by washing the strips twice in 2 ml distilled water while agitating the tray on the shaker for at least **3 minutes**.
 - Using forceps, remove the strips from the troughs and place them on absorbent paper. Let the strips dry completely before reading the results. Store the developed and dried strips in the dark.

Automated test procedure: *Auto*-LiPA

The LiPA test procedure is extremely well-suited for automation. Therefore, the *Auto*-LiPA was designed to fully handle hybridization, stringent wash and color development steps. The *Auto*-LiPA is featured as a walk-away system with automated heating and cooling, and with automated aspiration and pipetting.

The standard *Auto*-LiPA 48 protocol describes the testing of up to 24 samples when using a single strip per trough. However, this number can be increased to a maximum of 48. To perform this, two strips from the same locus are tested in the same trough, while keeping all other protocol parameters the same. Note also that weaker probe reactivities can occasionally be observed. Therefore, those customers who intend to increase the number of samples are advised to validate this '2 strips in one trough' procedure in his/her laboratory.

For more information and specific protocols on the *Auto*-LiPA, please contact your local distributor.

Results

Reading

Figure 1 illustrates the position of the different oligonucleotide probes on the INNO-LiPA HLA-B Update Plus strips. A line is considered positive when a clear purple/brown band appears at the end of the test procedure.

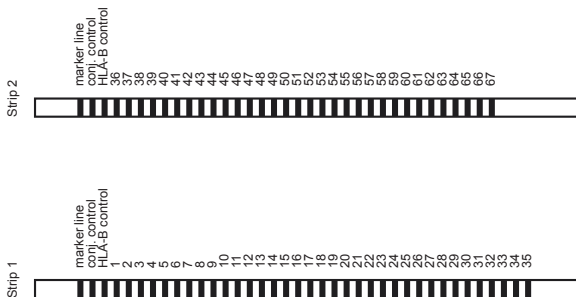


Figure 1: Location of the marker line (brown line on Strip 1 and chrome line on Strip 2), the conjugate control line (conj. control), the HLA-B Update Plus control line (HLA-B control), and the 66 sequence-specific DNA probes on the INNO-LiPA HLA-B Update Plus strips.

Validation

- Include one negative control and the LiPA Control (for INNO-LiPA HLA-B Update Plus) each time a test is performed. As with any new test procedure, the inclusion of additional positive and negative controls is to be considered until a high degree of confidence is reached in the ability to correctly perform the test procedure. It is suggested that reference DNA should be used to validate that the proper test conditions have been established.
- The uppermost lines on the INNO-LiPA HLA-B Update Plus strips (Figure 1) are the marker lines (brown and chrome colored line). These lines allow correct orientation of the strips.
- The next line controls the addition of reactive Conjugate and Substrate working solution during the detection procedure. This line should be lined up with the conjugate control line on the plastic reading card. This line should always be positive (if not: no interpretation should be done!) and should have approximately the same intensity on each strip in the same test run.
- The next line is the HLA-B Update Plus internal hybridization control line (HLA-B control on the reading card) which indicates whether or not an appropriate amount of HLA-B amplified material was added for hybridization. This line should always be positive, except for the negative control of the HLA-B multiplex amplification, but its intensity may vary between samples.
- The assay result of each negative control should give no apparent signal for any of the lines on the strip, except for the HLA-Bw4 amplification where the internal hybridization control line (HLA-B Control) will be positive as well.
- The **LiPA Control** sample for INNO-LiPA HLA-B Update Plus should yield the following pattern of positive probes: strip 1: conjugate control, HLA-B Control, 22 and 35; strip 2: conjugate control, HLA-B control, 53, 56 and 57. Every other probe should be negative. This control sample is composed of biotinylated oligonucleotides, complementary to the mentioned hybridization probes.

Positive hybridization on these probes thus demonstrates satisfactory performance of the assay including hybridization, stringent washing, color development, and detection. A different pattern may indicate assay performance problems such as incorrect temperature during hybridization or deviations from the prescribed incubation times or temperatures.

- Color intensities of probes on a strip may differ from one line to another.

Interpretation of results

- Check for the correct reactivity pattern of the LiPA Control sample.
- The conjugate control line on the strip should be lined up with the conjugate control line on the plastic reading card.
- First check the positivity of the control lines (first two lines) in order to validate each individual strip (see Validation).
- Typing results are based on the reactivity of the probes in the kit. A list of probe specificities is available.
- Identify all probe numbers that are positive on the INNO-LiPA HLA-B Update Plus strips and deduce the HLA-B type by using the INNO-LiPA HLA-B Update Plus typing table or a version of the LiPA interpretation software (see Interpretation software: LiRAS™).

The software often gives more results than the intended use suggests: interpretation at allele group is given, as well as all possible allele combinations. This information however, should be considered as extra, not as decisive.

Interpretation software: LiRAS™

The LiRAS™ software for INNO-LiPA HLA is designed to assist with the interpretation of the LiPA results.

Please contact your local distributor to obtain the latest updated version.

Limitations of the procedure

- Use of this product should be limited to personnel trained in the techniques of hybridization.
- Only good laboratory practice and careful performance of the specified procedures, will allow specific hybridization and correct typing of target DNA.
- The INNO-LiPA HLA-B Update Plus strips have been designed to give resolution at allele group level (B*07 to B*83). However, a combination of certain alleles could lead to a non-unique probe combination and thus to an ambiguous answer of two or more possible allelic combinations.
- New alleles might have polymorphisms outside probe regions, this should be taken into consideration when interpreting the results.
- The HLA-B Update Plus control lines are not only specific for HLA-B, but also for some HLA-A and some HLA-C alleles. Therefore, the HLA-B control lines might also react with HLA-A and HLA-C amplified products.

Test performance

Test performance using DNA amplified with the HLA-B Multiplex Primer Solution

The performance of INNO-LiPA HLA-B Update was evaluated in 4 European tissue typing laboratories on routine typing samples. A total of 347 samples were analyzed. DNA was extracted from fresh or frozen EDTA-anticoagulated or citrate-anticoagulated blood. DNA extraction methods included salting out, QIAamp 96 DNA blood kit (Qiagen), Genomic DNA Purification kit (Promega) and Puregene (Gentra Systems). Fresh or frozen DNA was amplified using the Perkin Elmer 9600 or 9700 thermal cycler. Amplicons were stored at 2 - 8°C or -15/-25°C before they were applied on the strips.

No amplification failures were encountered, although repeat testing was needed for 2 samples from one center.

The samples were processed using the *Auto*-LiPA instrument and interpreted with a clinical trial version of the LiRAS™ interpretation software.

Accuracy

An HLA-B typing result was obtained for 342 of the 347 samples. Repeat testing was needed for 4 samples from one center. One sample resulted in 'no typing deducible' but according to the investigator, this was probably due to contamination of the DNA. For 4 samples from one center, no typing result was provided by the investigator, although options were available via editing for one of them.

Accuracy at allele group level was calculated as a percentage of observed concordance with alternative DNA assays (Biotech ELPHA HLA-AB LowRes Typing kit, Dynal SSP, LiPA HLA-B, sequencing, Micro SSP™, OLERUP SSP™, Biotech HLA-B SSP). The INNO-LiPA HLA-B Update results are considered concordant with the reference assay result if the two results were identical, if the INNO-LiPA HLA-B Update results were more specific than the reference result, or if the INNO-LiPA HLA-B Update results showed a lower resolution but correct result by comparison to the reference methods. Accuracy was 100% (342/342).

Resolution

(typing table version v1.0/2001-03-31)

The INNO-LiPA HLA-B Update has been designed to resolve HLA-B alleles to the allele group level, i.e. both at serological broad and split level. 'Allele group' is equivalent to the designation of the first two digits following the asterisk in standard HLA nomenclature (e.g. HLA B*07). Furthermore, the kit is designed to detect the following null alleles: 0808N (exon 3), 1526N (exon 3) and 5111N (exon 4). The resolution at allele group level observed during this study is 92.4% (316/342).

The ambiguities observed were B*08xB*51 or B*08xB*78 (8 cases), B*15xB*35 or B*15xB*15 (2 cases), B*35xB*38 or B*39xB*53 (2 cases), B*08xB*38 or B*08xB*39 (2 cases), B*15xB*51 or B*15xB*52 or B*15xB*78 (2 cases), B*35xB*51 or B*53xB*78 (2 cases), B*35xB*38 or B*35xB*53 (1 case), B*35xB*49 or B*50xB*53 (1 case), B*35xB*47 or B*53xB*47 (1 case), B*40xB*78 or B*40xB*52 (1 case), B*35xB*55 or B*35xB*56 (1 case), B*15xB*49 or B*15xB*50 (1 case), B*49xB*78 or B*50xB*51 (1 case), B*15xB*51 or B*52xB*78 (1 case). For six of these cases, both the reference assay and INNO-LiPA HLA-B Update had an ambiguous result. Two ambiguities (6 samples) observed with the reference method were reduced to a single clear-cut typing result using the INNO-LiPA HLA-B Update assay.

Probe reactivity

Four probes reacted false positive and nine probes reacted weak to false negative at one or more occasions during this clinical trial. This information, if not already present, has been implemented in the software and/or guidelines. The false reactivities were all identified as such and concordant typing at allele group level was achieved when the LiRAS™ interpretation software was used.

Consult the guidelines for specific information on probe reactivity.

A complete list of probe and primer specificities is available. All probes are designed to hybridize specifically with their complementary sequence at the level of one mismatch, unless stated otherwise in the list.

Test sensitivity

Results obtained during an internal evaluation of a dilution series of 3 DNA samples, varying from 0.01 µg/µl to 2 µg/µl, recommended the use of DNA with a minimum concentration of 0.1 µg/µl.

The external performance evaluation included 347 DNA samples with a concentration between 20 ng/µl and 1500 ng/µl and with a purity (A_{260nm}/A_{280nm}) ≥ 1.5 .

The DNA was diluted to a concentration between 20 ng/µl and 250 ng/µl prior to

amplification. No amplification failures were encountered, although repeat testing was needed for 2 samples from one center.

Precision

Internal data:

Three samples were tested in quadruplicate, by two different persons using the manual method, or by one person on two different *Auto*-LiPA instruments. Two samples were analyzed on three different lots in two different runs. Interpretation of the results was the same for all samples. Probe reactivities were comparable in all cases.

External validation:

- Inter-lot variability was assessed by analyzing a proficiency panel (5 samples with known reactivity and interpretation) with two different batches of product. For each sample the same typing result was obtained, independent of the batch used.
- Inter-lab variability was assessed by having the same proficiency panel tested by the four centers. Each center obtained the same typing results for the five samples.

Test performance using DNA Amplified with the HLA-Bw4 Primer Solution

The performance of the HLA-Bw4 Primer Solution of INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus was evaluated in-house and in two Belgian tissue typing laboratories. A total of 82 anonymous samples was analyzed (50 samples externally; 32 in-house). All samples had previously been typed with INNO-LiPA HLA-B Update. The samples included 31 ambiguous (18 different ambiguities) and 51 unambiguous samples. All ambiguous samples were further typed to a unique result with one or more alternative DNA-based typing assays.

All hybridizations were performed using the *Auto*-LiPA instrument, using program HLA56v3, and the interpretation was done with a clinical trial version of the LiRAS™ for LiPA HLA v3.00 interpretation software.

Accuracy

Calculations of diagnostic accuracy were only carried out on samples that were successfully amplified and for which a unique reference result was available. As a consequence, two samples were excluded from this calculation. A unique HLA-B typing result was obtained for the remaining 80 samples.

Diagnostic accuracy of the assay at allele group level was calculated as the number of correctly obtained typing results, compared to the unique typing result obtained with INNO-LiPA HLA-B Update (Innogenetics) or an alternative typing assay (Olerup SSP (GenoVision), SBT (Abbott), Biotest HLA-B SSP (Biotest), Allset+ HLA-B Low Resolution (Dynal), and sequencing (in-house method)).

The typing results of all 80 samples were concordant with the reference assay, resulting in a diagnostic accuracy of 100% (80/80; 95% CI [95.5%; 100%]).

Resolution (typing table v.1.4/031010)

The HLA-B Multiplex Primer Solution, used in combination with the INNO-LiPA HLA-B Update strips, is designed for typing HLA-B alleles at allele group level.

The HLA-Bw4 Primer Solution, used in combination with the INNO-LiPA HLA-B Update strip 1, is designed to resolve the most frequent ambiguities, ie, ambiguities involving Bw4/Bw6 alleles.

All ambiguities, at allele group level, observed after testing with the HLA-B Multiplex Primer Solution, were reduced to an unambiguous typing result using the HLA-Bw4 Primer Solution: B*08, B*38 or B*08, B*39 (2 cases); B*08, B*51 or B*08, B*78 (4 cases); B*13, B*49 or B*13, B*50 (2 cases); B*15, B*38 or B*15, B*39 (1 case); B*15, B*51 or B*15, B*52 or B*15, B*78 (1 case); B*15, B*51 or B*15, B*52 or B*15, B*78 or B*35, B*52 (1 case); B*35, B*38 or B*39, B*53 (4 cases); B*35, B*40 or B*40, B*53

(1 case); B*35, B*47 or B*47, B*53 (1 case); B*35, B*49 or B*50, B*53 (2 cases); B*35, B*52 or B*53, B*78 (2 cases); B*38, B*44 or B*39, B*44 (1 case); B*38, B*50 or B*39, B*49 (1 case); B*38, B*78 or B*39, B*51 (1 case); B*40, B*49 or B*40, B*50 (2 cases); B*41, B*53 or B*42, B*53 (1 case); B*44, B*49 or B*44, B*50 (2 cases).

For all ambiguous results, the LiRAS™ interpretation software advised Bw4 amplification followed by hybridization with the INNO-LiPA HLA-B Update strip 1.

Probe reactivity

On one or more occasions during this study, some probes gave weak reactions. Concordant typing at allele group level was achieved when the LiRAS™ interpretation software was used.

Test sensitivity

Test sensitivity of the assay at allele group level was calculated as the number of successful typing results over the total number of samples tested.

Test sensitivity in this evaluation, after one repeat amplification testing of four samples, was 98.8% (81/82; 95% CI [93.4%; 100%]). The sample for which amplification failed after retesting at the center, was successfully amplified in-house and a correct typing result was obtained.

Precision

Repeatability (intra-assay), inter-assay and inter-person variation were evaluated in-house. One sample, amplified in duplicate, using three different cyclers and processing two runs per cycler, was tested using the *Auto*-LiPA instrument. This protocol was performed in duplicate by two different persons.

No significant variation was observed and an identical typing result was obtained in all cases without the need for editing.

Français

But du test

INNO-LiPA HLA-B Update Plus est un test sur bandelette à usage *in vitro* pour le typage moléculaire, au niveau du groupe d'allèles, des allèles HLA-B (Human Leukocyte Antigen).

Principe du test

Les tests de typage INNO-LiPA HLA sont basés sur le principe de l'hybridation inverse. L'ADN biotinylé amplifié est dénaturé chimiquement et les chaînes séparées sont hybridées à l'aide de sondes oligonucléotidiques immobilisées en bandes parallèles sur bandelettes. L'hybridation est suivie d'un lavage stringent afin d'éliminer tout matériel amplifié non apparié. Après le lavage stringent est ajoutée de la streptavidine marquée à une phosphatase alcaline, qui se fixe aux hybrides biotinylés précédemment formés. L'incubation avec une solution de substrat contenant un chromogène entraîne la formation d'un précipité violet/brun. La réaction est stoppée par lavage, et le profil de réactivité des sondes est établi.

INNO-LiPA HLA-B Update Plus est fourni avec un kit d'amplification (INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) pour la préparation standardisée de matériel amplifié biotinylé. Le kit d'amplification est basé sur une réaction en chaîne de polymérisation (PCR*).

Les produits amplifiés sont ensuite hybridés avec 2 bandelettes LiPA comportant 66 sondes de séquences spécifiques et 2 bandes contrôles (Figure 1).

* *L'utilisation de ce produit est couverte par une licence de F. Hoffmann - La Roche Ltd et Roche Molecular Systems, Inc.*

INNO-LiPA HLA-B Update Plus:

- étape 1 Amplification multiplex des exons 2 à 4 des allèles HLA-B.
 étape 2 Hybridation et lavage stringent avec 67 sondes immobilisées sur deux bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update Plus (56°C).
 étape 3 Révélation.
 étape 4 Interprétation du profil de réactivité des sondes.
 étape 5 Si nécessaire, le logiciel d'interprétation LiRAS™ préconise une étape d'amplification et d'hybridation supplémentaire.

Lors de l'utilisation du kit INNO-LiPA HLA-B Update Plus, il est conseillé de commencer par (a) et de continuer en (b) en cas d'ambiguïtés concernant les allèles Bw4/Bw6. C'est ce qui sera recommandé par le logiciel d'interprétation LiRAS™.

- (a) amplification des exons 2, 3 et 4 des allèles HLA-B à l'aide de la solution Primer HLA-B Multiplex avant test avec les bandelettes 1 et 2 d'INNO-LiPA HLA-B Update Plus.
 (b) amplification spécifique de groupe de l'exon 2 des allèles HLA-Bw4 à l'aide de la solution Primer HLA-Bw4 avant test avec la bandelette 1 d'INNO-LiPA HLA-B Update Plus. La solution Primer HLA-Bw4 fournie amplifie l'exon 2 des allèles HLA-Bw4. L'exon 2 des autres allèles HLA-B ne sera pas amplifié, sauf pour les allèles B*4411, B*4703 et B*5708.

Le test INNO-LiPA HLA-B Update Plus est conçu pour fournir la meilleure résolution possible par la technique d'hybridation inverse, au niveau groupe d'allèles (c'est-à-dire les deux premiers chiffres après l'astérisque dans le nom de l'allèle selon la nomenclature HLA standard, par ex. HLA-B*07).

En plus de l'interprétation des groupes d'allèles, le logiciel fournira toutes les combinaisons d'allèles possibles. Cette information, toutefois, doit être considérée comme un plus et non comme un facteur décisif.

Réactifs**Description, préparation et conditions de conservation**

- Tous les réactifs, ouverts ou fermés, sont stables jusqu'à la date de péremption du kit s'ils sont conservés entre 2 - 8°C dans leurs flacons d'origine. Ne pas congeler les réactifs. Ne pas utiliser les réactifs après la date de validité.
- Le kit doit être conservé à l'écart de toute source de DNA contaminant, en particulier des produits amplifiés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à la température ambiante (20 - 25°C) 60 minutes environ avant l'utilisation, et replacés au réfrigérateur immédiatement après l'utilisation.
- Une altération de l'apparence physique des composants du kit peut indiquer une instabilité ou une détérioration.
- Pour minimiser le risque de voir les bandelettes s'enrouler avant utilisation, il est recommandé de conserver le tube à l'horizontale.

Réactifs fournis

Composant	Quantité	Réf.	Description
Bandelettes 1	1 x 20	58188	20 bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update Plus marquées avec une ligne de repère marron.
Bandelettes 2	1 x 20	58189	20 bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update Plus marquées avec une ligne de repère de couleur jaune.

Contrôle LiPA	1 x 0.05 ml	58190	Contient de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 0.01% méthylisothiazolone (MIT) /0.1% chloroacétamide (CAA) comme conservateur.
Solution de Dénaturation	1 x 1 ml	56718	Solution alcaline contenant EDTA. Le flacon doit être immédiatement refermé après usage. Une exposition prolongée à l'air de cette solution conduit à une rapide détérioration de son pouvoir dénaturant.
Solution d'Hybridation	2 x 80 ml	56719	Tampon SSPE (saline sodium phosphate EDTA) contenant 0.5% de dodécyl sulfate sodium (SDS). La Solution d'Hybridation doit être préchauffée à une température d'au moins 37°C sans dépasser 56°C (tous les cristaux doivent être dissous avant utilisation).
Solution de Lavage Stringent	2 x 200 ml	56720	Tampon SSPE contenant 0.1% SDS. La Solution de Lavage Stringent doit être préchauffée à une température d'au moins 37°C sans dépasser 56°C (tous les cristaux doivent être dissous avant utilisation).
Diluant Conjugué	1 x 150 ml	55671	Tampon phosphate contenant NaCl, Triton®, protéines stabilisatrices et 0.01% MIT /0.1% CAA comme conservateur.
Conjugué (100x)	1 x 1.5 ml	56716	Streptavidine marquée à la phosphatase alcaline en tampon Tris contenant des protéines stabilisatrices et 0.01% MIT/ 0.098% CAA, à diluer au 1/100 en Diluant Conjugué avant utilisation. Préparer 2 ml de Solution de travail de Conjugué par compartiment (la Solution de travail de Conjugué peut être préparée pendant le lavage stringent) + 2 ml supplémentaires pour test en manuel. Pour l'Auto-LiPA, préparer 10 ml supplémentaires. La Solution de travail de Conjugué est stable 24 heures à température ambiante (20 - 25°C) et à l'obscurité.
Tampon Substrat	1 x 235 ml	55732	Tampon Tris contenant NaCl, MgCl ₂ et 0.01% MIT/0.1% CAA comme conservateur.
Substrat BCIP/NBT 100x	1 x 1.5 ml	55723	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate sel de p-toluidine (BCIP) et 4-nitrobleu tetrazolium (NBT) en diméthylformamide (DMF), à diluer au 1/100 en Tampon Substrat avant utilisation. Préparer 2 ml de Solution de travail de Substrat par compartiment (la Solution de travail de Substrat peut être préparée pendant l'étape d'incubation du Conjugué) + 2 ml supplémentaires pour test en manuel. Pour l'Auto-LiPA, préparer 10 ml supplémentaires. La Solution de travail de Substrat est stable 24 heures à température ambiante (20 - 25°C) et à l'obscurité.

Solution de Rinçage 5x	2 x 80 ml	56721	Tampon phosphate contenant NaCl, Triton® et 0.05% MIT/0.48% CAA comme conservateur, à diluer au 1/5 (1 part + 4 parts) en eau distillée ou désionisée avant utilisation. Préparer 8 ml de Solution de travail de Rinçage par compartiment + 10 ml supplémentaires. Pour l'Auto-LiPA, préparer 20 ml supplémentaires. La Solution de travail de Rinçage est stable 2 semaines à 2 - 8°C.
Plaque d'incubation	5	-	Contenant 8 compartiments chacune.
Carte de lecture	1	-	Pour l'identification des sondes positives.
Feuille de résultats	2	-	Pour la conservation des bandelettes développées.

Matériel nécessaire non fourni

- Bain-marie avec plate-forme agitante (80 tr/min; avec couvercle incliné; température réglable à 56°C ± 0.5°C).
- Système d'aspiration.
- Thermomètre calibré.
- Agitateur plan orbital, linéaire ou oscillant.

Recommandations:

Pour un agitateur orbital:

- le diamètre du mouvement circulaire doit être égal ou supérieur à 13 mm
- la vitesse recommandée, pour un mouvement circulaire de 13 mm, est de 160 tr/min.

Pour un agitateur linéaire:

- la vitesse recommandée pour le mouvement de va-et-vient est de 80 mouvements par minute.

Pour un agitateur oscillant:

- l'angle d'agitation ne doit pas dépasser 13° pour éviter tout débordement
- la vitesse recommandée est de 50 tr/min.

- Vortex ou équivalent.
- Epruvette graduée (10, 25, 50 et 100 ml).
- Eau distillée ou désionisée.
- Gants jetables.
- Cônes pour pipettes stériles jetables (de préférence à filtre coton).
- Pince pour la manipulation des bandelettes.
- Pipettes ajustables 1 - 20 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl.
- Multipipette (type Eppendorf, en option).
- Minuteur, 2 heures (± 1 minute).

Consignes de sécurité

- **Se référer à la fiche sécurité du fabricant et à l'étiquetage pour toute information sur les produits potentiellement dangereux.**



R20/21, R36, R45, R61, S36/37, S45-53

Toxique! (T) Nocif par inhalation et contact avec la peau. Irritant pour les yeux. Cancérogène. Tératogène. Porter des gants et des vêtements de protection. En cas d'accident et de malaise, consulter immédiatement un médecin (montrer l'étiquette si possible). Éviter toute exposition - Se procurer les instructions spéciales d'utilisation. Limité à un usage par des professionnels. **Contient du diméthylformamide, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate sel de p-toluidine:** Substrat BCIP/NBT 100x.



R43, S24-37

Irritant! (Xi) Eviter le contact avec la peau. Peut causer des irritations par contact avec la peau. Porter des gants de protection.

Contient 2-chloroacétamide: Solution de Rinçage, Tampon Substrat, Diluant Conjugué et Contrôle LiPA.



R36/38, S23-24-26

Irritant! (Xi) Irritant pour les yeux et la peau. Ne pas inhaler. Eviter tout contact avec la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement à grande eau et consulter de suite un médecin.

Contient de l'hydroxyde de sodium: Solution de Dénaturation.

- Les échantillons doivent toujours être manipulés comme potentiellement infectieux. Tout constituant dérivé du sang, ainsi que tout matériel biologique, doit donc être considéré comme potentiellement infectieux et devra être manipulé avec les précautions d'usage. Seul le personnel qualifié doit être autorisé à réaliser le test. Tous les dérivés sanguins et matériels biologiques doivent être éliminés selon les procédures de sécurité en vigueur:
 - Autoclave au moins 15 min à 121°C.
 - Incinération des matériels jetables.
 - Mélanger les déchets liquides avec de l'hypochlorite de sodium à une concentration finale d'environ 1%. Laisser en contact une nuit avant l'évacuation. ATTENTION: Les liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avant ajout d'hypochlorite de sodium.
- L'utilisation d'un équipement personnel de protection est nécessaire: gants et écrans lors de la manipulation d'agents dangereux ou infectieux.
- Les déchets doivent être traités en accord avec les règles d'élimination des déchets en vigueur dans l'institution. Toutes les réglementations fédérales, nationales et locales doivent également être observées.

Echantillons

Le test LiPA utilisant de l'ADN amplifié biotinylé comme échantillon, il est accompagné d'un kit d'amplification, INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus.

Procédures de manipulation

Bandelettes

- Les bandelettes ne sont pas réutilisables!
- Ne pas toucher les bandelettes avec les mains: utiliser des pinces en plastique propres.
- Utiliser un **crayon** pour identifier les bandelettes. Ne pas utiliser de stylos à bille, etc. Ecrire l'identité au-dessus de la ligne de repère des bandelettes.
- Les bandelettes doivent rester dans le même compartiment tout au long des différentes étapes d'incubation.
- Les bandelettes non utilisées ou développées doivent être conservées à l'écart de toute source de lumière intense et de chaleur.
- Laisser les bandelettes développées sécher entièrement avant de les interpréter, de les couvrir et de les stocker.
- Les bandelettes développées sèches doivent de préférence être conservées à l'obscurité, à une température de 20 - 25°C.
- Ne pas réutiliser les compartiments.

Directives pour incubation manuelle

- L'incubation à $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ pour l'hybridation et le lavage stringent est l'étape la plus critique pour éviter les signaux faussement positifs (température trop basse) ou faussement négatifs/très faibles (température trop élevée). Un bain-marie agitant avec couvercle incliné permet un bon contrôle des variations de température. Un strict contrôle de la température à l'aide d'un thermomètre calibré est indispensable.
- Toujours **fermer** le couvercle du bain-marie pendant l'incubation afin d'éviter les signaux faussement positifs.
- **Ne pas utiliser d'agitateur à air chaud** pour l'hybridation et le lavage stringent.
- Pour l'hybridation et le lavage stringent, les compartiments doivent être placés sur la plate-forme agitante du bain-marie. Régler le niveau d'eau entre le tiers et la moitié de la hauteur du compartiment. Veiller à ce que les compartiments ne flottent pas sur l'eau. L'eau doit être en contact direct avec les compartiments.
- Les étapes d'incubation pour la révélation doivent se réaliser entre $20 - 25^{\circ}\text{C}$. Si la température est inférieure à 20°C , les résultats obtenus peuvent être plus faibles. Une température supérieure à 25°C risque de provoquer une coloration de fond trop importante et/ou des signaux faussement positifs.
- Respecter exactement les durées d'incubation indiquées dans le protocole.
- L'amplitude du mouvement généré soit par le bain-marie agitant (procédure d'hybridation), soit par l'agitateur (procédure de révélation) est un paramètre critique pour optimiser la sensibilité et homogénéiser la coloration. Les bandelettes doivent être complètement immergées. L'amplitude doit être aussi grande que possible **tout en évitant tout débordement**. Un débordement du liquide peut être cause de contamination croisée et de résultats non valides.
- Pendant l'incubation des bandelettes, l'agitation doit s'effectuer de manière que le liquide et les bandelettes effectuent un va-et-vient dans le compartiment, sans débordement du liquide.
- Ne pas couvrir le support. Pendant les incubations en phase d'hybridation et de lavage stringent, les compartiments peuvent être laissés ouverts dans le bain-marie. Couvrir les compartiments à l'aide de feuilles adhésives pour microplaques peut être source de contamination croisée.

Directives pour changement des solutions

- Aspirer le liquide de chaque compartiment à l'aide d'une pipette, de préférence branchée sur une pompe à vide. Incliner le support de manière que le liquide s'écoule vers une extrémité du compartiment.
- Ajouter 2 ml de la solution appropriée dans chaque compartiment et suivre le protocole. Une multipipette (de type Eppendorf) est indiquée pour cet usage.
- Répéter cette étape le nombre de fois indiqué dans la procédure de test.

NOTE:

- Ne pas laisser sécher les bandelettes entre deux étapes.
- Veiller à ne pas endommager la surface des bandelettes lors de l'aspiration du liquide. Aspirer le liquide dans le haut de la bandelette, au-dessus de la ligne repère.
- Veiller à aspirer tout le liquide.
- Veiller à immerger entièrement les bandelettes dans la solution pour assurer un lavage correct.
- Adapter la vitesse de l'agitateur si nécessaire.

Remarques et Précautions

- A usage professionnel exclusivement.
- Afin d'éviter toute contamination ADN, il est recommandé de séparer le plus possible physiquement les étapes de pré- et post-amplification: pièces séparées, pipettes et matériel de laboratoire différents, blouses et gants (et leurs stocks) différents sont les précautions minimum à prendre dans le cadre des bonnes pratiques de laboratoire.

- Eviter tout retour de la pièce post-amplification vers la pièce pré-amplification.
- Il est recommandé d'utiliser du matériel de laboratoire jetable autoclavé.
- Ne pas réutiliser le matériel de laboratoire jetable.
- Utiliser un nouveau cône pour pipette stérile pour chaque aliquote d'échantillon.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de validité.
- Ne pas mélanger les réactifs de kits différents, à moins que les composants ne portent le même numéro de lot.
- Eviter toute contamination microbienne des réactifs.

Procédure manuelle

REMARQUE:

- Les bandelettes doivent rester dans le même compartiment tout au long des différentes étapes d'incubation.

Avant l'incubation, vérifier la température du bain-marie à l'aide d'un thermomètre calibré et, si nécessaire, ajuster la température avant de placer le support dans le bain-marie. Toujours fermer le couvercle.

Le contrôle LiPA doit être inclus dans chaque série.

Echantillons

1. Produit HLA-B amplifié (utiliser 10 µl). Pour la préparation des échantillons: voir le mode d'emploi du test INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus.

REMARQUE:

- Veiller à ajouter exactement 10 µl d'échantillon amplifié. Une quantité excessive ou insuffisante d'échantillon risque de fausser les résultats.
2. Contrôle LiPA pour INNO-LiPA HLA-B Update Plus (utiliser 10 µl; **l'amplification n'est pas requise!**).
 3. Contrôle blanc amplifié (contrôle négatif; utiliser 10 µl).

Dénaturation et hybridation

1. Chauffer le bain-marie à 56°C ± 0.5°C. Vérifier la température à l'aide d'un thermomètre calibré et ajuster si nécessaire. Ne pas dépasser la température indiquée. Préchauffer les Solutions d'Hybridation et de Lavage Stringent dans un bain-marie à une température de 37°C minimum (ne pas dépasser 56°C). Mélanger avant utilisation. Tous les cristaux doivent être dissous.
2. A l'aide de pinces, retirer du tube le nombre nécessaire de bandelettes 1 et de bandelettes 2 INNO-LiPA HLA-B Update Plus (une bandelette 1 et une bandelette 2 par échantillon pour INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus, une bandelette 1 pour l'amplicon INNO-LiPA HLA-Bw4). Inclure les deux bandelettes pour le contrôle LiPA pour INNO-LiPA HLA-B Update Plus et pour le contrôle blanc amplifié. A l'aide d'un crayon, inscrire un numéro d'identification au-dessus de la ligne repère marron/jaune de la bandelette.
3. Placer le nombre requis de compartiments (deux compartiments par échantillon pour HLA-B Multiplex Plus, et un compartiment par échantillon pour HLA-Bw4) dans le support.
4. A l'aide d'une pipette, déposer 10 µl de Solution de Dénaturation dans le coin supérieur de chaque compartiment.

REMARQUE:

- Refermer le flacon immédiatement après usage.
5. Ajouter 10 µl d'échantillon (voir Echantillons; voir le mode d'emploi du test INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) et homogénéiser soigneusement par flux et reflux. Toujours utiliser des embouts de pipette stériles. Laisser dénaturer pendant **5 minutes** à 20 - 25°C.
 6. Agiter la Solution d'Hybridation préchauffée et en ajouter **délicatement** 2 ml au produit amplifié dénaturé dans chaque compartiment. Homogénéiser en agitant doucement. Attention à ne pas contaminer les compartiments voisins pendant le pipetage.
 7. Placer immédiatement la bandelette dans le compartiment. Les bandelettes doivent être complètement immergées dans la solution.

REMARQUE:

- Porter des gants jetables et utiliser des pinces en plastique.
8. Placer le support dans le bain-marie agitant à $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (80 tr/min; voir Directives pour l'incubation manuelle), fermer le couvercle et incubé **30 minutes**.

REMARQUE:

- Éviter de projeter de l'eau du bain-marie dans les compartiments. Régler le niveau d'eau entre le tiers et la moitié de la hauteur du compartiment. Pour empêcher le support de glisser, l'immobiliser entre deux poids.

Lavage Stringent

1. Après l'étape d'hybridation, retirer le support du bain-marie.
2. Incliner légèrement le support et aspirer le liquide de chaque compartiment à l'aide d'une pipette, de préférence branchée sur une pompe à vide. Ajouter 2 ml de Solution de Lavage Stringent préchauffée dans chaque compartiment et placer le support dans le bain-marie agitant à $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Fermer le couvercle et incubé **3 minutes**.
3. Après incubation, retirer le support du bain-marie et aspirer le liquide du compartiment.
4. Répéter l'étape d'incubation de **3 minutes** et l'étape d'aspiration une fois.
5. Enfin, ajouter 2 ml de Solution de Lavage Stringent préchauffée dans chaque compartiment et placer le support dans le bain-marie agitant à $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Fermer le couvercle et incubé **4 minutes**.

Avant l'incubation, vérifier la température du bain-marie à l'aide d'un thermomètre calibré et ajuster si nécessaire. Toujours fermer le couvercle.

REMARQUE:

- Diluer les Solution de Rinçage 5x et Conjugué concentrés 100x pendant l'étape de Lavage Stringent. Voir Réactifs.

Révélation

Toutes les incubations suivantes sont effectuées à **20 - 25°C sur un agitateur**. Durant les incubations, veiller à ce que les bandelettes et la solution effectuent un mouvement de va-et-vient dans les compartiments pour homogénéiser la coloration.

1. Laver deux fois chaque bandelette pendant 1 minute à l'aide de 2 ml de Solution de travail de Rinçage (voir Directives pour changement des solutions).
2. Ajouter 2 ml de la Solution de travail de Conjugué dans chaque compartiment et incubé **30 minutes** sous agitation.

REMARQUE:

- Diluer la Solution de Substrat BCIP/NBT (100x) 10 minutes environ avant la fin de l'incubation. Voir Réactifs.
3. Laver deux fois chaque bandelette pendant **1 minute** à l'aide de 2 ml de Solution de travail de Rinçage, puis une nouvelle fois avec 2 ml de Tampon Substrat.
 4. Ajouter 2 ml de la Solution de travail de Substrat dans chaque compartiment et incubé **30 minutes** sous agitation.

ATTENTION:

- Porter des gants et des lunettes de protection.
5. Stopper la révélation en lavant les bandelettes deux fois dans 2 ml d'eau distillée sous agitation, pendant au moins **3 minutes**.
 6. À l'aide de pinces en plastique, retirer les bandelettes des compartiments et les déposer sur du papier absorbant. Laisser sécher complètement les bandelettes avant de lire les résultats. Conservez les bandelettes développées et sèches à l'obscurité.

Procédure automatisée: Auto-LiPA

La procédure de test LiPA peut être très facilement automatisée. C'est ainsi que l'Auto-LiPA est conçu pour prendre intégralement en charge les étapes d'hybridation, de lavage stringent et de révélation. L'Auto-LiPA est un système ne nécessitant aucune surveillance et pourvu de fonctions de chauffage et refroidissement, aspiration et pipetage automatiques.

Le protocole standard *Auto*-LiPA 48 indique la procédure de test pour maximum 24 échantillons, avec utilisation d'un compartiment par bandelette. Cependant, ce nombre peut être porté à 48 en déposant 2 bandelettes du même locus dans le même compartiment, tandis que les autres paramètres de test restent inchangés. Il est à noter que des réactivités de sondes plus faibles peuvent être occasionnellement observées. En conséquence, il est recommandé à l'utilisateur souhaitant augmenter le nombre d'échantillons testés, de procéder à la validation dans son laboratoire, du protocole "2 bandelettes dans 1 compartiment".

Pour plus d'informations et les protocoles spécifiques de l'*Auto*-LiPA, prendre contact avec un distributeur local.

Résultats

Lecture

La Figure 1 illustre la position des différentes sondes oligonucléotidiques sur les bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update Plus. Une bande est considérée positive lorsqu'une coloration violet/brun apparaît clairement à la fin de la procédure de test.

Figure 1 (voir page 15): Emplacement de la ligne de repère (ligne marron sur la bandelette 1 et ligne jaune sur la bandelette 2), de la bande contrôle Conjugué (conj. control), de la bande contrôle HLA-B Update Plus (HLA-B control) et des 66 sondes de séquences ADN spécifiques sur les bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update Plus.

Validation

- Inclure un contrôle négatif et le contrôle LiPA (pour INNO-LiPA HLA-B Update Plus) lors de chaque série. Comme dans toute procédure de test, il est indiqué de prévoir des contrôles positifs et négatifs supplémentaires jusqu'à acquisition d'une précision satisfaisante dans l'exécution de la procédure de test. Il est conseillé d'utiliser un ADN de référence pour valider la qualité des conditions de test.
- Les lignes les plus à l'extrémité des bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update (Figure 1) sont les lignes de repère (marron et jaune) et permettent d'orienter correctement les bandelettes.
- La bande suivante est le contrôle d'addition des solutions de travail de Conjugué et de Substrat pendant la procédure de détection. Cette bande doit être alignée avec la bande contrôle Conjugué de la carte de lecture en plastique. Cette bande doit toujours être positive (dans le cas contraire: la bandelette ne doit pas être interprétée!) et doit être d'intensité plus ou moins similaire sur chaque bandelette d'une même série.
- La bande suivante est la bande contrôle interne d'hybridation HLA-B Update Plus (HLA-B control de la carte de lecture), qui indique si la quantité de matériel HLA-B amplifié qui a été ajoutée pour l'hybridation est adéquate ou non). Cette bande doit toujours être positive, sauf pour le contrôle négatif de l'amplification multiplex HLA-B, mais son intensité peut varier d'un échantillon à l'autre.
- Aucun contrôle négatif ne doit présenter de réactivité vis à vis d'aucune bande de la bandelette à l'exception de la bande contrôle Conjugué et de la bande contrôle interne d'hybridation pour l'amplification HLABw4.
- Le **Contrôle LiPA** pour INNO-LiPA HLA-B Update Plus doit présenter un profil de positivité pour les sondes suivantes: bandelette 1: contrôle Conjugué, Contrôle HLA-B, sondes 22 et 35; bandelette 2: contrôle Conjugué, Contrôle HLA-B, sondes 53, 56 et 57. Toutes les autres sondes doivent être négatives. Ce Contrôle est composé d'oligonucléotides biotinylés complémentaires des sondes d'hybridation mentionnées ci-dessus. Une hybridation positive de ces sondes indique une réalisation correcte de la procédure pour les étapes d'hybridation, lavage stringent, révélation et détection. Un profil différent peut mettre en évidence des problèmes tels qu'une température incorrecte d'hybridation ou un non-respect des temps ou des températures d'incubation indiqués.

- Les intensités de coloration des sondes d'une bandelette peuvent varier d'une bande à l'autre.

Interprétation

- Vérifier que le Contrôle LiPA présente le profil de réactivité attendu.
 - La bande contrôle Conjugué de la bandelette doit être alignée avec celle de la bande contrôle Conjugué présente sur la carte de lecture.
 - Vérifier d'abord la réactivité des bandes de contrôle (2 premières bandes) pour permettre la validation de chaque bandelette individuellement (voir Validation).
 - Le résultat du typage est basé sur la réactivité des sondes du kit. Une liste des caractéristiques des sondes est disponible.
 - Identifier tous les numéros des sondes réactives sur les bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update Plus et déduire le type HLA-B à l'aide du tableau de typage INNO-LiPA HLA-B Update Plus ou d'une version du logiciel d'interprétation du LiPA (voir Logiciel d'interprétation: LiRAS™).
- Le logiciel propose souvent plus de résultats que ce que ne mentionne le paragraphe « But du test »: il fournit une interprétation au niveau du groupe d'allèles, ainsi que toutes les combinaisons d'allèles possibles. Cette information, toutefois, doit être considérée comme un plus et non comme décisive.

Logiciel d'interprétation: LiRAS™

Le logiciel LiRAS™ pour INNO-LiPA HLA est destiné à faciliter l'interprétation des résultats LiPA.

Contactez votre distributeur pour obtenir sa dernière version.

Limites du test

- L'utilisation de ce produit doit être restreinte au personnel ayant reçu une formation aux techniques d'hybridation.
- Seules de bonnes pratiques de laboratoire et le strict respect des procédures spécifiées permettront une hybridation spécifique et un typage correct de l'ADN cible.
- Les bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update Plus ont été conçues pour fournir une résolution au niveau du groupe d'allèles (B*07 à B*83). Toutefois, la combinaison de certains allèles pourrait produire une combinaison de sondes non unique, et donc une réponse ambiguë de deux ou plusieurs combinaisons alléliques possibles.
- Il convient de tenir compte lors de l'interprétation des résultats que de nouveaux allèles peuvent avoir des polymorphismes situés en dehors des régions des sondes.
- Les contrôles HLA-B Update Plus sont non seulement spécifiques des allèles HLA-B, mais aussi de certains allèles HLA-A et HLA-C. Par conséquent, il se peut que les bandes contrôles HLA-B réagissent également avec des produits amplifiés HLA-A et HLA-C.

Performances

Performance du test basée sur l'utilisation de la solution d'amorces multiplex HLA-B

Les performances du test INNO-LiPA HLA-B Update ont été évaluées dans quatre laboratoires européens d'histocompatibilité sur des échantillons de routine à typer. Au total, 347 échantillons étaient analysés. L'ADN avait été extrait de sang, frais ou congelé, avec anticoagulant citrate ou EDTA. Les méthodes d'extraction incluaient la précipitation, le kit QIAamp 96 DNA blood (Qiagen), le kit Genomic DNA Purification (Promega) et Puregene (Gentra Systems). Les ADN frais ou congelés étaient amplifiés en utilisant le thermocycleur Perkin Elmer 9600 ou 9700. Les amplicons étaient conservés à 2 - 8°C ou entre -25/-15°C avant l'hybridation sur bandelettes LiPA.

Aucun échec d'amplification n'a été observé bien que, dans un centre, 2 échantillons aient dû être retestés. Les échantillons ont été testés sur *Auto-LiPA* et interprétés avec une version d'essai clinique du logiciel d'interprétation LiRAS™.

Précision

Un résultat de typage HLA-B a été obtenu pour 342 des 347 échantillons. Des reprises ont été nécessaires pour 4 échantillons dans un centre. Un échantillon n'a pu être typé, mais de l'avis de l'investigateur, la cause en était probablement une contamination ADN. Pour 4 échantillons dans un centre, aucun résultat n'a été rendu par l'investigateur, bien que, pour l'un d'entre eux, des options aient été disponibles.

La précision de typage au niveau du groupe d'allèles a été établie sur la base d'un pourcentage de résultats concordants avec d'autres méthodes disponibles (Biotest ELPHA HLA-AB LowRes Typing kit, Dynal SSP, LiPA HLA-B, sequencing, Micro SSP™, OLERUP SSP™, Biotest HLA-B SSP). Les résultats INNO-LiPA HLA-B Update ont été considérés comme concordants avec les résultats de référence si les 2 résultats étaient identiques, si les résultats INNO-LiPA HLA-B Update étaient plus spécifiques que le résultat de référence, ou si INNO-LiPA HLA-B Update démontrait une résolution inférieure mais un résultat correct comparé à la méthode de référence. La précision a été de 100% (342/342).

Résolution

(table de typage version v1.0/2001-03-31)

INNO-LiPA HLA-B Update est conçu pour une résolution des allèles HLA-B au niveau groupe d'allèles c'est à dire, à la fois au niveau sérologique large et 2ème niveau. Le groupe d'allèles est la désignation des 2 premiers chiffres après l'astérisque qui suit le nom de l'allèle selon la nomenclature HLA standard (par exemple HLA-B*07). De plus, le kit est conçu pour détecter les allèles nuls suivants: 0808N (exon 3), 1526N (exon 3) and 5111N (exon 4).

La résolution au niveau du groupe d'allèles observée au cours de l'étude a été de 92.4% (316/342).

Les ambiguïtés observées étaient: B*08xB*51 ou B*08xB*78 (8 cas), B*15xB*35 ou B*15xB*15 (2 cas), B*35xB*38 ou B*39xB*53 (2 cas), B*08xB*38 ou B*08xB*39 (2 cas), B*15xB*51 ou B*15xB*52 ou B*15xB*78 (2 cas), B*35xB*51 ou B*53xB*78 (2 cas), B*35xB*38 ou B*35xB*53 (1 cas), B*35xB*49 ou B*50xB*53 (1 cas), B*35xB*47 ou B*53xB*47 (1 cas), B*40xB*78 ou B*40xB*52 (1 cas), B*35xB*55 ou B*35xB*56 (1 cas), B*15xB*49 ou B*15xB*50 (1 cas), B*49xB*78 ou B*50xB*51 (1 cas), B*15xB*51 ou B*52xB*78 (1 cas).

Pour 6 de ces cas, il existait une ambiguïté avec les 2 méthodes (de référence et INNO-LiPA HLA-B Update). 2 ambiguïtés de la méthode de référence (6 échantillons) ont été réduites à un résultat clairement établi par INNO-LiPA HLA-B Update.

Réactivité des sondes

4 sondes ont réagi de manière faussement positive et 9 ont réagi de manière faible ou faussement négative en une ou plusieurs occasions durant l'étude.

Cette information, si absente, a été ajoutée dans le logiciel et/ou les guides pour faciliter de futures typages. La totalité des réactions faussement positives a été identifiée comme telles et un typage concordant au niveau du groupe d'allèles a pu être obtenu en utilisant le logiciel d'interprétation LIRAS™.

Consulter les guides pour des informations spécifiques sur la réactivité des sondes.

Une liste complète des spécificités des sondes et des amorces est disponible. Toutes les sondes sont conçues pour hybrider spécifiquement leur séquence complémentaire à un mésappariement près, à moins que cela ne soit précisé différemment dans la liste.

Sensibilité du test

Les résultats obtenus au cours d'une évaluation interne par dilutions sériées de 3 extraits ADN, variant de 0.01 µg/µl à 2 µg/µl, établissent que l'ADN doit avoir une concentration minimum de 0.1 µg/µl.

L'évaluation externe de performance incluait 347 échantillons ADN avec des concentrations variant de 20 à 1500 ng/µl et de pureté (A_{260nm}/A_{280nm}) ≥ 1.5 . L'ADN était dilué à une concentration comprise entre 20 ng/ml et 250 ng/ml avant amplification. Aucun échec d'amplification n'a été rencontré bien que dans un centre, 2 échantillons aient dû être retestés.

Reproductibilité

Données internes:

3 échantillons ont été testés en quadruplicate par 2 personnes différentes en méthode manuelle ou par une personne sur 2 instruments *Auto-LiPA* différents. 2 échantillons ont été analysés avec 3 lots différents au cours de 2 séries différentes. L'interprétation des résultats a été la même pour tous les échantillons. La réactivité des sondes a été comparable dans tous les cas.

Validation externe:

- La variabilité inter-lot a été établie par analyse d'un panel de compétence (5 échantillons de réactivité et d'interprétation connues) avec 2 différents lots de production de produit. Le même résultat de typage a été obtenu pour chaque échantillon indépendamment du lot utilisé.
- La variabilité inter-laboratoire a été établie à l'aide du même panel testé dans 4 centres. Chaque centre a rendu les mêmes résultats pour les 5 échantillons.

Performance du test basée sur l'utilisation de la solution d'amorce HLA-Bw4

Les performances de la Solution Amorce HLA-Bw4 du test INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus ont été évaluées en interne et dans deux laboratoires belges de typage tissulaire. Un total de 82 échantillons anonymes ont été analysés (50 échantillons en externe, 32 en interne). Tous les échantillons avaient été préalablement typés à l'aide de INNO-LiPA HLA-B Update. Les échantillons incluait 31 échantillons ambigus (18 ambiguïtés différentes) et 51 échantillons non ambigus. Tous les échantillons ambigus ont été à nouveau typés jusqu'à obtention d'un résultat unique, à l'aide de tests de typage basés sur l'ADN.

Toutes les hybridations ont été effectuées à l'aide de l'instrument *Auto-LiPA*, à l'aide du programme HLA56v3, et l'interprétation a été réalisée à l'aide d'une version d'essai clinique du logiciel d'interprétation LiRAS™ pour LiPA HLA v3.00.

Sensibilité du test

La sensibilité du test au niveau du groupe d'allèles a été définie comme le nombre de résultats de typage réussis par rapport au nombre total d'échantillons testés.

La sensibilité du test dans cette évaluation, après une répétition du test d'amplification pour quatre échantillons, était de 98,8% (81/82; 95% CI [93,4%; 100%]).

L'échantillon dont l'amplification a échoué après répétition du test dans le centre, a été correctement amplifié en interne et un résultat de typage correct a été obtenu.

Précision du diagnostic

Le calcul de la précision du diagnostic n'a été effectué que sur les échantillons qui ont été correctement amplifiés et qui présentaient un résultat de référence unique. Deux échantillons ont donc été exclus de ce calcul.

Un résultat de typage HLA-B unique a été obtenu pour les 80 échantillons restants.

La précision du diagnostic du test au niveau du groupe d'allèles a été définie comme le nombre de résultats de typage obtenus correctement comparé au résultat de typage unique obtenu à l'aide de INNO-LiPA HLA-B Update (Innogenetics) ou d'un

autre test de typage (Olerup SSP (GenoVision), SBT (Abbott), Biotest HLA-B SSP (Biotest), Allset⁺ HLA-B Low Resolution (DynaL) et d'un séquençage (en interne).

Les résultats du typage des 80 échantillons correspondant au test de référence, la précision du diagnostic était donc de 100% (80/80; 95% CI [95.5%; 100%]).

Résolution

(tableau de typage v.1.4/031010)

La Solution Amorce HLA-B Multiplex utilisée en combinaison avec les bandelettes INNO-LiPA HLA-B Update est destinée au typage des allèles HLA-B au niveau du groupe d'allèles.

La Solution Amorce HLA-Bw4 utilisée en combinaison avec la bandelette 1 INNO-LiPA HLA-B Update est destinée à résoudre les ambiguïtés les plus fréquentes, c'est-à-dire les ambiguïtés impliquant les allèles Bw4/Bw6.

Toutes les ambiguïtés, au niveau du groupe d'allèles, observées après le test à l'aide de la Solution Amorce HLA-B Multiplex ont été réduites à un résultat de typage non ambigu à l'aide de la Solution Amorce HLA-Bw4: B*08, B*38 ou B*08, B*39 (2 cas); B*08, B*51 ou B*08, B*78 (4 cas); B*13, B*49 ou B*13, B*50 (2 cas); B*15, B*38 ou B*15, B*39 (1 cas); B*15, B*51 ou B*15, B*52 ou B*15, B*78 (1 cas); B*15, B*51 ou B*15, B*52 ou B*15, B*78 ou B*35, B*52 (1 cas); B*35, B*38 ou B*39, B*53 (4 cas); B*35, B*40 ou B*40, B*53 (1 cas); B*35, B*47 ou B*47, B*53 (1 cas); B*35, B*49 ou B*50, B*53 (2 cas); B*35, B*52 ou B*53, B*78 (2 cas); B*38, B*44 ou B*39, B*44 (1 cas); B*38, B*50 ou B*39, B*49 (1 cas); B*38, B*78 ou B*39, B*51 (1 cas); B*40, B*49 ou B*40, B*50 (2 cas); B*41, B*53 ou B*42, B*53 (1 cas); B*44, B*49 ou B*44, B*50 (2 cas).

Pour tous les résultats ambigus, le logiciel d'interprétation LiRAS™ a conseillé de procéder à une amplification Bw4 suivie d'une hybridation à l'aide de la bandelette 1 INNO-LiPA HLA-B Update.

Réactivité des sondes

A une ou plusieurs occasions au cours de cette étude, certaines sondes ont donné des réactions faibles. Un typage concordant au niveau du groupe d'allèles a été obtenu lorsque le logiciel d'interprétation LiRAS™ a été utilisé.

Précision

La répétabilité (intra-essai), la variation inter-essais et inter-personnes ont été évaluées en interne. Un échantillon, amplifié en double à l'aide de trois cycles différents et en traitant deux séries par cycleur, a été testé à l'aide de l'instrument Auto-LiPA. Ce protocole a été exécuté en double par deux personnes différentes.

Aucune variation significative n'a été observée et un résultat de typage identique a été obtenu dans tous les cas, sans besoin d'édition.

Deutsch

Verwendungszweck

Bei dem INNO-LiPA HLA-B Update Plus handelt es sich um einen „line probe assay“ für die *in vitro*-Verwendung, zur molekularen Typisierung von Humanen Leukozyten-Antigen-(HLA)B-Allelen auf Allelgruppenniveau.

Funktionsweise des Tests

Der INNO-LiPA HLA-B-Typisierungstest basiert auf dem Prinzip der reversen Hybridisierung. Amplifizierte biotinyliertes DNA-Material wird chemisch denaturiert und die separierten Stränge werden mit spezifischen Oligonukleotid-Sonden hybridisiert, die als Parallellinien auf beschichtete Membranstreifen aufgetragen wurden. Anschließend wird ein Waschschritt

mit Stringent-Waschlösung vorgenommen, um unspezifisch gebundenes Amplifikat zu entfernen. Nach diesem Waschschriff mit Stringent-Waschlösung wird mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin hinzugefügt und dieses bindet dann die zuvor gebildeten biotinylierten Hybride. Die Inkubation mit einer Substratlösung, die Chromogen enthält, führt zur einem violett/braunen Niederschlag. Die Reaktion wird durch einen Waschvorgang gestoppt und das Reaktionsmuster der Sonden wird interpretiert.

Zusätzlich zu dem INNO-LiPA HLA-B Update Plus ist ein Amplifikations-Kit (INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) verfügbar, mit dem die standardisierte Vorbereitung von biotinyliertem Amplifikationsmaterial möglich ist. Der Amplifikations-Kit basiert auf der Polymerasekettenreaktion (PCR* = polymerase chain reaction).

Die Amplifikationsprodukte werden anschließend mit 66 sequenzspezifischen DNA-Sonden und 2 Kontrolllinien hybridisiert, die sich auf zwei Typisierungstreifen befinden (Abbildung 1).

* *Die Verwendung dieses Produktes ist durch eine Lizenz von F. Hoffmann - La Roche Ltd und Roche Molecular Systems, Inc. gedeckt.*

INNO-LiPA HLA-B Update Plus: Die einzelnen Schritte

- | | |
|-----------|---|
| Schritt 1 | Multiplex-Amplifikation von Exon 2 bis 4 der HLA-B-Allele. |
| Schritt 2 | Hybridisierung und Waschschriff mit Stringent-Waschlösung mit 67 Proben, die auf zwei INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Streifen (56°C) aufgetragen wurden. |
| Schritt 3 | Farbentwicklung. |
| Schritt 4 | Auswertung des Sondenreaktionsmusters. |
| Schritt 5 | Falls erforderlich, rät die LiRAS™ Interpretation Software zu einem weiteren Amplifikations- und Hybridisierungsschriff. |

Bei der Verwendung des INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Kits wird empfohlen, mit Punkt (a) zu beginnen und dann mit Punkt (b) fortzufahren, falls Widersprüchlichkeiten im Hinblick auf Bw4/Bw6-Allele auftreten. Dies wird von der LiRAS™ Interpretation Software empfohlen.

- die Amplifikation von Exon 2, 3 und 4 der HLA-B-Allele mit der HLA-B Multiplex Primerlösung vor der Analyse mit den INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Streifen 1 und 2.
- gruppenspezifische Amplifikation von Exon 2 der HLA-Bw4-Allele mit der HLA-Bw4 Primerlösung vor der Analyse mit dem INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Streifen 1. Die mitgelieferte Primerlösung HLA-Bw4 amplifiziert Exon 2 der HLA-Bw4-Allele. Exon 2 der anderen HLA-B-Allele wird nicht amplifiziert, außer Exon 2 der Allele B*4411, B*4703 und B*5708.

Der INNO-LiPA HLA-B Update Plus wurde für eine bestmögliche Auflösung auf Allelgruppenebene (d.h., die ersten zwei Stellen nach dem Sternchen einer Allelbezeichnung, gemäß Standard-HLA-Nomenklatura, z. B. HLA-B*07) entworfen, unter Verwendung des reversen Hybridisierungstestformats.

Zusätzlich zur Allelgruppeninterpretation nennt die Software alle möglichen Allelkombinationen. Diese Informationen sollten jedoch als Zusatzinformation und nicht als ausschlaggebend berücksichtigt werden.

Reagenzien

Beschreibung, Vorbereitung und empfohlene Lagerung und Haltbarkeit

- Werden die Reagenzien geöffnet oder ungeöffnet bei 2 - 8°C und in den Originalfläschchen gehalten bzw. gelagert, bleiben sie bis zum Verfallsdatum des Kits stabil. Reagenzien nicht einfrieren. Verwenden Sie den Kit nicht nach Überschreitung des Verfalldatums.
- Der Kit muss getrennt von allen Quellen kontaminierender DNA, insbesondere von Amplifikationsprodukten, gelagert werden.

- Alle Reagenzien sollten ca. 60 Minuten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25°C) gebracht werden und müssen unmittelbar nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank gelegt werden.
- Veränderungen im Aussehen der im Kit enthaltenen Komponenten können auf eine Instabilität oder Verschlechterung der Qualität der Substanzen hinweisen.
- Um ein Einrollen der Teststreifen vor dem Gebrauch zu verhindern, wird empfohlen, das Röhrchen horizontal zu lagern.

Gelieferte Reagenzien:

Komponente	Menge	Ref.	Beschreibung
Streifen 1	1 x 20	58188	Enthält 20 Streifen für INNO-LiPA HLA-B Update Plus, markiert mit einer braunen Markierungslinie.
Streifen 2	1 x 20	58189	Enthält 20 Streifen für INNO-LiPA HLA-B Update Plus, markiert mit einer gelben Markierungslinie.
LiPA-Kontrolle	1 x 0.05 ml	58190	Enthält Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 0.01% Methylisothiazolon (MIT)/ 0.1% Chloroacetamid (CAA) als Konservierungsmittel.
Denaturierungslösung	1 x 1 ml	56718	Alkalische Lösung mit EDTA. Das Fläschchen muss direkt nach dem Gebrauch wieder verschlossen werden; längerer Kontakt mit Luft verschlechtert innerhalb kurzer Zeit die Denaturierungsstärke.
Hybridisierungslösung	2 x 80 ml	56719	Natriumphosphat-EDTA (SSPE)-Puffer mit 0.5% Natriumdodezylsulfat (SDS). Die Hybridisierungslösung muss auf mindestens 37°C erwärmt werden, darf aber 56°C nicht übersteigen (alle Kristalle müssen sich vor dem Gebrauch aufgelöst haben).
Stringent-Waschlösung	2 x 200 ml	56720	SSPE-Puffer mit 0.1% SDS. Die Stringent-Waschlösung muss auf mindestens 37°C erwärmt werden, darf aber 56°C nicht übersteigen (alle Kristalle müssen sich vor dem Gebrauch aufgelöst haben).
Konjugatverdünner	1 x 150 ml	55671	Phosphatpuffer mit NaCl, Triton®, Proteindestabilisatoren und 0.01% MIT/0.1% CAA als Konservierungsmittel.
100x konzentriertes Konjugat	1 x 1.5 ml	56716	Mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin in Tris-Puffer mit Proteindestabilisatoren und 0.01% MIT/ 0.098% CAA als Konservierungsmittel, muss vor dem Gebrauch im Verhältnis 1:100 mit Konjugatverdünner verdünnt werden. Bereiten Sie 2 ml Konjugatarbeitslösung für jede Testwanne vor + 2 ml Überschuss (Konjugatarbeitslösung kann während des Waschvorgangs mit Stringent-Waschlösung vorbereitet werden) für das manuelle Testen. Für den <i>Auto</i> -LiPA stellen Sie bitte 10 ml Überschuss her. Die Konjugatarbeitslösung bleibt bei Raumtemperatur (20 - 25°C) für 24 Stunden stabil, wenn sie im Dunkeln gelagert wird.
Substratpuffer	1 x 235 ml	55732	Phosphatpuffer mit NaCl, MgCl ₂ und 0.01% MIT/0.1% CAA als Konservierungsmittel.

100x konzentriertes BCIP/NBT-Substrat	1 x 1.5 ml	55723	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) und 4-Nitroblau-Tetrazolium (NBT) in Dimethylformamid (DMF). Vor Gebrauch 1:100 mit Substratpuffer verdünnen. Bereiten Sie 2 ml Substratgebrauchslösung für jede Testwanne vor + 2 ml Überschuss (Substratgebrauchslösung kann während der Konjugatinkubation vorbereitet werden) für das manuelle Testen. Für den <i>Auto</i> -LiPA stellen Sie bitte 10 ml Überschuss her. Die Substratgebrauchslösung bleibt bei Raumtemperatur (20 - 25°C) für 24 Stunden stabil, wenn sie im Dunkeln gelagert wird.
5x konzentrierte Spüllösung	2 x 80 ml	56721	Phosphatpuffer mit NaCl, Triton®, und 0.05% MIT/0.48% CAA als Konservierungsmittel, vor Gebrauch mit destilliertem oder deionisiertem Wasser 1/5 (1 Teil + 4 Teile) verdünnen. 8 ml Spüllösung für jede Testwanne vorbereiten + 10 ml Überschuss. Für den <i>Auto</i> -LiPA stellen Sie bitte 20 ml Überschuss her. Die Spülarbeitslösung bleibt bei einer Temperatur von 2 - 8°C für 2 Wochen stabil.
Halter für Inkubationswanne	5	-	Enthält jeweils 8 Wannen.
Ableseschablone	1	-	Für die Identifizierung positiver Sonden.
Datenblatt	2	-	Für die Aufbewahrung entwickelter Teststreifen.

Zusätzliche benötigte Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

- Wasserbad mit Schüttelvorrichtung (80 U/min mit geneigtem Deckel, Temperatur einstellbar auf 56°C ± 0.5°C).
- Absaugvorrichtung.
- Kalibriertes Thermometer.
- Orbitalschwenker, Horizontal- oder Wippschüttler.

Empfehlungen:

Für den Orbitalschüttler:

- schwingungsdurchmesser: mindestens 13 mm oder höher
- empfohlene Geschwindigkeit: 160 U/min bei einem Schwingungsdurchmesser von 13 mm.

Empfehlungen für einen Rüttelschüttler:

- empfohlene Geschwindigkeit für die Rüttelbewegung ist 80 Bewegungen pro Minute.

Empfehlungen für den Horizontalschüttler:

- die Neigungswinkel darf 13° nicht überschreiten, um ein Überlaufen der Flüssigkeit zu vermeiden
- empfohlene Schüttelgeschwindigkeit: 50 U/min.
- Vortex-Mixer oder gleichwertiges Instrument.
- Messzylinder (10, 25, 50 und 100 ml).
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Einweghandschuhe.
- Sterile Einwegpipettenspitzen (vorzugsweise mit Wattestopfen).
- Pinzette zum Entnehmen der Streifen.
- Einstellbare Pipetten für die Volumina 1 - 20 µl, 20 - 200 µl, und 200 - 1000 µl.
- Dispensier-Multipipette (Eppendorf, optional).
- Laborwecker, 2 Stunden (± 1 Minute).

Sicherheits- und Umwelthinweise

- Bitte beachten Sie die Sicherheitsdatenblätter des Herstellers und die Produktkennzeichnung bezüglich potenziell gefährlicher Substanzen.



R20/21, R36, R45, R61, S36/37, S45-53

Giftig! (T) Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei der Berührung mit der Haut. Reizt die Augen. Kann Krebs erzeugen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Verwendung nur durch ausgebildetes Personal.

Enthält Dimethylformamid: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz: 100x konzentriertes BCIP/NBT-Substrat.



R43, S24-37

Reizend! (Xi) Hautkontakt vermeiden. Kann bei Hautkontakt Sensibilisierung verursachen. Geeignete Schutzhandschuhe tragen. **Enthält 2-Chloracetamid:** Spüllösung, Substratpuffer, Konjugatverdünner und LiPA-Kontrolle.



R36/38, S23-24-26

Reizend! (Xi) Reizt Augen und Haut. Dampf nicht einatmen. Hautkontakt vermeiden. Bei Berührung mit den Augen sofort mit viel Wasser abspülen und Arzt konsultieren. **Enthält Natriumhydroxid:** Denaturierungslösung.

- Alle Proben sollten als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend behandelt werden. Daher sollten alle Blutbestandteile und biologischen Materialien als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend behandelt werden. Der Test darf nur von hinreichend ausgebildetem medizinischem Personal durchgeführt werden. Alle Blutbestandteile und das biologische Material müssen in Übereinstimmung mit den entsprechenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
 - Mindestens 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.
 - Einmalmaterial verbrennen.
 - Flüssigen Abfall mit Natriumhypochlorit zu einer Endkonzentration von ± 1% Natriumchlorit mischen. Vor der Entsorgung über Nacht wirken lassen. **VORSICHT:** Säurehaltigen Flüssigabfall vor Zugabe von Natriumhypochlorit neutralisieren.
- Bei der Arbeit mit potentiell gefährlichen oder infektiösen Materialien: geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Abfälle müssen entsprechend den Abfallbeseitigungsvorschriften der jeweiligen Einrichtung entsorgt werden. Darüber hinaus müssen alle staatlichen und örtlichen Umweltbestimmungen eingehalten werden.

Herstellung der Proben

Da der LiPA-Test biotinyliertes, amplifiziertes DNA-Material als Probe verwendet, steht ein Amplifikations-Kit zur Verfügung, der INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus.

Handhabung

Handhabung der Teststreifen

- Die Teststreifen können nur einmal verwendet werden!
- Die Teststreifen nicht mit bloßen Händen berühren; immer Pinzetten verwenden.
- Bitte einen **Bleistift** für die Identifizierung der Teststreifen verwenden. Keine Kugelschreiber, etc. verwenden. Schreiben Sie die ID oberhalb der Markierungslinie auf die Streifen.
- Während der verschiedenen Inkubationsschritte müssen die Teststreifen immer in derselben Wanne verbleiben.
- Unbenutzte und entwickelte Teststreifen dürfen nicht direktem Sonnenlicht oder Hitze ausgesetzt werden.
- Lassen Sie die entwickelten Streifen vor der Auswertung, Abdeckung und Lagerung vollständig trocknen.
- Entwickelte Teststreifen sollten vorzugsweise im Dunklen bei 20 - 25°C gelagert werden.
- Wannens nicht mehrmals benutzen.

Hinweise zur manuellen Inkubation

- Die Inkubation bei $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ während der Hybridisierung und des Waschvorgangs mit Stringent-Waschlösung stellt den entscheidenden Schritt dar, um falsch-positive Banden (Temperatur zu niedrig) oder falsche negative/sehr schwache Banden (Temperatur zu hoch) zu vermeiden. Ein Schüttelwasserbad mit **geneigtem** Deckel gestattet eine gute Kontrolle der Temperaturvariationen. Eine strenge Temperaturkontrolle mit einem kalibrierten Thermometer ist erforderlich.
- Die Klappe des Wasserbades während der Inkubation immer **verschlossen** halten, um falsch-positive Banden zu vermeiden.
- **Keinen Heißluftinkubator** für die Hybridisierung und den Waschvorgang mit Stringent-Waschlösung **verwenden**.
- Für die Hybridisierung und den Waschvorgang mit Stringent-Waschlösung müssen die Wannens auf die Schüttelvorrichtung des Wasserbades gelegt werden. Den Wasserstand auf 1/3 bis 1/2 der Höhe der Wanne einstellen. Sicherstellen, dass die Wannens nicht auf dem Wasser schwimmen. Das Wasser muss in direktem Kontakt mit den Wannens sein.
- Die Inkubationsschritte für die Farbentwicklung müssen bei 20 - 25°C durchgeführt werden. Liegt die Temperatur unter 20°C werden ggf. schwächere Resultate erzielt. Liegt die Temperatur über 25°C, entstehen ggf. starke Hintergründe und/oder falsch-positive Banden.
- Halten Sie die angegebenen Inkubationszeiten exakt ein.
- Die Schüttelamplitude von Wasserbad (Hybridisierung) und Schüttler (Farbentwicklungsverfahren) ist wichtig, um eine maximale Sensitivität und eine homogene Einfärbung zu erhalten. Die Teststreifenoberfläche muss vollständig untergetaucht sein. Die Amplitude muss so hoch wie möglich sein. **Es sollte jedoch ein Überlaufen der Flüssigkeit über die Ränder der Wannens vermieden werden.** Dies kann zu einer Kontaminierung und zu ungültigen Ergebnissen führen.
- Das Schütteln während der Inkubation der Teststreifen sollte so durchgeführt werden, dass sowohl die Flüssigkeit als auch die Teststreifen in der Wanne hin- und herbewegt werden, jedoch ohne dass die Flüssigkeit über die Wannensränder läuft.
- Die Inkubationswannens nicht abdecken. Während der Hybridisierung und des Waschvorgangs mit Stringent-Waschlösung können die Wannens im Wasserbad ohne Abdeckung verbleiben. Das Abdecken der Wannens mit Abklebefolie für Mikrotiterplatten kann zu einer Kreuzkontamination führen.

Anleitung für das manuelle Auswechseln der Flüssigkeit in den Wannern

- Die Flüssigkeit wird mittels einer Pipette aus den Wannern entnommen, vorzugsweise sollte die Pipette an eine Vakuumpumpe angeschlossen sein. Die Wanne wird so geneigt, dass die Flüssigkeit sich an einem Ende der Wanne sammelt.
- Geben Sie in jede Wanne 2 ml der entsprechenden Lösung und befolgen Sie das Protokoll. Eine Dispensier-Multipipette (Eppendorf) ist für diesen Zweck hilfreich.
- Diesen Schritt so oft wiederholen, wie in der Testanleitung angegeben.

HINWEIS:

- Die Streifen dürfen zwischen den zwei Schritten nicht antrocknen.
- Darauf achten, dass die Oberfläche der Teststreifen beim Absaugen der Flüssigkeit nicht beschädigt wird. Die Flüssigkeit am oberen Ende des Teststreifens oberhalb der Markierungslinie absaugen.
- Sicherstellen, dass die gesamte Flüssigkeit abgesaugt wurde.
- Damit effizientes Waschen gewährleistet ist, müssen die Streifen vollständig in die Lösung eingetaucht werden.
- Wenn nötig, die Geschwindigkeit des Schüttlers anpassen.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Darf nur von Fachpersonal verwendet werden.
- Um eine DNA-Kontamination zu vermeiden, wird eine maximale räumliche Trennung zwischen den prä- und post-Amplifikationsschritten empfohlen. Separate Räume, separate Pipetten und anderes Labormaterial, separate Laborkittel und -handschuhe (und des entsprechenden Vorrats) sind die Mindestvoraussetzungen für eine gute Laborpraxis.
- Vermeiden Sie einen Wechsel zwischen dem post-Amplifikationsraum und dem prä-Amplifikationsraum.
- Die Verwendung von autoklaviertem Einweglabormaterial wird empfohlen.
- Einweglabormaterial nicht mehrmals verwenden.
- Verwenden Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze.
- Verwenden Sie den Kit nicht nach Überschreitung des Verfalldatums.
- Keine Reagenzien unterschiedlicher Kits mischen, es sei denn, die Bestandteile weisen dieselbe Chargennummer auf.
- Vermeiden Sie mikrobielle Kontamination der Reagenzien.

Manuelles Testverfahren

HINWEIS:

- Während der verschiedenen Inkubationsschritte müssen die Teststreifen immer in derselben Wanne verbleiben.

Überprüfen Sie vor der Inkubation die Temperatur des Wasserbads mit einem kalibrierten Thermometer und passen Sie die Temperatur, wenn erforderlich, an, bevor die Wannern in das Wasserbad gelegt werden. Deckel des Wasserbads immer schließen.

Die LiPA-Kontrolle sollte in jeden Testlauf integriert werden.

Proben

1. HLA-B Amplifikationsprodukt (10 µl verwenden). Für die Vorbereitung der Probe: siehe INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus-Gebrauchsanleitung.
HINWEIS:
 - Sicherstellen, dass exakt 10 µl der amplifizierten Probe hinzugefügt werden. Eine zu große oder zu geringe Probenmenge kann zu einem falschen Typisierungsergebnis führen.
2. LiPA-Kontrollprobe für INNO-LiPA HLA-B Update Plus (10 µl verwenden; **Amplifikation ist nicht erforderlich!**).
3. Leere amplifizierte Kontrollproben (Negativkontrolle, 10 µl verwenden).

Denaturierung und Hybridisierung

1. Schüttelwasserbad auf $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ erwärmen. Temperatur mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen und Temperatur anpassen, wenn erforderlich. Die vorgeschriebene Temperatur nicht überschreiten. Die Hybridisierungslösung und die Stringent-Waschlösung in einem Wasserbad auf mindestens 37°C vorwärmen, aber 56°C nicht überschreiten. Vor Gebrauch mischen. Alle Kristalle müssen vollständig aufgelöst sein.
2. Mittels Pinzette die erforderliche Anzahl von INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Streifen 1 und Streifen 2 aus dem Röhrchen entnehmen (einen Streifen 1 und einen Streifen 2 pro Testprobe für den INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus, einen Streifen 1 für das INNO-LiPA HLA-Bw4-Amplifikat). Nehmen Sie beide Streifen für die LiPA-Kontrollprobe des INNO-LiPA HLA-B Update Plus und für die amplifizierten Leerproben. Schreiben Sie mit Bleistift eine Identifizierungsnummer oberhalb der braunen/gelben Markierungslinie auf die Streifen.
3. Die erforderliche Anzahl von Testwannen entnehmen (zwei Testwannen pro Testprobe für HLA-B Multiplex Plus und eine Wanne pro Testprobe für HLA-Bw4) und in den Halter setzen.
4. Füllen Sie mit einer Pipette $10\ \mu\text{l}$ Denaturierungslösung in die obere Ecke jeder Wanne.

HINWEIS:

- Schließen Sie das Fläschchen unmittelbar nach Gebrauch.
5. $10\ \mu\text{l}$ Probe hinzufügen (siehe Proben; siehe Anleitung für die Verwendung des INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren mischen. Immer sterile Pipettenspitzen verwenden. Denaturieren Sie die DNA für **5 Minuten** bei $20 - 25^{\circ}\text{C}$.
 6. Schütteln Sie die vorgewärmte Hybridisierungslösung und geben Sie **vorsichtig** $2\ \text{ml}$ hiervon zu dem denaturierten Amplifikationsprodukt in jede Wanne. Durch sanftes Schütteln mischen. Achten Sie darauf, während des Pipettierens keine benachbarten Wannern zu kontaminieren.
 7. Legen Sie den Teststreifen umgehend in die Wanne. Die Teststreifen müssen vollständig in die Lösung eingetaucht sein.

HINWEIS:

- Einweghandschuhe tragen und Pinzette verwenden.
8. Wannern in ein Schüttelwasserbad mit einer Temperatur von $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ($80\ \text{U/min}$ für die manuelle Inkubation) stellen, schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie für **30 Minuten**.

HINWEIS:

- Achten Sie darauf, dass kein Wasser vom Wasserbad in die Wanne spritzt. Den Wasserstand auf $1/3$ bis $1/2$ der Höhe der Wanne einstellen. Um ein Verrutschen der Wannern zu vermeiden, den Wannernbehälter zwischen zwei schweren Gewichten fixieren.

Stringent-Waschlösung-Schritt

1. Nach der Hybridisierung die Wannern aus dem Wasserbad nehmen.
2. Die Wanne leicht geneigt halten und die Flüssigkeit mittels einer Pipette, die vorzugsweise an eine Vakuumpumpe angeschlossen ist, aus den Wannern absaugen. $2\ \text{ml}$ vorgewärmte Stringent-Waschlösung in jede Wanne geben; die Schale in ein $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad legen, Deckel schließen und für **3 Minuten** inkubieren.
3. Nach der Inkubation die Schale aus dem Wasserbad nehmen und die Flüssigkeit aus der Wanne absaugen.
4. Den **3-minütigen** Inkubationsschritt und das Absaugen einmal wiederholen.
5. Abschließend $2\ \text{ml}$ vorgewärmte Stringent-Waschlösung in jede Wanne geben und den Halter in ein $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad stellen, Deckel schließen und für **4 Minuten** inkubieren.

Vor der Inkubation die Temperatur des Wasserbads mit einem kalibriertem Thermometer überprüfen und die Temperatur anpassen, wenn erforderlich. Deckel des Wasserbads immer schließen.

HINWEIS:

- Während des Waschvorgangs mit Stringent-Waschlösung die konzentrierte Spüllösung 1:5 und das Konjugat 1:100 verdünnen. Siehe Reagenzien.

Farbentwicklung

Alle nachfolgenden Inkubationen werden bei **20 - 25°C auf einem Schüttler durchgeführt**. Während der Inkubationen sollten die Flüssigkeit und die Teststreifen in der Wanne hin und her bewegt werden, um eine homogene Färbung zu erzielen.

1. Waschen Sie jeden Teststreifen für 1 Minute mit 2 ml der Spülarbeitslösung (siehe Anleitung für das Auswechseln der Flüssigkeiten in den Wannen).
2. 2 ml der Konjugatsarbeitslösung in jede Wanne geben und für **30 Minuten** inkubieren, wobei die Schale auf dem Schüttler bewegt wird.

HINWEIS:

- Die Substrat BCIP/NBT 100x-Lösung ca. 10 Minuten vor dem Ende der Konjugatinkubation verdünnen. Siehe Reagenzien.
3. Jeden Teststreifen zweimal für **1 Minute** mit 2 ml der Spülarbeitslösung spülen und anschließend nochmals mit 2 ml Substratpuffer waschen.
 4. 2 ml der Substratgebrauchslösung in jede Wanne geben und für **30 Minuten** inkubieren, wobei die Schale auf dem Schüttler bewegt wird.

ACHTUNG:

- Handschuhe und Schutzbrille tragen.
5. Die Farbentwicklung durch zweimaliges Waschen der Teststreifen mit 2 ml destilliertem Wasser stoppen, während die Schale auf einem Schüttler für mindestens **3 Minuten** bewegt wird.
 6. Mittels Pinzette die Streifen aus den Wannen nehmen und sie auf absorbierendes Papier legen. Die Teststreifen vollständig trocknen lassen, bevor Sie die Resultate ablesen. Die entwickelten und trockenen Teststreifen im Dunkeln lagern.

Automatisches Testverfahren: Auto-LiPA

Das LiPA-Testverfahren eignet sich hervorragend für eine Automatisierung. Daher wurde der *Auto-LiPA* entwickelt, der in der Lage ist, die Schritte Hybridisierung, Waschvorgang mit Stringent-Waschlösung und Farbentwicklung vollständig automatisiert durchzuführen. Der *Auto-LiPA* kann ohne Überwachung arbeiten; Heizen, Kühlen, Pipettieren werden automatisch durchgeführt.

Das Standard-*Auto-LiPA*-Protokoll beschreibt die Testung von bis zu 24 Proben, wenn jeweils ein Streifen pro Inkubationswanne verwendet wird. Diese Anzahl kann allerdings auf maximal 48 Proben erhöht werden. Dazu werden zwei Teststreifen für denselben HLA-Locus jeweils in einer Inkubationswanne inkubiert, wobei alle anderen Parameter des Protokolls gleich bleiben. Beachten Sie, daß möglicherweise schwächere Sondenreaktivität beobachtet werden kann. Daher sollten alle Kunden, die beabsichtigen, die Anzahl der Proben pro *Auto-LiPA*-Lauf zu erhöhen, dieses "2-Streifen-in-einer-Inkubationswanne"-Protokoll in dem jeweiligen Labor validieren.

Weitere Informationen und spezifische Protokolle für den *Auto-LiPA* können Sie bei Ihrer lokalen Vertretung erfragen.

Ergebnisse

Ablesen

Abbildung 1 zeigt die Position der verschiedenen Oligonukleotidsonden auf den INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Teststreifen. Eine Linie gilt als positiv, wenn ein klares violett-braunes Band am Ende des Testverfahrens zu erkennen ist.

Abbildung 1 (siehe Seite 15) Position der Markierungslinie (braune Linie auf Teststreifen 1 und gelbe Linie auf Teststreifen 2), der Konjugatkontrolllinie (conj. control), der HLA-B Update Plus-Kontrolllinie (HLA-B control) und der 66 sequenzspezifischen DNA-Sonden auf den INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Teststreifen.

Validierung

- Bei jedem Test eine Negativkontrolle und eine LiPA-Kontrolle (für INNO-LiPA HLA-B Update Plus) hinzufügen. Wie bei jedem neuen Testverfahren ist das Hinzufügen einer zusätzlichen Positiv- und Negativkontrolle ratsam, bis eine hohe Zuverlässigkeit bei der Durchführung des Testverfahrens gewährleistet ist. Es wird geraten, Referenz-DNA zu verwenden, um sicherzustellen, dass angemessene Testbedingungen eingehalten wurden.
- Die obersten Linien auf den INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Streifen (Abbildung 1) sind die Markierungslinien (braune und gelbe Linie). Diese Linien ermöglichen die korrekte Ausrichtung des Teststreifens.
- Anhand der nächsten Linie wird die Zugabe von reaktivem Konjugat und von Substratgebrauchslösung während des Nachweisverfahrens kontrolliert. Diese Linie muss an der Konjugatkontrolllinie auf der Kunststoffableseschablone ausgerichtet werden. Diese Linie muss immer positiv sein (falls nicht: sollte keine Auswertung vorgenommen werden!) und sollte bei demselben Testlauf auf jedem Streifen nahezu dieselbe Intensität aufweisen.
- Die nachfolgende Linie ist die HLA-B Update Plus interne Hybridisierungskontrolllinie (HLA-B-Kontrolle auf der Aableseschablone), die anzeigt, ob eine ausreichende Menge an HLA-B-amplifiziertem Material für die Hybridisierung zugefügt wurde. Diese Linie muss immer positiv sein, außer bei der Negativkontrolle der HLA-B Multiplex-Amplifikation, ihre Intensität kann jedoch von Probe zu Probe variieren.
- Das Testergebnis jeder Negativkontrolle sollte keine sichtbare Bande für eine der Linien auf dem Streifen aufweisen, außer für die HLA-Bw4-Amplifikation, bei der die interne Hybridisierungskontrolllinie (HLA-B Kontrolle) ebenfalls positiv ist.
- Die **LiPA-Kontrollprobe** für INNO-LiPA HLA-B Update Plus muss das folgende Muster an positiven Sonden aufweisen. Teststreifen 1: Konjugatkontrolle, HLA-B Kontrolle, 22 und 35; Teststreifen 2: Konjugatkontrolle, HLA-B Kontrolle, 53, 56 und 57. Jede andere Sonde muss negativ sein. Diese Kontrollprobe besteht aus biotinylierten Oligonukleotiden, die komplementär sind zu den bereits erwähnten Hybridisierungssonden. Eine positive Hybridisierung bei diesen Sonden zeigt deshalb eine zufriedenstellende Durchführung des Tests an, einschließlich Hybridisierung, Stringent-Waschlösung-Schritt, Farbentwicklung und Nachweis. Ein anderes Muster kann Testprobleme aufzeigen, wie z.B. falsche Temperatur während der Hybridisierung oder Abweichungen von den vorgeschriebenen Inkubationszeiten oder der Temperatur.
- Die Farbintensität der Banden auf dem Streifen kann variieren.

Interpretation der Ergebnisse

- Auf korrektes Reaktivitätsmuster der LiPA-Kontrollprobe prüfen.
- Die Konjugatkontrolllinie auf dem Streifen muss an der Markierungslinie auf der Kunststoffableseschablone ausgerichtet werden.
- Prüfen Sie zuerst, ob die Kontrolllinien positiv sind (ersten zwei Linien), um jeden einzelnen Teststreifen zu validieren (siehe Validierung).
- Typisierungsergebnisse basieren auf der Reaktivität der Sonden im Kit. Eine Liste der Sondenspezifikationen ist erhältlich.
- Alle Sondennummern identifizieren, die auf den INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Teststreifen positiv sind, und den HLA-B-Typ mittels der INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Typisierungstabelle oder einer Version der „LiPA Interpretation Software“ ermitteln (siehe Interpretation Software: LiRAS™). Die Software liefert häufig mehr Ergebnisse als die beabsichtigte Verwendung vermuten lässt: es wird sowohl eine Auswertung auf Allelgruppenniveau als auch aller möglichen Allelkombinationen gegeben. Diese Informationen sollten jedoch als Zusatzinformation und nicht als ausschlaggebend berücksichtigt werden.

Interpretationssoftware: LiRAS™

Die Software LiRAS™ für INNO-LiPA HLA hilft bei der Auswertung der LiPA-Ergebnisse. Bitte kontaktieren Sie Ihre lokale Vertretung für die neueste Version.

Grenzen der Methode

- Der Einsatz dieses Produktes sollte nur von Personal durchgeführt werden, das mit den Techniken der Hybridisierung vertraut ist.
- Nur gute Laborpraxis und eine vorsichtige Durchführung der beschriebenen Verfahren gestattet eine spezifische Hybridisierung und eine korrekte Typisierung der Ziel-DNA.
- Die INNO-LiPA HLA-B Update Plus-Teststreifen wurde für eine Auflösung auf Allelgruppenebene (B*07 bis B*83) entwickelt. Eine Kombination bestimmter Allele könnte jedoch zu einer nicht-einzigartigen Sondenkombination und damit zu einer mehrdeutigen Antwort für zwei oder mehrere mögliche Allelkombinationen führen.
- Neue Allele könnten Polymorphismen außerhalb der Sondenbereiche haben, dies sollte bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.
- Die HLA-B Update Plus-Kontrolllinien sind nicht für HLA-B spezifisch, sondern auch für einige HLA-A und einige HLA-C-Allele. Daher können die HLA-B-Kontrolllinien auch mit HLA-A- und HLA-C-Amplifikaten reagieren.

Leistungsfähigkeit des Tests

Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit Hilfe der HLA-B Multiplex-Primerlösung amplifiziert wurde.

Die Leistungsfähigkeit des INNO-LiPA HLA-B Update wurde in 4 europäischen Gewebetypisierungslabors an Standard-Typisierungsproben evaluiert. Insgesamt wurden 347 Proben analysiert. Aus frischem oder eingefrorenem EDTAantikoagulierten oder citrat-antikoagulierten Blut wurde die DNA extrahiert. Die Verfahren zur DNA-Extraktion umfassten Aussalzen, QIAamp 96 DNA Blutkit (Qiagen), Genomic DNA Purification Kit (Promega) und Puregene (Gentra Systems). Die frische bzw. gefrorene DNA wurde mittels Perkin Elmer 9600 oder 9700 Thermocycler amplifiziert. Vor der Applikation auf die Streifen wurde das amplifizierte Material bei 2 - 8°C oder -25/-15°C gelagert.

Es wurden keine Amplifikationsfehler festgestellt, auch wenn bei zwei Proben aus einem Zentrum der Test wiederholt werden musste.

Die Proben wurden mit dem *Auto*-LiPA-Gerät prozessiert und mit einer klinischen Studienversion der LiRAS™ Interpretationssoftware interpretiert.

Exaktheit

Ein HLA-B Typisierungsergebnis wurde für 342 der 347 Proben ermittelt. Eine Wiederholung des Tests war bei 4 Proben aus einem Zentrum erforderlich. Eine Probe ergab das Resultat „keine Typisierung ableitbar“, aber dem Prüfer zufolge war dies wahrscheinlich auf eine DNA-Kontamination zurückzuführen. Für 4 Proben aus einem Zentrum wurde von dem Prüfer kein Typisierungsergebnis vorgelegt, obwohl über ein Editing einer der Proben Optionen verfügbar waren.

Die Exaktheit auf Allelgruppenniveau wurde als prozentualer Anteil der beobachteten Konkordanz mit alternativen DNA-Assays (Biotest ELPHA HLA-AB LowRes Typisierungskit, Dynal SSP, LiPA HLA-B, Sequenzierung, Micro SSP™, OLERUP SSP™, Biotest HLA-B SSP) berechnet. Die Ergebnisse für das INNO-LiPA HLA-B Update wurden als mit dem Ergebnis des Referenzassays übereinstimmend betrachtet, wenn die zwei Resultate identisch waren, die Ergebnisse für das INNO-LiPA HLA-B Update spezifischer als das Referenzergebnis waren oder wenn die Ergebnisse für das INNO-LiPA HLA-B Update eine geringere Auflösung, aber ein korrektes Ergebnis im Vergleich mit den Referenzverfahren zeigte. Die Exaktheit betrug 100% (342/342).

Auflösung

(Typisierungstabelle Version v1.0/2001-03-31)

Der INNO-LiPA HLA-B Update wurde als Test zur Auflösung von HLA-B-Allelen auf Allelgruppenebene konzipiert, d. h. auf serologisch weiterer und engerer Ebene.

„Allelgruppe“ ist die Bezeichnung für die ersten beiden Stellen nach dem Sternchen in der HLA-Standardnomenklatur (z. B. HLA B*07). Darüber hinaus sollen mit dem Kit die folgenden Nullallele nachgewiesen werden: 0808N (Exon 3), 1526N (Exon 3) und 5111N (Exon 4).

Die während der Studie beobachtete Auflösung auf Allelgruppenebene betrug 92,4% (316/342). Die beobachteten Ambiguitäten waren

B*08xB*51 oder B*08xB*78 (8 Fälle), B*15xB*35 oder B*15xB*15 (2 Fälle), B*35xB*38 oder B*39xB*53 (2 Fälle), B*08xB*38 oder B*08xB*39 (2 Fälle), B*15xB*51 oder B*15xB*52 oder B*15xB*78 (2 Fälle), B*35xB*51 oder B*53xB*78 (2 Fälle), B*35xB*38 oder B*35xB*53 (1 Fall), B*35xB*49 oder B*50xB*53 (1 Fall), B*35xB*47 oder B*53xB*47 (1 Fall), B*40xB*78 oder B*40xB*52 (1 Fall), B*35xB*55 oder B*35xB*56 (1 Fall), B*15xB*49 oder B*15xB*50 (1 Fall), B*49xB*78 oder B*50xB*51 (1 Fall), B*15xB*51 oder B*52xB*78 (1 Fall).

In sechs dieser Fälle zeigten sowohl der Referenzassay als auch der INNO-LiPA HLA-B Update ein zweideutiges Ergebnis. Zwei mit dem Referenzverfahren beobachtete Ambiguitäten (6 Proben) wurden mit Hilfe des INNO-LiPA HLA-B Update Assays auf ein einziges eindeutiges Typisierungsergebnis reduziert.

Sondenreaktivität

In einem oder mehreren Fällen während dieser klinischen Studie reagierten vier Sonden falsch-positiv und neun Sonden schwach bis falsch-negativ. Diese Information - falls sie nicht bereits vorlag - wurde in die Software und/oder den Leitfaden integriert. Alle falschen Reaktivitäten wurden als solche erkannt, und bei einem Einsatz der LiRAS™ Interpretationssoftware wurde eine übereinstimmende Typisierung auf Allelgruppenebene erzielt.

Eingehende Informationen zur Sondenreaktivität finden Sie im Leitfaden.

Es ist eine vollständige Auflistung der Sonden- und Primerspezifitäten erhältlich. Wenn in der Liste nicht abweichend angegeben, sind alle Sonden darauf ausgerichtet, speziell mit ihrer komplementären Sequenz auf der Ebene eines „Mismatches“ zu hybridisieren.

Empfindlichkeit

Die bei einer internen Evaluation einer Verdünnungsserie dreier DNA-Proben von 0,01 µg/µl bis 2 µg/µl erzielten Ergebnisse legten die Verwendung von DNA in einer Mindestkonzentration von 0,1 µg/µl nahe.

Die externe Evaluation der Leistungsfähigkeit umfasste 347 DNA-Proben mit einer Konzentration zwischen 20 ng/µl und 1500 ng/µl und einer Reinheit (A_{260nm}/A_{280nm}) $\geq 1,5$. Die DNA wurde vor der Amplifikation auf eine Konzentration zwischen 20 ng/µl und 250 ng/µl verdünnt. Es wurden keine Amplifikationsfehler festgestellt, auch wenn bei zwei Proben aus dem Zentrum der Test wiederholt werden musste.

Präzision

Interne Daten:

Drei Proben wurden vierfach von zwei unterschiedlichen Personen manuell bzw. von einer Person auf zwei verschiedenen Auto-LiPA-Geräten getestet. Zwei Proben wurden auf drei verschiedenen Chargen in zwei unterschiedlichen Läufen analysiert. Die Interpretation der Ergebnisse war für alle Proben identisch. Die Sondenreaktivität war in allen Fällen vergleichbar.

Externe Validierung:

- Die Variabilität zwischen den Chargen wurde mittels Analyse eines proficiency panel (5 Proben mit bekannter Reaktivität und Interpretation) bei zwei verschiedenen Chargen des Produkts beurteilt. Für jede Probe wurde unabhängig von der verwendeten Charge dasselbe Typisierungsergebnis erzielt.
- Die Variabilität zwischen den Labors wurde beurteilt, indem in allen vier Einrichtungen dasselbe proficiency panel verwendet wurde. Alle Einrichtungen erzielten für die fünf Proben dasselbe Typisierungsergebnis.

Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit Hilfe der HLA-Bw4 Multiplex-Primerlösung amplifiziert wurde

Die Leistung der HLA-Bw4 Primer-Lösung des INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus wurde hausintern sowie in zwei belgischen Laboren für Gewebetypisierung bewertet. Insgesamt wurden 82 anonyme Proben analysiert (50 Proben außer Haus, 32 hausintern). Alle Proben waren zuvor mit INNO-LiPA HLA-B-Update typisiert worden. Die Proben enthielten 31 widersprüchliche (18 verschiedene Widersprüchlichkeiten) und 51 nicht widersprüchliche Proben. Alle widersprüchlichen Proben wurden weiter mit einem oder mehreren alternativen DNA-basierten Typisierungstests auf ein eindeutiges Ergebnis typisiert.

Alle Hybridisierungen wurden mit dem *Auto*-LiPA-Instrument unter Verwendung von Programm-HLA56v3, durchgeführt und die Auswertung erfolgte mittels einer klinischen Versuchsversion der LiRAS™ for LiPA HLA v3.00-Interpretationssoftware.

Testsensitivität

Die Testsensitivität des Assays auf Allelgruppenebene wurde als die Anzahl der erfolgreichen Typisierungsergebnisse berechnet, gemessen an der Gesamtzahl der getesteten Proben.

Die Testsensitivität bei dieser Evaluierung, nach einem wiederholten Amplifikationstest bei vier Proben, lag bei 98,8% (81/82; 95% CI [93,4%; 100%]). Die Probe, bei der die Amplifikation nach dem erneuten Test beim Zentrum gescheitert war, wurde hausintern erfolgreich amplifiziert und es wurde ein korrektes Typisierungsergebnis erzielt.

Diagnostische Genauigkeit

Die Berechnung der diagnostischen Genauigkeit wurde nur für solche Proben durchgeführt, die erfolgreich amplifiziert werden konnten und für die individuelle Referenzergebnisse zur Verfügung standen. Daher wurden zwei Proben von der Berechnung ausgeschlossen. Für die verbleibenden 80 Proben wurden einzigartige HLA-B-Typisierungsergebnisse erhalten.

Die diagnostische Genauigkeit des Tests auf Allelgruppenebene wurde als die Anzahl der korrekt ermittelten Typisierungsergebnisse berechnet, gemessen am einzigartigen Typisierungsergebnis, das mittels INNO-LiPA HLA-B Update (Innogenetics) oder einem alternativen Typisierungstest (Olerup SSP (GenoVision), SBT (Abbott), Biotest HLA-B SSP (Biotest), Allset+ HLA-B Low Resolution (Dynal) und Sequenzierung (hausinterne Methode)) erzielt wurde. Die Typisierungsergebnisse aller 80 Proben waren übereinstimmend mit dem Referenzassay, was einer diagnostischen Genauigkeit von 100% (80/80; 95% CI [95,5%; 100%]) entspricht.

Auflösung

(Typisierungstabelle v.1.4/031010)

Die HLA-B Multiplex Primer-Lösung, die in Kombination mit den INNO-LiPA HLA-B Update-Teststreifen verwendet wird, dient der Typisierung von HLA-B-Allelen auf Allelgruppenebene.

Die HLA-Bw4 Primer-Lösung, die in Kombination mit dem INNO-LiPA HLA-B Update-Teststreifen 1 verwendet wird, dient der Auflösung der häufigsten Widersprüchlichkeiten, i. e., Widersprüchlichkeiten in Bezug auf Bw4/Bw6-Allele.

Alle Widersprüchlichkeiten auf Allelgruppenebene, die nach dem Testen mit der HLA-B Multiplex Primer-Lösung festgestellt wurden, konnten unter Verwendung der HLA-Bw4 Primer-Lösung zu einem nicht widersprüchlichen Typisierungsergebnis reduziert werden. B*08, B*38 oder B*08, B*39 (2 Fälle); B*08, B*51 oder B*08, B*78 (4 Fälle); B*13, B*49 oder B*13, B*50 (2 Fälle); B*15, B*38 oder B*15, B*39 (1 Fall); B*15, B*51 oder B*15, B*52 oder B*15, B*78 (1 Fall); B*15, B*51 oder B*15, B*52 oder B*15, B*78 oder B*35, B*52 (1 Fall); B*35, B*38 oder B*39, B*53 (4 Fälle); B*35, B*40 oder B*40, B*53 (1 Fall); B*35, B*47 oder B*47, B*53 (1 Fall); B*35, B*49 oder B*50, B*53 (2 Fälle); B*35, B*52 oder B*53, B*78 (2 Fälle); B*38, B*44 oder B*39, B*44 (1 Fall); B*38, B*50 oder B*39, B*49 (1 Fall); B*38, B*78 oder B*39, B*51 (1 Fall); B*40, B*49 oder B*40, B*50 (2 Fälle); B*41, B*53 oder B*42, B*53 (1 Fall); B*44, B*49 oder B*44, B*50 (2 Fälle).

Für alle widersprüchlichen Ergebnisse empfahl die LiRAS™ Interpretationssoftware eine Bw4-Amplifikation, gefolgt von einer Hybridisierung mit dem INNO-LiPA HLA-B Update-Teststreifen 1.

Sondenreaktivität

Bei einem Fall bzw. mehreren Fällen ergab/en einige Proben während der Studie nur schwache Reaktionen. Es wurde eine konkordante Typisierung auf Allelgruppenebene erreicht, wenn die LiRAS™ Interpretationssoftware verwendet wurde.

Präzision

Die Wiederholung (intra-assay); und die inter-assay- und inter-person-Abweichung wurde hausintern evaluiert. Eine Probe, zweifach amplifiziert, unter Verwendung von drei verschiedenen Cyclern und der Bearbeitung von zwei Läufen pro Cyclus, wurde mit dem Auto-LiPA-Instrument getestet. Dieses Protokoll wurde durch zwei verschiedene Personen in zweifacher Ausführung durchgeführt.

Es wurde keine signifikante Abweichung festgestellt und in allen Fällen wurde ein identisches Typisierungsergebnis ohne Bedarf einer Bearbeitung erzielt.

Italiano

Uso previsto

INNO-LiPA HLA-B Update Plus è un test su striscia a sonda allineate, per uso *in vitro*, creato per la tipizzazione molecolare degli alleli degli antigeni leucocitari umani (HLA) B, a livello di gruppo allelico.

Principio del test

I test INNO-LiPA HLA si basano sul principio dell'ibridazione inversa. Il DNA biotinilato amplificato viene denaturato chimicamente, e i filamenti separati vengono ibridati con sonde oligonucleotidiche specifiche immobilizzate come linee parallele sulla membrana della striscia di reazione. Segue poi un passaggio di lavaggio stringente al fine di rimuovere eventuale materiale legatosi in maniera non specifica. Dopo il lavaggio stringente, viene aggiunta streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, che si lega all' eventuale ibrido biotinilato formatosi in precedenza. L'incubazione con una soluzione di substrato contenente un cromogeno porta alla formazione di un precipitato

porpora/marrone. La reazione viene arrestata da un passaggio di lavaggio, e viene registrato lo schema di reattività delle sonde.

Con il kit INNO-LiPA HLA-B Update Plus, è disponibile un kit di amplificazione (INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) per la preparazione standardizzata del materiale amplificato biotinilato. Il kit di amplificazione si basa sulla reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction - PCR*).

I prodotti di amplificazione vengono successivamente ibridati usando 2 strisce di tipizzazione su cui sono fissate 66 sonde di DNA sequenza-specifiche e 2 bande di controllo (Figura 1).

* *L'utilizzo di questo prodotto è protetto da licenza di F. Hoffmann - La Roche Ltd e Roche Molecular Systems, Inc.*

INNO-LiPA HLA-B Update Plus: passaggi da eseguire

- Punto 1 Amplificazione multiplex degli esoni da 2 a 4 degli alleli HLA-B.
- Punto 2 Ibridazione e lavaggio stringente con 67 sonde immobilizzate su due strisce INNO-LiPA HLA-B Update Plus (56°C).
- Punto 3 Sviluppo del colore.
- Punto 4 Interpretazione dello schema di reattività delle sonde.
- Punto 5 Se necessario, il software di interpretazione LiRAS™ consiglia un ulteriore passaggio di amplificazione e ibridazione.

Usando il kit INNO-LiPA HLA-B Update Plus, si consiglia di iniziare con (a) e procedere a (b), se si verificano ambiguità che coinvolgono gli alleli Bw4/Bw6. Ciò sarà consigliato dal software d'interpretazione LiRAS™.

- (a) amplificazione degli esoni 2, 3 e 4 degli alleli HLA-B con la soluzione primer HLA-B Multiplex prima dell'analisi con le strisce INNO-LiPA HLA-B Update Plus 1 e 2.
- (b) amplificazione gruppo-specifica dell' esone 2 degli alleli HLA-Bw4 con la soluzione primer HLA-Bw4 prima dell'analisi con la striscia 1 INNO-LiPA HLA-B Update Plus. La soluzione primer HLA-Bw4 in dotazione, amplifica l'esone 2 degli alleli HLA-Bw4. L'Esone 2 degli altri HLA-B non sarà amplificato, eccetto per gli alleli B*4411, B*4703 e B*5708.

INNO-LiPA HLA-B Update Plus è stato creato per dare la migliore risoluzione possibile, usando il test dell'ibridazione inversa, a livello di gruppo allelico (s'intendono in questo senso le prime due cifre dopo l'asterisco nel nome di un allele secondo la nomenclatura standard HLA, ad es. HLA-B*07).

Oltre all'interpretazione del gruppo allelico, il software darà tutte le possibili combinazioni di allele. Queste informazioni devono però essere considerate come un extra e non decisive.

Reagenti

Descrizione, preparazione per l'uso e condizioni di conservazione raccomandate

- Se conservati da 2 - 8°C e tenuti nelle fiale originali, i reagenti, aperti o non aperti, sono stabili fino alla data di scadenza del kit. Non congelare i reagenti. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Il kit deve essere conservato isolato da qualsiasi fonte di DNA contaminante, specialmente prodotti amplificati.
- Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25°C) circa 60 minuti prima dell'uso e devono essere rimessi nel frigorifero immediatamente dopo l'uso.
- Alterazioni nell'aspetto fisico dei componenti del kit possono indicare instabilità o deterioramento.
- Al fine di minimizzare la possibilità che le strisce si avvolgano prima dell'uso, si raccomanda di conservare il tubo in senso orizzontale.

Reagenti in dotazione:

Componente	Quantità	Rif.	Descrizione
Striscia 1	1 x 20	58188	Contenente 20 strisce per INNO-LiPA HLA-B Update segnate con una linea di identificazione marrone.
Striscia 2	1 x 20	58189	Contenente 20 strisce per INNO-LiPA HLA-B Update segnate con una linea di identificazione cromata.
Controllo LiPA	1 x 0.05 ml	58190	Contenente acido etilendiamminotetracetico (EDTA) e 0.01% dimetilisotiazolone (MIT)/ 0.1% cloroacetammide (CAA) come conservante.
Soluzione di Denaturazione	1 x 1 ml	56718	Soluzione alcalina contenente EDTA. La fiala deve essere chiusa immediatamente dopo l'uso; una esposizione prolungata di questa soluzione all'aria porta a un rapido deterioramento della forza denaturante.
Soluzione di Ibridazione	2 x 80 ml	56719	Tampone salino di sodio fosfato EDTA (SSPE) contenente 0.5% di sodio dodecil solfato (SDS). La soluzione di Ibridazione deve essere pre-riscaldata a una temperatura di almeno 37°C e non deve superare i 56°C (tutti i cristalli devono essere disciolti prima dell'uso).
Soluzione di Lavaggio Stringente	2 x 200 ml	56720	Tampone SSPE contenente 0.1% di SDS. La soluzione di Lavaggio Stringente deve essere pre-riscaldata a una temperatura di almeno 37°C e non deve superare i 56°C (tutti i cristalli devono essere disciolti prima dell'uso).
Diluyente del Coniugato	1 x 150 ml	55671	Tampone fosfato contenente NaCl, Triton®, proteine stabilizzatrici e 0.01% MIT/ 0.1% CAA come conservante.
Coniugato 100x	1 x 1.5 ml	56716	Streptavidina legata con fosfatasi alcalina in tampone Tris contenente stabilizzatori proteici e 0.01% MIT/0.098% CAA come conservanti, da diluire 1/100 prima dell'uso in Diluyente del Coniugato. Preparare 2 ml di soluzione di lavoro di Coniugato per ciascuna vaschetta di test + 2 ml in eccesso (la soluzione di lavoro di Coniugato può essere preparata durante il lavaggio stringente) per test manuale. Per <i>Auto</i> -LiPA, preparare 10 ml in eccesso. La soluzione di lavoro di Coniugato è stabile per 24 ore a temperatura ambiente (da 20 - 25°C) se conservata al buio.
Tampone del Substrato	1 x 235 ml	55732	Tampone Tris contenente NaCl, MgCl ₂ e 0.01% MIT/0.1% CAA come conservante.
Substrato BCIP/NBT 100x	1 x 1.5 ml	55723	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato sale di p-toluidina (BCIP) e 4-nitroblu di tetrazolio (NBT) in dimetilformammide (DMF), da diluire 1/100 in tampone Substrato prima dell'uso. Preparare 2 ml di soluzione di lavoro Substrato per ciascuna vaschetta di test + 2 ml in eccesso (la soluzione di lavoro Substrato può essere preparata durante l'incubazione del Coniugato) per il test manuale. Per <i>Auto</i> -LiPA, preparare 10 ml in eccesso. La soluzione di lavoro Substrato

			è stabile per 24 ore a temperatura ambiente (da 20 - 25°C) se conservata al buio.
Soluzione di Risciacquo 5x	2 x 80 ml	56721	Tampone Fosfato contenente NaCl, Triton® e 0.05% MIT/0.48% CAA come conservante, da diluire 1/5 (1 parte + 4 parti) in acqua distillata o deionizzata prima dell'uso. Preparare 8 ml di soluzione di lavoro di Risciacquo per ciascuna vaschetta di test + 10 ml in eccesso. Per <i>Auto</i> -LiPA, preparare 20 ml in eccesso. La soluzione di lavoro di Risciacquo è stabile per 2 settimane a temperatura compresa tra 2 - 8°C.
Vassoi di incubazione	5	-	Ciascuna contenente 8 vaschette.
Scheda di lettura	1	-	Per l'identificazione di sonde positive.
Foglio rapporto dati	2	-	Per la conservazione delle strisce sviluppate.

Materiali richiesti ma non forniti

- Bagnomaria con piatto agitante (80 rpm; con coperchio inclinato; temperatura regolabile a 56°C ± 0.5°C).
- Sistema di aspirazione.
- Termometro calibrato.
- Aggitatore orbitale, reciproco o basculante.

Raccomandazioni:

Per un aggitatore orbitale:

- Il diametro del movimento circolare deve essere uguale o superiore a 13 mm
- la velocità raccomandata per un movimento circolare di 13 mm è 160 rpm.

Per un aggitatore reciproco:

- la velocità raccomandata per il movimento avanti-e-indietro è di 80 movimenti al minuto.

Per un aggitatore basculante:

- l'angolo di agitazione non deve superare i 13° al fine di evitare versamenti di liquido
- si raccomanda una velocità di 50 rpm.
- Aggitatore Vortex o equivalente.
- Cilindri graduati (10, 25, 50 e 100 ml).
- Acqua distillata o deionizzata.
- Guanti monouso.
- Puntali per pipette sterili monouso (preferibilmente con filtro).
- Pinzette per maneggiare le strisce.
- Pipette regolabili per erogare da 1 - 20 µl, - 20 - 200 µl, e da 200 - 1000 µl.
- Pipetta a ripetizione (Eppendorf, opzionale).
- Timer, 2 ore (± 1 minuto).

Sicurezza e ambiente

- **Si prega di fare riferimento alle schede di sicurezza e alle etichette del prodotto per ottenere informazioni relative ai componenti potenzialmente pericolosi.**



R20/21, R36, R45, R61, S36/37, S45-53

Tossico! (T) Nocivo se inalato o messo a contatto con la pelle. Irritante per gli occhi. Può provocare cancro. Può causare danni al feto. Indossare appropriati abiti protettivi e guanti. In caso di incidente o malore rivolgersi immediatamente ad un medico (mostrando l'etichetta se possibile). Evitare l'esposizione - usare speciali istruzioni per l'uso. Ristretto ad utilizzatori professionali. **Contiene dimetilformammide, 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato sale di p-toluidina:** Substrato BCIP/NBT 100x.



R43, S24-37

Irritante! (Xi) Evitare il contatto con la pelle. Può causare sensibilizzazione per contatto con la pelle. Indossare appropriati guanti protettivi.

Contiene 2-Cloroacetammide: Soluzione di Risciacquo, tampone Substrato, diluente Coniugato e controllo LiPA.



R36/38, S23-24-26

Irritante! (Xi) Irritante per gli occhi e per la pelle. Non respirarne i vapori. Evitare il contatto con la pelle. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente e abbondantemente con acqua e rivolgersi ad un medico.

Contiene idrossido di sodio: Soluzione di Denaturazione.

- I campioni devono sempre essere manipolati come potenzialmente infetti. Per questo motivo, tutti i componenti del sangue e i materiali biologici devono essere considerati come potenzialmente infetti e maneggiati come tali. Solo a personale adeguatamente preparato dovrebbe essere permessa l'esecuzione del test. Tutti i componenti del sangue e i materiali biologici dovrebbero essere eliminati in accordo con le procedure di sicurezza stabilite.
 - Autoclavare per almeno 15 minuti a 121°C.
 - Incenerire il materiale monouso.
 - Miscelare i liquidi reflui con ipoclorito di sodio in modo che la concentrazione finale sia $\pm 1\%$ ipoclorito di sodio. Lasciare riposare tutta la notte prima di smaltirlo.

ATTENZIONE: Neutralizzare il liquido di scarto che contiene acido prima di aggiungere ipoclorito di sodio.
- È necessario l'uso di dispositivi di protezione: guanti e occhiali di sicurezza quando si manipolano agenti pericolosi o infettanti.
- Gli scarti devono essere maneggiati in accordo con le linee guida delle istituzioni in materia. Devono inoltre essere rispettate tutte le norme sull'ambiente federali, statali e locali.

Campioni

Poiché il test LiPA utilizza come campione materiale DNA biotinilato e amplificato, è disponibile come strumento di accompagnamento un kit di amplificazione INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus.

Procedure di manipolazione

Trattamento delle strisce

- Le strisce possono essere utilizzate una volta sola!
- Non toccare le strisce con le mani nude; usare pinzette pulite.
- Usare una **matita** per l'identificazione delle strisce del test. Non usare penne a sfera, ecc. Scrivere il numero identificativo sopra la linea di identificazione della striscia.
- Nel corso dei vari passaggi d'incubazione, le strisce devono sempre rimanere nella medesima vaschetta.
- Le strisce inutilizzate o sviluppate devono essere mantenute lontano da fonti di luce intensa e di calore.
- Lasciare che le strisce sviluppate asciughino completamente prima dell'interpretazione, della copertura e della conservazione.
- Le strisce asciutte sviluppate devono essere conservate preferibilmente al buio ad una temperatura compresa tra 20 - 25°C.
- Non riutilizzare le vaschette.

Indicazioni per l'incubazione manuale

- L'incubazione a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante l'ibridazione e il lavaggio stringente sono i passaggi più critici nell'evitare segnali deboli positivi falsi (temperatura troppo bassa) o falsi negativi/segnali molto deboli (temperatura troppo alta). Un bagnomaria con agitazione con coperchio inclinato permette un buon controllo delle variazioni di temperatura. E' necessario un controllo accurato della temperatura con un termometro calibrato.
- **Chiudere** sempre il coperchio del bagnomaria durante le incubazioni, allo scopo di evitare segnali falsi positivi.
- **Non usare agitatori ad aria calda** per l'ibridazione e il lavaggio stringente.
- Per l'ibridazione e il lavaggio stringente le vaschette devono essere posizionate sul piatto di agitazione del bagnomaria. Regolare il livello dell'acqua tra 1/3 e 1/2 dell'altezza della vaschetta. Assicurarsi che le vaschette non galleggino sull'acqua. L'acqua deve essere a contatto diretto con le vaschette.
- I passaggi di incubazione per lo sviluppo del colore devono essere compresi tra $20 - 25^{\circ}\text{C}$. Se la temperatura è inferiore a 20°C , si potrebbero ottenere risultati più deboli. Se la temperatura è superiore a 25°C , si possono ottenere segnali con sfondo alto e/o segnali positivi falsi.
- Incubare sempre esattamente per la durata citata nel protocollo.
- L'ampiezza del movimento generato sia dal bagnomaria (procedura di ibridazione) che dall'agitatore (procedura di sviluppo del colore) è critica nel raggiungere la sensibilità massima e una colorazione omogenea. La superficie della striscia deve essere completamente sommersa. L'ampiezza deve essere la più alta possibile.
In ogni caso, si devono evitare perdite del liquido oltre i bordi delle vaschette! Ciò può portare a contaminazione incrociata e risultati non validi.
- L'agitazione delle strisce durante l'incubazione deve essere eseguita in modo tale che sia il liquido che le strisce si spostino avanti e indietro nella vaschetta, senza che il liquido venga versato oltre i bordi delle vaschette.
- Non coprire il vassoio portavaschetta. Durante l'ibridazione e le incubazioni di lavaggio stringente, le vaschette possono essere lasciate scoperte nel bagnomaria. La copertura delle vaschette con copripiastra adesivo può causare contaminazione incrociata.

Indicazioni per il cambio manuale del liquido nelle vaschette

- Il liquido viene aspirato dalla vaschetta tramite una pipetta, preferibilmente collegata ad un aspiratore a vuoto. La vaschetta viene tenuta inclinata in modo da permettere a tutto il liquido di fluire verso un'estremità della vaschetta.
- Aggiungere 2 ml della soluzione appropriata a ciascuna vaschetta e seguire il protocollo. Una pipetta a ripetizione (Eppendorf) è utile a questo scopo.
- Ripetere questo passaggio tante volte quanto indicato nella procedura del test.

NOTA:

- Non lasciare che le strisce si asciughino tra due lavaggi.
- Assicurarsi di non danneggiare la superficie delle strisce durante l'aspirazione. Aspirare il liquido nella parte superiore della striscia sopra la linea di identificazione.
- Assicurarsi che tutto il liquido sia stato aspirato.
- Avere cura che l'intera striscia sia accuratamente lavata mediante completa immersione nella soluzione.
- Adattare la velocità dell'agitatore quando necessario.

Note e precauzioni

- Solo per uso professionale.
- Allo scopo di evitare contaminazione del DNA, si raccomanda la massima separazione fisica tra i passaggi di pre- e post- amplificazione: stanze separate, pipette e altro materiale di laboratorio separato, indumenti e guanti da laboratorio separati (e loro scorte) sono precauzioni minime per una buona pratica di laboratorio.
- Evitare qualsiasi ritorno dalla stanza di post-amplificazione alla stanza di pre-amplificazione.

- Si raccomanda l'uso di materiale di laboratorio monouso autoclavato.
- Non riutilizzare materiale di laboratorio monouso.
- Usare un puntale sterile per ciascun campione aliquotato.
- Non usare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Non mischiare i reagenti tra i kit a meno che i componenti abbiano numeri di lotto identici.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti.

Procedura manuale del test

NOTA:

- Nel corso dei vari passaggi di incubazione, le strisce del test devono sempre rimanere nella medesima vaschetta.

Prima dell'incubazione, verificare la temperatura del bagnomaria usando un termometro calibrato, e regolare la temperatura se necessario prima di posizionare il portavaschetta nel bagnomaria. Chiudere sempre il coperchio. Il Controllo LiPA deve essere incluso in ogni esecuzione del test.

Campioni

1. Prodotto HLA-B amplificato (usare 10 µl). Per la preparazione del campione: vedi le istruzioni per l'uso INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus.
NOTA:
 - Assicurarsi che vengano aggiunti esattamente 10 µl di campione amplificato. Una quantità eccessiva o troppo piccola di campione può portare a risultati errati di tipizzazione.
2. Controllo LiPA per INNO-LiPA HLA-B Update Plus (usare 10 µl; **l'amplificazione non è richiesta!**).
3. Controllo bianco amplificato (controllo negativo; usare 10 µl).

Denaturazione e ibridazione

1. Scaldare un bagnomaria con agitazione a 56°C ± 0.5°C. Controllare la temperatura usando un termometro calibrato e, se necessario, regolare la temperatura. Non superare la temperatura indicata. Pre-riscaldare la Soluzione di Ibridazione e la Soluzione di Lavaggio Stringente in un bagnomaria ad almeno 37°C e non superare i 56°C. Miscelare prima dell'uso. Tutti i cristalli devono essere disciolti.
2. Usando delle pinzette, rimuovere il numero richiesto di Striscia 1 e 2 INNO-LiPA HLA-B Update Plus dal tubo (una striscia 1 e una striscia 2 per campione di test per l'INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus, una striscia 1 per la sequenza amplificata INNO-LiPA HLA-Bw4). Includere entrambe le strisce per il Controllo LiPA per INNO-LiPA HLA-B Update Plus e per il controllo bianco amplificato. Apporre a matita un numero d'identificazione sulla striscia sopra la linea di identificazione marrone/cromata.
3. Prendere il numero richiesto di vaschette (due vaschette per ogni campione di test per HLA-B Multiplex Plus e una vaschetta per campione di test per HLA-Bw4) e posizzarle nel portavaschetta.
4. Tramite la pipetta, immettere 10 µl di soluzione di denaturazione nell'angolo superiore di ciascuna vaschetta.
NOTA:
 - Chiudere la fiala immediatamente dopo l'uso.
5. Aggiungere 10 µl di campione (vedi Campioni; vedi Istruzioni per l'uso di INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) e miscelare attentamente pipettando su e giù. Usare sempre puntali sterili. Lasciare che la denaturazione proceda per **5 minuti** a 20 - 25°C.
6. Agitare la soluzione di ibridazione pre-riscaldata e aggiungere **delicatamente** 2 ml al prodotto amplificato denaturato in ciascuna vaschetta. Miscelare agitando delicatamente. Fare attenzione a non contaminare le vaschette vicine durante il pipettamento.

7. Posizionare immediatamente la striscia nella vaschetta. Le strisce devono essere completamente immerse nella soluzione.
NOTA:
 - Indossare guanti monouso e usare pinzette.
8. Posizionare la vaschetta nel bagnomaria con agitazione a una temperatura di $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (80 rpm; vedi Istruzioni per l'incubazione manuale), chiudere il coperchio e incubare per **30 minuti**.
NOTA:
 - Evitare di spruzzare acqua dal bagno d'acqua nella vaschetta. Regolare il livello dell'acqua tra 1/3 e 1/2 dell'altezza della vaschetta. Al fine di prevenire uno scivolamento del portavaschetta, immobilizzarlo tra due grossi pesi.

Lavaggio stringente

1. Dopo l'ibridazione, rimuovere il vassoio portavaschette dal bagnomaria.
2. Tenere il vassoio portavaschette inclinato e aspirare il liquido dalla vaschetta attraverso una pipetta, preferibilmente attaccata a un aspiratore a vuoto. Aggiungere 2 ml di soluzione di lavaggio stringente pre-riscaldata in ciascuna vaschetta e posizionare il vassoio portavaschette in bagnomaria a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, chiudere il coperchio e incubare per **3 minuti**.
3. Dopo l'incubazione, rimuovere il portavaschetta dal bagnomaria e aspirare il liquido dalla vaschetta.
4. Ripetere il passaggio d'incubazione di **3 minuti** e il passaggio d'aspirazione una volta ancora.
5. Infine, aggiungere 2 ml di Soluzione di Lavaggio Stringente pre-riscaldata in ciascuna vaschetta e posizionare il portavaschetta in bagnomaria a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, chiudere il coperchio e incubare per **4 minuti**.

Prima dell'incubazione, controllare la temperatura del bagnomaria usando un termometro calibrato, e regolare la temperatura se necessario. Chiudere sempre il coperchio.

NOTA:

- Diluire la Soluzione di Risciacquo concentrata 5x e il Coniugato 100x durante il Lavaggio Stringente. Vedi Reagenti.

Sviluppo del colore

Tutte le incubazioni successive sono eseguite a **20 - 25°C su un agitatore**. Durante le incubazioni, il liquido e le strisce del test devono spostarsi avanti e indietro nella vaschetta per una colorazione omogenea.

1. Lavare ciascuna striscia due volte per 1 minuto usando 2 ml di soluzione di lavoro di Risciacquo (vedi Istruzioni per cambiare il liquido nelle vaschette).
2. Aggiungere 2 ml di soluzione di lavoro Coniugato a ciascuna vaschetta e incubare per **30 minuti** agitando al contempo il vassoio portavaschette sull'agitatore.
NOTA:
 - Diluire la soluzione Substrato BCIP/NBT 100x circa 10 minuti prima della fine dell'incubazione del Coniugato. Vedi Reagenti.
3. Lavare ciascuna striscia due volte per **1 minuto** usando 2 ml della soluzione di lavoro di Risciacquo e lavare una volta ancora usando 2 ml del tampone Substrato.
4. Aggiungere 2 ml di soluzione di lavoro Substrato a ciascuna vaschetta e incubare per **30 minuti** agitando al contempo il vassoio portavaschette sull'agitatore.
ATTENZIONE:
 - Indossare guanti e occhiali protettivi.
5. Arrestare lo sviluppo del colore lavando le strisce due volte in 2 ml di acqua distillata agitando il vassoio portavaschette sull'agitatore per almeno **3 minuti**.
6. Usando le pinzette, rimuovere le strisce dalle vaschette e posizionarle su carta assorbente. Lasciare asciugare completamente le strisce prima di leggere i risultati. Conservare le strisce sviluppate e asciugate al buio.

Procedura automatica del test: *Auto-LiPA*

La procedura dei test LiPA è estremamente adatta all'automazione. L'*Auto-LiPA* è progettato infatti per gestire completamente i passaggi di ibridazione, lavaggio stringente e di sviluppo del colore. L'*Auto-LiPA* è un sistema walk-away con riscaldamento e raffreddamento automatici e con aspirazione e dispensazione automatici.

Il protocollo standard per l'*Auto-LiPA* 48 descrive l'esecuzione per un numero di campioni fino a 24 quando si usa una singola striscia per vaschetta. Questo numero, comunque, può essere aumentato fino a 48. Per eseguire questo, due strisce dallo stesso locus vengono testate nella stessa vaschetta, mantenendo tutti gli altri parametri del protocollo immutati. Da notare, però, che occasionalmente possono essere osservate reattività più deboli delle sonde. Quindi, ai clienti che intendono aumentare il numero di campioni consigliamo di validare questa procedura di "2 strisce in una vaschetta" nel proprio laboratorio.

Per maggiori informazioni e protocolli specifici dell'*Auto-LiPA*, si prega di contattare il proprio distributore locale.

Risultati

Letture

La Figura 1 illustra la posizione delle diverse sonde oligonucleotidiche sulle strisce INNO-LiPA HLA-B Update Plus. Una linea è considerata positiva quando appare una netta banda viola/marrone al termine della procedura del test.

Figura 1 (vedere pagina 15): Posizione della linea di identificazione (linea marrone sulla Striscia 1 e linea cromata sulla Striscia 2), linea di controllo del coniugato (conj. control), linea di controllo HLA-B Update Plus (controllo HLA-B) e delle 66 sonde DNA sequenza specifiche delle strisce INNO-LiPA HLA-B Update Plus.

Validazione

- Includere un controllo negativo e il Controllo LiPA per INNO-LiPA HLA-B Update Plus ogni volta che si esegue un test. Come per ogni nuova procedura, l'aggiunta di ulteriori controlli positivi e negativi deve essere presa in esame fino a che sia stato raggiunto un alto livello di fiducia nella capacità di eseguire correttamente la procedura del test. Si suggerisce di usare un DNA di riferimento per verificare che siano state raggiunte le più idonee condizioni di esecuzione del test.
- Le linee superiori delle strisce INNO-LiPA HLA-B Update Plus (Figura 1) sono le linee di identificazione (linea colorata marrone e cromata). Queste linee permettono un corretto orientamento delle strisce.
- La linea successiva controlla l'aggiunta della soluzione di lavoro del Coniugato e del Substrato durante la procedura di rilevazione. Questa linea deve essere allineata con la linea di controllo del coniugato sulla carta di lettura. Questa linea deve essere sempre positiva (in caso contrario non deve essere fatta alcuna interpretazione!) e dovrebbe avere all'incirca la medesima intensità su ciascuna striscia nella medesima esecuzione di test.
- La linea successiva è la linea di controllo dell'ibridazione HLA-B Update Plus (controllo HLA-B sulla carta di lettura) che indica se si è aggiunto per l'ibridazione il quantitativo appropriato di materiale amplificato HLA-B. Questa linea deve essere sempre positiva, eccetto per il controllo negativo dell'amplificazione Multiplex HLA-B, ma la sua intensità può variare tra i campioni.
- Il risultato di ciascun controllo negativo non deve dare alcun segnale per nessuna delle linee sulla striscia, fatta eccezione per l'amplificazione HLA-Bw4 in cui la linea di controllo dell'ibridazione (Controllo HLA-B) sarà anch'essa positiva.
- Il **Controllo** LiPA per INNO-LiPA HLA-B Update Plus deve dare il seguente schema di bande positive: striscia 1: controllo coniugato, Controllo HLA-B, 22 e 35; striscia 2: controllo coniugato, controllo HLA-B, 53, 56 e 57. Ogni altra sonda deve essere negativa. Questo controllo è composto da oligonucleotidi biotinilati,

complementari alle sonde di ibridazione citate. L'ibridazione positiva su queste sonde dimostra così l'esecuzione soddisfacente del test incluse ibridazione, lavaggio stringente, sviluppo del colore e rilevazione. Uno schema differente può indicare problemi di esecuzione della prova come una temperatura scorretta durante l'ibridazione o deviazioni dai tempi o dalle temperature descritte.

- Le intensità di colore delle sonde su una striscia possono differire da una linea all'altra.

Interpretazione dei risultati

- Controllare il corretto schema di reattività del Controllo LiPA.
- La linea di controllo del coniugato sulla striscia deve essere allineata con la linea di controllo del coniugato della carta di lettura.
- Dapprima controllare la positività delle linee di controllo (prime due linee) allo scopo di convalidare ciascuna singola striscia (vedi Validazione).
- I risultati di tipizzazione si basano sulla reattività delle sonde del kit. E' disponibile un elenco delle specificità delle sonde.
- Identificare tutti i numeri delle sonde che sono positive sulla striscia INNO-LiPA HLA-B Update Plus e dedurre il tipo HLA-B usando la tabella di tipizzazione INNO-LiPA HLA-B Update Plus o una versione del software d'interpretazione LiPA (vedi software d'interpretazione: LiRAS™).

Il software spesso dà più risultati di quanto suggerito dall'uso previsto: viene data l'interpretazione a livello di gruppo allelico, oltre alle possibili combinazioni di alleli. Queste informazioni devono però essere considerate come un extra, non come decisive.

Software d'interpretazione: LiRAS™

Il software LiRAS™ per INNO-LiPA HLA è stato creato per aiutare nell'interpretazione dei risultati LiPA.

Si prega di contattare il proprio distributore locale per ottenere la versione aggiornata più recente.

Limiti della procedura

- L'utilizzo di questo prodotto deve limitarsi a personale esperto nelle tecniche di ibridazione.
- Soltanto una buona pratica di laboratorio e un'attenta esecuzione delle procedure specificate permetterà un'ibridazione specifica e una corretta tipizzazione del DNA target.
- Le strisce INNO-LiPA HLA-B Update Plus sono state create per dare risoluzione a livello di gruppo allelico (da B*07 a B*83). In ogni caso, una combinazione di determinati alleli potrebbe condurre a combinazioni di sonde non uniche e perciò a una risposta ambigua di due o più combinazioni alleliche.
- Un nuovo allele può avere polimorfismi all'esterno delle regioni delle sonde: questo va preso in considerazione nell'interpretazione dei risultati.
- Le linee di controllo HLA-B Update Plus sono non soltanto specifiche per HLA-B, ma anche per alcuni alleli HLA-A e alcuni alleli HLA-C. Quindi, le linee di controllo HLA-B potrebbero reagire anche con prodotti amplificati HLA-A e HLA-C.

Performance del Test

Esecuzione del test usando DNA ottenuto con la Soluzione Primer HLA-B Multiplex

La performance di INNO-LiPA HLA-B Update è stata valutata in quattro laboratori europei di tipizzazione tissutale, su campioni di routine. E' stato analizzato un totale di 347 campioni. Il DNA è stato estratto da sangue fresco o congelato in anticoagulante citrato o EDTA. I metodi di estrazione del DNA utilizzati includevano salting out, QIAamp 96 DNA blood kit (Qiagen), Genomic DNA Purification kit (Promega) e Puregene (Gentra Systems). Il DNA fresco o ongelato è stato amplificato usando il thermal cycler Perkin Elmer 9600 o 9700.

Gli ampliconi sono stati conservati a 2 - 8°C o -25/-15°C prima di essere messi sulla striscia.

Non sono stati rilevati fallimenti di amplificazione, sebbene sia stato necessario ripetere il test su due campioni di un centro. I campioni sono stati processati utilizzando lo strumento *Auto-LiPA* e interpretati con la versione sperimentale del software di interpretazione *LiRAS™*.

Accuratezza

E' stato ottenuto un risultato di tipizzazione HLA-B per 342 su 347 campioni. E' stato necessario ripetere il test per 4 campioni di un centro. Un campione è risultato essere "non tipizzabile", ma in accordo con gli operatori, ciò è stato probabilmente dovuto ad una contaminazione del DNA. Per 4 campioni di un centro, non sono stati forniti i risultati di tipizzazione dall'operatore, sebbene opzioni per uno di loro fossero disponibili attraverso modifica.

L'accuratezza a livello di gruppo allelico è stata calcolata come percentuale della concordanza osservata con test alternativi di DNA (Biotest ELPHA HLA-AB LowRes Typing kit, Dynal SSP, LiPA HLA-B, sequenziamento, Micro SSP™, OLERUP SSP™, Biotest HLA-B SSS). I risultati INNO-LiPA HLA-B Update sono considerati concordi con il test di riferimento se i due risultati erano identici, se i risultati di INNO-LiPA HLA-B Update erano più specifici del risultato di riferimento, o se i risultati INNO-LiPA HLA-B Update mostravano una minore risoluzione ma un risultato corretto in confronto ai metodi di riferimento. L'accuratezza è stata del 100% (342/342).

Risoluzione

(tabella di tipizzazione versione v1.0/2001-03-31)

INNO-LiPA HLA-B Update è stato progettato per individuare gli alleli HLA-B a livello di gruppo allelico, cioè a livello sierologico sia esteso che di split. "Gruppo allelico" equivale alla designazione delle prime due cifre che seguono l'asterisco nella nomenclatura standard HLA (es. HLA B*07). Inoltre, il kit è disegnato per determinare i seguenti alleli nulli: 0808N (esone 3), 1526N (esone 3) e 5111N (esone 4). La risoluzione a livello di gruppo allelico osservata durante questo studio è del 92.4% (316/342).

Le ambiguità osservate sono state B*08xB*51 o B*08xB*78 (8 casi), B*15xB*35 o B*15xB*15 (2 casi), B*35xB*38 o B*39xB*53 (2 casi), B*08xB*38 o B*08xB*39 (2 casi), B*15xB*51 o B*15xB*52 o B*15xB*78 (2 casi), B*35xB*51 o B*53xB*78 (2 casi), B*35xB*38 o B*35xB*53 (1 caso), B*35xB*49 o B*50xB*53 (1 caso), B*35xB*47 o B*53xB*47 (1 caso), B*40xB*78 o B*40xB*52 (1 caso), B*35xB*55 o B*35xB*56 (1 caso), B*15xB*49 o B*15xB*50 (1 caso), B*49xB*78 o B*50xB*51 (1 caso), B*15xB*51 o B*52xB*78 (1 caso). Per sei di questi casi, sia il test di riferimento che INNO-LiPA HLA-B Update hanno dato risultati ambigui. Due ambiguità (6 campioni) osservate con il metodo di riferimento sono state ridotte ad un singolo risultato di tipizzazione utilizzando il test INNO-LiPA HLA-B Update.

Reattività delle sonde

Quattro sonde hanno dato reattività false positive e nove sonde hanno dato reazioni da deboli a false negative in una o più occasioni durante la sperimentazione clinica. Questa informazione, se non già presente, è stata implementata nel software e/o nelle linee guida, per facilitare le future tipizzazioni.

Le false reattività sono state identificate tutte come tali e quando è stato utilizzato il software interpretativo *LiRAS™* è stata raggiunta una concorde tipizzazione a livello di gruppo allelico.

Consultare le linee guida per specifiche informazioni sulla reattività delle sonde.

E' disponibile una lista completa delle specificità delle sonde e dei primer. Tutte le sonde sono disegnate per ibridare specificamente con la loro sequenza complementare a livello di un mismatch, a meno che indicato diversamente nella lista.

Sensibilità del test

I risultati ottenuti durante una valutazione interna di una diluizione seriale di 3 campioni di DNA, con concentrazione variabile tra 0.01 µg/µl e 2 µg/µl, raccomandano l'uso di DNA con una concentrazione minima di 0.1 µg/µl.

La valutazione della performance esterna ha incluso 347 campioni di DNA con una concentrazione compresa tra 20 ng/µl e 1500 ng/µl e con una purezza (A_{260nm}/A_{280nm}) ≥ 1.5 . Il DNA è stato diluito ad una concentrazione compresa tra 20 ng/µl e 250 ng/µl prima dell'amplificazione. Non si sono avuti fallimenti di amplificazione, sebbene sia stato necessario ripetere il test per due campioni di un centro.

Precisione

Dati interni:

Tre campioni sono stati testati in quadruplicato, da due diverse persone utilizzando il metodo manuale, o da una persona su due diversi strumenti *Auto-LiPA*. Sono stati amplificati due campioni su tre diversi lotti in due diverse sedute. L'interpretazione dei risultati era identica in tutti i casi. La reattività delle sonde era comparabile in tutte le combinazioni.

Validazione esterna:

- La variabilità inter-lotto è stata valutata analizzando un pannello di controllo (5 campioni con reattività e interpretazione note), con due diversi lotti di prodotto. Per ogni campione è stato ottenuto lo stesso risultato di tipizzazione, indipendentemente dal lotto utilizzato.
- La variabilità inter-laboratorio è stata valutata utilizzando lo stesso pannello di controllo in quattro centri. Ogni centro ha ottenuto gli stessi risultati di tipizzazione per i cinque campioni.

Esecuzione del test usando DNA ottenuto con la Soluzione Primer HLA-Bw4.

L'esecuzione del test della soluzione primer multiplex HLA-Bw4 di INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus è stata valutata in sede e presso due laboratori di tipizzazione dei tessuti belgi. Sono stati analizzati un totale di 82 campioni anonimi (50 campioni esternamente; 32 sede). Tutti i campioni sono stati preventivamente tipizzati con INNO-LiPA HLA-B Update. I campioni includevano 31 campioni ambigui (18 diverse ambiguità) e 51 campioni non ambigui. Tutti i campioni ambigui sono stati ulteriormente tipizzati su un unico risultato con uno o più test di tipizzazione alternativi su base DNA.

Tutte le ibridazioni sono state eseguite usando lo strumento *Auto-LiPA*, utilizzando il programma HLA56v3, e l'interpretazione è stata fatta con una versione di test clinico di LiRAS™ per il software d'interpretazione LiPA HLA v3.00.

Sensibilità del test

La sensibilità del test di valutazione a livello del gruppo di allele è stata calcolata come il numero di risultati di tipizzazione positivi rispetto al numero totale di campioni testati.

La sensibilità del test in questa valutazione, dopo un test di amplificazione ripetuto di quattro campioni, è stata del 98,8% (81/82; 95% CI [93,4%; 100%]). Il campione la cui amplificazione era fallita dopo il nuovo test presso il centro è stato amplificato con successo in sede e si è ottenuto un risultato di tipizzazione corretto.

Precisione diagnostica

I calcoli di precisione diagnostica sono stati eseguiti esclusivamente su campioni amplificati con successo e per cui era disponibile un unico risultato di riferimento.

Di conseguenza, sono stati esclusi due campioni da questo calcolo.

Un unico risultato di tipizzazione HLA-B è stato ottenuto per i restanti 80 campioni.

La precisione diagnostica della valutazione rispetto al livello di gruppo di allele è stata calcolata come numero di risultati di tipizzazione ottenuti correttamente, in confronto al risultato di tipizzazione unico ottenuto con INNO-LiPA HLA-B Update

(Innogenetics) o con un test di tipizzazione alternativo (Olerup SSP (GenoVision) Allset⁺ HLA-B Low Resolution (Dynal), e sequenziamento (metodo in sede)).

I risultati di tipizzazione di tutti gli 80 campioni sono risultati concordi al test di riferimento, producendo una precisione diagnostica del 100% (80/80; 95% CI [95,5%; 100%]).

Risoluzione

(tabella di tipizzazione v.1.4/031010)

Il test di primer multiplex HLA-B usato in combinazione con le strip INNO-LiPA HLA-B Update è inteso per la tipizzazione di allele HLA-DRB a livello del gruppo di allele.

Lo primer HLA-Bw4, usato in combinazione con la strip 1 di INNO-LiPA HLA-B Update, è stato creato per risolvere le ambiguità più frequenti, cioè le ambiguità che coinvolgono gli allele Bw4/Bw6.

Tutte le ambiguità, a livello del gruppo di allele, osservate dopo aver i test con lo primer multiplex HLA-B, sono state ridotte a un risultato di tipizzazione non ambiguo utilizzando la soluzione primer HLA-Bw4: B*08, B*38 o B*08, B*39 (2 casi); B*08, B*51 o B*08, B*78 (4 casi); B*13, B*49 o B*13, B*50 (2 casi); B*15, B*38 o B*15, B*39 (1 caso); B*15, B*51 o B*15, B*52 o B*15, B*78 (1 caso); B*15, B*51 o B*15, B*52 o B*15, B*78 o B*35, B*52 (1 caso); B*35, B*38 o B*39, B*53 (4 casi); B*35, B*40 o B*40, B*53 (1 caso); B*35, B*47 o B*47, B*53 (1 caso); B*35, B*49 o B*50, B*53 (2 casi); B*35, B*52 o B*53, B*78 (2 casi); B*38, B*44 o B*39, B*44 (1 caso); B*38, B*50 o B*39, B*49 (1 caso); B*38, B*78 o B*39, B*51 (1 caso); B*40, B*49 o B*40, B*50 (2 casi); B*41, B*53 o B*42, B*53 (1 caso); B*44, B*49 o B*44, B*50 (2 casi).

Per tutti i risultati ambigui, il software d'interpretazione LiRAS™ ha consigliato un'amplificazione Bw4 seguita da ibridazione con la strip 1 INNO-LiPA HLA-B Update.

Reattività delle sonde

In più di un'occasione nel corso di questo studio, alcune sonde hanno dato reazioni deboli. Una tipizzazione coerente a livello di gruppo di allele è stato raggiunto quando si è utilizzato il software d'interpretazione LiRAS™.

Precisione

La variazione della ripetibilità (intra-test), inter-test e inter-persona è stata valutata in sede. Un campione, amplificato in duplicato, usando tre diversi variatori ed elaborando due esecuzioni per variatore, è stato testato usando lo strumento *Auto-LiPA*. Questo protocollo è stato eseguito in duplicato da due persone diverse.

Non si sono osservate variazioni significative e si è ottenuto un risultato di tipizzazione identico in tutti i casi senza bisogno di modifiche.

Español

Uso al que está destinado

INNO-LiPA HLA-B Update Plus es un ensayo de sondas en tira, para uso *in vitro*, diseñado para determinar el tipaje molecular de los alelos B del antígeno leucocitario humano (HLA) a nivel de grupo de alelos.

Principio del ensayo

Los ensayos INNO-LiPA HLA de tipaje se basan en el principio de hibridación reversa. Se desnaturaliza químicamente ADN amplificado biotinilado y se hibridan las hebras separadas con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizadas como bandas paralelas en tiras basadas en membranas. A continuación, se realiza un lavado astringente para quitar material amplificado incorrectamente emparejado. Tras el lavado astringente, se añade conjugado de estreptavidina con fosfatasa alcalina y se une a algún híbrido biotinilado formado previamente. La incubación con

una solución de sustrato que contiene un cromógeno produce un precipitado de un color morado o marrón. Se detiene la reacción mediante un lavado y se registra el patrón de reactividad de las sondas.

Con el kit INNO-LiPA HLA-B Update Plus está disponible un kit de amplificación (INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) para la preparación estandarizada de material amplificado biotinilado. El kit de amplificación se basa en la reacción en cadena de polimerasa (PCR*, polymerase chain reaction).

Los productos de amplificación se hibridan sucesivamente con 2 tiras de determinación de tipo en la que se fijan 66 sonda específicas de la secuencia y 2 bandas de control (ilustración 1).

* *El uso de este producto está cubierto por una licencia de F. Hoffmann - La Roche Ltd. y Roche Molecular Systems, Inc.*

Pasos de INNO-LiPA HLA-B Update Plus

- | | |
|--------|---|
| Paso 1 | Amplificación múltiplex de los exones 2 a 4 de los alelos HLA-B. |
| Paso 2 | Hibridación y lavado astringente con 67 bandas de sonda inmovilizadas en dos tiras de INNO-LiPA HLA-B Update Plus (a 56°C). |
| Paso 3 | Revelado de color. |
| Paso 4 | Interpretación del patrón de reactividad de las sondas. |
| Paso 5 | Si es necesario, el software de interpretación LiRAS™ recomienda completar un paso más de amplificación e hibridación. |

Cuando se utiliza el kit INNO-LiPA HLA-B Update Plus, se recomienda empezar con (a) y seguir con (b) si se producen ambigüedades relacionadas con los alelos Bw4/Bw6. Así lo recomendará el software de interpretación LiRAS™.

- (a) la amplificación de los exones 2, 3 y 4 de los alelos HLA-B con la solución del cebador HLA-B Multiplex antes de analizar con las tiras 1 y 2 de INNO-LiPA HLA-B Update Plus.
- (b) la amplificación específica del grupo del exón 2 de los alelos HLA-Bw4 con la solución del cebador HLA-Bw4 antes de analizar con la tira de INNO-LiPA HLA-B Update Plus. La solución del cebador HLA-Bw4 suministrada amplifica el exón 2 de los alelos HLA-Bw4. No se amplificará el exón 2 de otros alelos HLA-B, a excepción de los alelos B*4411, B*4703 y B*5708.

INNO-LiPA HLA-B Update Plus se ha diseñado para proporcionar la mejor resolución posible, con el formato de ensayo de hibridación reversa a nivel de grupo de alelos (se indica mediante los dos primeros dígitos después del asterisco en el nombre del alelo según la nomenclatura estándar de HLA, por ejemplo, HLA-B*07).

Además de la interpretación del grupo de alelos, el software proporcionará todas las combinaciones posibles de alelos. No obstante, no debe considerarse esta información como decisiva, sino como datos adicionales.

Reactivos

Descripción, preparación para el uso y condiciones de almacenamiento recomendadas

- Si los reactivos se almacenan en los viales originales a una temperatura entre 2 - 8°C, abiertos o sin abrir, se mantendrán estables hasta la fecha de caducidad del kit. No los congele. No utilice reactivos caducados.
- El kit debe almacenarse aislado de fuentes de ADN contaminante, especialmente de productos amplificados.
- Todos los reactivos deben ponerse a temperatura ambiente (20 - 25°C) durante unos 60 minutos antes de usarse y devolverse al refrigerador inmediatamente después de su uso.

- Cualquier alteración en la apariencia física de los componentes del kit puede ser signo de inestabilidad o deterioro.
- Para minimizar la posibilidad de que las tiras se retuerzan antes de usarse es recomendable almacenar el tubo horizontalmente.

Reactivos suministrados:

Componente	Cantidad	Ref.	Descripción
Tiras 1	1 x 20	58188	Contiene 20 tiras para INNO-LiPA HLA-B Update Plus marcadas con una banda de marca de color marrón.
Tiras 2	1 x 20	58189	Contiene 20 tiras para INNO-LiPA HLA-B Update Plus marcadas con una banda de marca de color cromo.
Control LiPA	1 x 0.05 ml	58190	Contiene ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y metilisotiazolona (MIT) al 0.01%/ cloracetamida (CAA) al 0.1% como conservante.
Solución de desnaturalización	1 x 1 ml	56718	Solución alcalina con EDTA. El vial debe cerrarse inmediatamente después de usarse; una exposición prolongada de esta solución al aire provocará un rápido deterioro de la intensidad de la desnaturalización.
Solución de hibridación	2 x 80 ml	56719	Tampón EDTA (SSPE) de fosfato sódico salino con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0.5%. La solución de hibridación debe precalentarse a una temperatura de al menos 37°C y no debe superar los 56°C (todos los cristales deben disolverse antes de usarse).
Solución de lavado astringente	2 x 200 ml	56720	Tampón SSPE con SDS al 0.1%. La solución de lavado astringente debe precalentarse a una temperatura de al menos 37°C y no debe superar los 56°C (todos los cristales deben disolverse antes de usarse).
Diluyente de conjugado	1 x 150 ml	55671	Tampón fosfato con NaCl, Triton®, estabilizadores de proteínas y MIT al 0.01%/CAA al 0.1% como conservante.
Conjugado 100x	1 x 1.5 ml	56716	Estreptavidina etiquetada con fosfatasa alcalina en tampón Tris con estabilizadores de proteínas y MIT al 0.01%/CAA al 0.098% como conservante, que debe diluirse en una proporción 1/100 en diluyente de conjugado antes de usarse. Prepare 2 ml de solución de Conjugado de trabajo para cada cubeta de ensayo + 2 ml en exceso (la solución de Conjugado de trabajo debe prepararse durante el lavado astringente) para ensayo manual. Para <i>Auto-LiPA</i> , prepare 10 ml en exceso. La solución de Conjugado de trabajo se mantiene estable durante 24 horas a temperatura ambiente (20 - 25°C) si se almacena en un lugar oscuro.
Tampón sustrato	1 x 235 ml	55732	Tampón Tris con NaCl, MgCl ₂ y MIT al 0.01%/CAA al 0.1% como conservante.

Sustrato BCIP/NBT 100x	1 x 1.5 ml	55723	Sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato (BCIP) y 4-nitroazul de tetrazolio (NBT) en dimetilformamida (DMF), que debe diluirse en una proporción 1/100 en tampón sustrato antes de usarse. Prepare 2 ml de solución de sustrato de trabajo para cada cubeta de ensayo + 2 ml en exceso (la solución de sustrato de trabajo puede prepararse durante la incubación del conjugado) para ensayo manual. Para <i>Auto-LiPA</i> , prepare 10 ml en exceso. La solución de Conjugado de trabajo se mantiene estable durante 24 horas a temperatura ambiente (20 - 25°C) si se almacena en un lugar oscuro.
Solución de lavado 5x	2 x 80 ml	56721	Tampón fosfato con NaCl, Triton® y MIT al 0.05%/CAA al 0.48% como conservante, que debe diluirse en una proporción 1/5 (1 parte + 4 partes) en agua destilada o desionizada antes de usarse. Prepare 8 ml de solución de lavado de trabajo para cada cubeta de ensayo + 10 ml en exceso. Para <i>Auto-LiPA</i> , prepare 20 ml en exceso. La solución de lavado de trabajo se mantiene estable durante 2 semanas a una temperatura entre 2 - 8°C.
Bandeja de incubación	5	-	Cada una contiene 8 cubetas.
Tarjeta de lectura	1	-	Para la identificación de sondas positivas.
Hoja de registro de datos	2	-	Para almacenar las tiras reveladas.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Baño de agua con plataforma de agitación (80 rpm; con cubierta inclinada; temperatura ajustable a 56°C ± 0.5°C).
- Aparato de aspiración.
- Termómetro calibrado.
- Agitador de plataforma orbital, de movimiento recíproco o de balanceo.

Recomendaciones:

Para un agitador orbital:

- el diámetro del movimiento circular debe ser igual o superior a 13 mm
- la velocidad recomendada para un movimiento circular de 13 mm es de 160 rpm.

Para un agitador de movimiento recíproco:

- la velocidad recomendada para el movimiento de ida y vuelta es de 80 movimientos por minuto.

Para un agitador de plataforma de balanceo:

- el ángulo de agitación no debe superar los 13° para evitar que el líquido se derrame
- la velocidad recomendada es de 50 rpm.

- Vórtex o equivalente.
- Probetas graduadas (10, 25, 50 y 100 ml).
- Agua destilada o desionizada.
- Guantes desechables.
- Puntas de pipeta esterilizadas desechables (preferiblemente, con filtro de algodón).
- Pinzas para la manipulación de las tiras.
- Pipetas ajustables que permitan pipetear 1 - 20 µl, 20 - 200 µl y 200 - 1000 µl.
- Multipipeta de distribución (Eppendorf, opcional).
- Cronómetro, 2 horas (± 1 minuto).

Seguridad y medio ambiente

- **Consulte la hoja de datos sobre seguridad del fabricante y el etiquetado del producto para obtener información acerca de componentes potencialmente peligrosos.**



R20/21, R36, R45, R61, S36/37, S45-53

Producto tóxico! (T) Dañino si se inhala o entra en contacto con la piel. Irrita los ojos. Puede provocar cáncer. Puede dañar los fetos. Utilice indumentaria y guantes de protección adecuados. En caso de accidente o si no se siente bien, acuda al médico de inmediato (muestre la etiqueta si es posible). Evite la exposición - consulte las instrucciones especiales de uso. Uso limitado al personal especializado.

Contiene dimetilformamida, sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato: Sustrato BCIP/NBT 100x.



R43, S24-37

Producto irritante! (Xi) Evite el contacto con la piel. Puede causar sensibilización si entra en contacto con la piel. Utilice guantes apropiados.

Contiene 2-cloracetamida: solución de lavado, tampón sustrato, diluyente de conjugado y control LiPA.



R36/38, S23-24-26

Producto irritante! (Xi) Irrita los ojos y piel. Evite inhalar el vapor. Evite el contacto con la piel. En caso de contacto con los ojos, limpie inmediatamente la parte afectada con abundante agua y busque atención médica.

Contiene hidróxido de sodio: Solución de desnaturalización.

- Las muestras deben manipularse como productos potencialmente infecciosos. Por lo tanto, toda la sangre y hemoderivados, y los materiales biológicos, deberán considerarse como potencialmente infecciosos y manipularse como tales. Únicamente el personal debidamente capacitado debe llevar a cabo el procedimiento de ensayo. Toda la sangre y hemoderivados, y todos los materiales biológicos, deben desecharse de acuerdo con los procedimientos de seguridad establecidos.
 - Esterilice en autoclave durante 15 minutos como mínimo a 121°C.
 - Incinere el material desechable.
 - Mezcle los residuos líquidos con hipoclorito sódico (lejía) hasta obtener una concentración final de un $\pm 1\%$ de hipoclorito sódico. Déjelos reposar durante toda la noche antes de eliminarlos. **PRECAUCIÓN:** neutralice los residuos líquidos que contengan ácido antes de añadir el hipoclorito sódico.
- Es imprescindible el uso de equipo protector personal, como guantes y gafas de seguridad, para manipular agentes peligrosos o infecciosos.
- Deseche los residuos de acuerdo con las normas de gestión de residuos de su institución. Asimismo, debe cumplir con todas las normas medioambientales nacionales, autonómicas y locales.

Muestras

Como el ensayo LiPA utiliza como muestra ADN amplificado biotinilado, está disponible un kit de amplificación, INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus, como herramienta asociada.

Procedimientos de manipulación

Manipulación de tiras

- Las tiras están diseñadas para usarse una sola vez.
- No toque las tiras con las manos desnudas; utilice pinzas limpias.
- Utilice un **lápiz** para identificar las tiras de ensayo. No utilice un bolígrafo u otro utensilio. Escriba el identificador por encima de la banda de marcador de las tiras.
- En los distintos pasos de incubación, las tiras de ensayo deben permanecer siempre en la misma cubeta.
- Mantenga las tiras reveladas y las que no se utilicen alejadas de fuentes de luz y calor intensos.
- Espere a que las tiras reveladas se sequen completamente antes de interpretarlas, cubrir las y almacenarlas.
- Las tiras reveladas secas deben almacenarse preferiblemente en un lugar oscuro, a una temperatura entre 20 - 25°C.
- No reutilice las cubetas.

Instrucciones para la incubación manual

- La incubación a 56°C ± 0.5°C durante la hibridación y el lavado astringente es el paso más importante para evitar falsos positivos (temperatura demasiado baja) o falsos negativos/señales muy débiles (temperatura demasiado elevada). Un baño de agua de agitación con una cubierta inclinada ofrece un buen control sobre las variaciones de temperatura. Es necesario realizar un control estricto de la temperatura con un termómetro calibrado.
- **Cierre** siempre la cubierta del baño de agua durante las incubaciones para evitar señales de falso positivo.
- **No utilice un agitador de aire caliente** para la hibridación y el lavado astringente.
- Para la hibridación y el lavado astringente las cubetas deben colocarse en la plataforma de agitación del baño de agua. Ajuste el nivel de agua entre 1/3 y 1/2 de la altura de la cubeta. Asegúrese de que las cubetas no flotan en el agua. El agua debe estar en contacto directo con las cubetas.
- Los pasos de incubación para el revelado de colores deben realizarse a una temperatura entre 20 - 25°C. Si la temperatura fuera inferior a 20°C, se obtendrían resultados menos intensos. Si la temperatura fuera superior a 25°C, se obtendría una señal de fondo intensa o señales falsas.
- Incube siempre durante el tiempo exacto especificado en el protocolo.
- La amplitud del movimiento generado por el baño de agua de agitación (procedimiento de hibridación) y el agitador (procedimiento de revelado de color) es fundamental para lograr la máxima sensibilidad y una coloración uniforme. La superficie de la tira debe quedar completamente sumergida. La amplitud debe ser lo más elevada posible. **Pero debe evitar derramar líquido sobre los bordes de las cubetas.** Esto podría provocar contaminaciones cruzadas y resultados no válidos.
- La agitación durante la incubación de las tiras debe realizarse de forma que tanto el líquido como las tiras de ensayo se muevan de acá para allá en la cubeta, sin que se derrame líquido sobre el borde de la misma.
- No cubra la bandeja. Durante las incubaciones de hibridación y lavado astringente, puede dejar las cubetas descubiertas en el baño de agua. Si se cubren las cubetas con selladores de microplaca, podría producirse contaminación cruzada.

Instrucciones para el cambio manual del líquido de las cubetas

- Debe aspirarse el líquido de la cubeta con una pipeta, preferiblemente conectada a un aspirador de vacío. La bandeja debe sostenerse formando un ángulo para que el líquido pueda fluir a un extremo de la cubeta.
- Añada 2 ml de la solución apropiada a cada cubeta y siga el protocolo. Una multipipeta de distribución (Eppendorf) es útil para este fin.
- Repita este paso tantas veces como se indique en el procedimiento de ensayo.

NOTA:

- No deje que las tiras se sequen entre los dos pasos.

- Evite dañar la superficie de las tiras al aspirar. aspire el líquido en la parte superior de la tira, por encima de la banda de marca.
- Asegúrese de que se aspira todo el líquido.
- Asegúrese de lavar toda la tira meticulosamente sumergiéndola por completo en la solución.
- Si es necesario, ajuste la velocidad del agitador.

Observaciones y precauciones

- Para uso profesional exclusivamente.
- Para evitar la contaminación de ADN, se recomienda una separación física máxima entre los pasos previos y posteriores a la amplificación: las precauciones mínimas para una buena práctica de laboratorio son usar habitaciones, pipetas y demás material de laboratorio independientes, distintos guantes y batas, y distintos lugares de almacenamiento también.
- Evite el retorno de la habitación de operaciones posteriores a la amplificación a la habitación de operaciones previas a la amplificación.
- Se recomienda el uso de material de laboratorio desechable esterilizado en autoclave.
- No reutilice el material de laboratorio desechable.
- Utilice una nueva punta de pipeta esterilizada para cada muestra dividida en alicuotas.
- No utilice reactivos caducados.
- No mezcle reactivos de kits distintos, a menos que los componentes tengan números de lote idénticos.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos.

Procedimiento de ensayo manual

NOTA:

- En los distintos pasos de incubación, las tiras de ensayo deben permanecer siempre en la misma cubeta.

Antes de la incubación, mida la temperatura del baño de agua con un termómetro calibrado y ajústela si es necesario antes de colocar la bandeja. Cierre siempre la cubierta.

En cada ensayo debe incluirse el control LiPA.

Muestras

1. Producto HLA-B amplificado (use 10 µl). Para la preparación de la muestra: consulte las instrucciones de uso de INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus.

NOTA:

- Asegúrese de añadir exactamente 10 µl de muestra amplificada. Si no se añade esta cantidad exacta, podría producirse un resultado de tipo incorrecto.
2. Muestra de control LiPA para INNO-LiPA HLA-B Update Plus (use 10 µl; **la amplificación no es necesaria**).
 3. Muestra de control blanco amplificada (control negativo; use 10 µl).

Desnaturalización e hibridación

1. Caliente un baño de agua de agitación a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Mida la temperatura con un termómetro calibrado y ajústela si es necesario. No se debe superar la temperatura indicada. Precaliente la solución de hibridación y la solución de lavado astringente en un baño de agua a una temperatura de al menos 37°C y que no supere los 56°C . Mézclelas antes de usarlas. Todos los cristales deben disolverse.
2. Utilice pinzas para retirar el número necesario de tiras 1 y 2 de INNO-LiPA HLA-B Update Plus del tubo (una tira 1 y una tira 2 por cada muestra de ensayo para INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus y una tira 1 para el amplímero de INNO-LiPA HLA-Bw4). Incluya ambas tiras para la muestra de control LiPA de INNO-LiPA HLA-B Update Plus y para la muestra de control blanco amplificada. Escriba con lápiz un número de identificación por encima de la banda de marca de color marrón o cromo de la tira.

3. Coloque en la bandeja el número requerido de cubetas de ensayo (dos cubetas por cada muestra de ensayo para HLA-B Multiplex Plus y una cubeta por cada muestra de ensayo para HLA-Bw4).
4. Pipetee 10 µl de solución de desnaturalización en la esquina superior de cada cubeta.
NOTA:
 - Cierre el vial inmediatamente después de usarlo.
5. Añada una muestra de 10 µl (vea Muestras; consulte las instrucciones de uso de INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) y mézclela cuidadosamente pipeteando arriba y abajo.
Utilice siempre puntas de pipeta esterilizadas. Permita que continúe la desnaturalización durante **5 minutos** a una temperatura de 20 - 25°C.
6. Agite la solución de hibridación precalentada y añada **cuidadosamente** 2 ml al producto amplificado desnaturalizado en cada cubeta. Mézclelos agitando suavemente. Evite contaminar las cubetas vecinas al pipetear.
7. Coloque inmediatamente la tira en la cubeta. Las tiras deben quedar completamente sumergidas en la solución.
NOTA:
 - Use guantes desechables y pinzas.
8. Coloque la bandeja en el baño de agua de agitación a una temperatura de 56°C ± 0.5°C (80 rpm; consulte las Instrucciones para la incubación manual), cierre la cubierta e incube durante **30 minutos**.
NOTA:
 - Evite salpicar la cubeta con agua del baño de agitación. Ajuste el nivel de agua entre 1/3 y 1/2 de la altura de la cubeta. Para evitar que la bandeja se deslice, inmovilícela entre dos pesas pesadas.

Lavado astringente

1. Tras la hibridación, retire la bandeja del baño de agua.
2. Sostenga la bandeja formando un ángulo pequeño y aspire el líquido de la cubeta con una pipeta, preferiblemente conectada a un aspirador de vacío. Añada 2 ml de solución de lavado astringente precalentada a cada cubeta y coloque la bandeja en el baño de agua de agitación a 56°C ± 0.5°C, cierre la cubierta e incube durante **3 minutos**.
3. Tras la incubación, retire la bandeja del baño de agua y aspire el líquido de la cubeta.
4. Repita una vez el paso de **3 minutos** de incubación y el paso de aspiración.
5. Por último, añada 2 ml de solución de lavado astringente precalentada a cada cubeta y coloque la bandeja en el baño de agua de agitación a 56°C ± 0.5°C, cierre la cubierta e incube durante **4 minutos**.

Antes de la incubación, mida la temperatura del baño de agua con un termómetro calibrado y ajústela si es necesario. Cierre siempre la cubierta.

NOTA:

- Diluya la solución de Lavado concentrada 5x y Conjugado 100x al realizar el lavado astringente. Vea Reactivos.

Revelado de color

Todas las incubaciones sucesivas deben realizarse a **20 - 25°C en un agitador**. Durante las incubaciones, el líquido y las tiras de ensayo deben moverse de acá para allá en la cubeta para obtener una coloración uniforme.

1. Lave cada tira durante 1 minuto con 2 ml de la solución de Lavado de trabajo (vea las Instrucciones para cambiar el líquido de las cubetas).
2. Añada 2 ml de la solución de Conjugado de trabajo a cada cubeta e incube durante **30 minutos** a la vez que agita la bandeja en el agitador.

NOTA:

- Diluya la solución de sustrato BCIP/NBT 100x unos 10 minutos antes del final de la incubación del conjugado. Vea Reactivos.

3. Lave cada tira dos veces durante **1 minuto** con 2 ml de la solución de Lavado de trabajo y lávela otra vez más con 2 ml de tampón sustrato.
4. Añada 2 ml de la solución de Sustrato de trabajo a cada cubeta e incube durante **30 minutos** a la vez que agita la bandeja en el agitador.

PRECAUCIÓN:

- Use guantes y gafas protectoras.
5. Detenga el revelado de color lavando las tiras dos veces en 2 ml de agua destilada al agitar la bandeja en el agitador durante al menos **3 minutos**.
 6. Utilice las pinzas para retirar las tiras de las cubetas y colocarlas en papel absorbente. Antes de leer los resultados, espere a que las tiras se sequen completamente. Almacene las tiras reveladas y secas en un lugar oscuro.

Procedimiento de ensayo automatizado: Auto-LiPA

El procedimiento de ensayo LiPA es muy apropiado para la automatización. Por tanto, el ensayo *Auto-LiPA* se ha diseñado para controlar completamente los pasos de hibridación, lavado astringente y revelado de color. Este ensayo se ofrece como un sistema sencillo con calentamiento, enfriamiento, aspiración y pipeteado automatizados.

El protocolo estándar *Auto-LiPA 48* describe el ensayo de hasta 24 muestras cuando se utiliza una única tira por canal. Sin embargo, este número puede ser incrementado hasta un máximo de 48. Para realizar esto se pueden incubar dos tiras de un mismo locus en el mismo canal, manteniendo igual el resto de parámetros del protocolo. Hay que tener en cuenta que en este caso ocasionalmente se pueden observar reactividades más débiles para algunas sondas. Por lo tanto, se aconseja que aquellos clientes que quieran incrementar el número de muestras ensayadas validen el protocolo "dos tiras en un canal" en su laboratorio.

Para obtener más información y los protocolos específicos sobre *Auto-LiPA*, póngase en contacto con su distribuidor local.

Resultados

Lectura

En la Ilustración 1 se muestra la posición de las distintas sondas de oligonucleótidos en las tiras de INNO-LiPA HLA-B Update Plus. Una banda se considera positiva si aparece una banda de color morado o marrón claro al final del procedimiento de ensayo.

Ilustración 1 (ver página 15): Ubicación de la banda de marca (banda marrón en la Tira 1 y banda de color cromo en la Tira 2), la banda de control de conjugado (control de conjugado), la banda de control de HLA-B Update Plus (control de HLA-B) y las 66 sondas de ADN específicas de la secuencia en las tiras de INNO-LiPA HLA-B Update Plus.

Validación

- Incluya un control negativo y el control LiPA (para INNO-LiPA HLA-B Update Plus) cada vez que realice un ensayo. Al igual que en cualquier nuevo ensayo, se debe considerar la posibilidad de incluir controles positivos y negativos adicionales hasta que se alcance un elevado grado de confianza en la capacidad de realizar correctamente el procedimiento de ensayo. Se recomienda el uso del ADN de referencia para validar las condiciones de ensayo establecidas.
- Las bandas superiores de las tiras INNO-LiPA HLA-B Update Plus (Ilustración 1) son las bandas de marca (de color marrón y color cromo). Estas bandas permiten orientar correctamente las tiras.
- La siguiente banda controla la adición de solución de Conjugado de trabajo y de solución de Sustrato de trabajo durante el procedimiento de detección. Esta banda debe alinearse con la banda de control de conjugado en la tarjeta de lectura de plástico. Siempre debe ser positiva (de lo contrario, no debe realizarse ninguna interpretación) y debe tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira de un mismo ensayo.

- La siguiente banda es la banda de control de hibridación interna de HLA-B Update Plus (control de HLA-B en la tarjeta de lectura) que indica si se añadió una cantidad adecuada de material amplificado de HLA-B para la hibridación. Esta banda debe ser siempre positiva, excepto para el control negativo de la amplificación múltiplex de HLA-B, pero su intensidad puede variar de una muestra a otra.
- El resultado del ensayo de cada control negativo no debe ofrecer ninguna señal aparente para ninguna de las bandas de la tira, excepto para la amplificación HLA-Bw4, en la que la banda de control de hibridación interna (control de HLA-B) también será positiva.
- La muestra de **control LiPA** para INNO-LiPA HLA-B Update Plus debe producir el siguiente patrón de sondas positivas: Tira 1: control de conjugado, control de HLA-B, 22 y 35. Tira 2: control de conjugado, control de HLA-B, 53, 56 y 57. Todas las demás sondas deben ser negativas. Esta muestra de control consta de oligonucleótidos biotinilados, que complementan las sondas de hibridación mencionadas. La hibridación positiva sobre estas sondas demuestra así un rendimiento satisfactorio del ensayo, que incluye la hibridación, el lavado astringente, el revelado de color y la detección. Un patrón diferente puede indicar problemas de rendimiento del ensayo tales como una temperatura incorrecta durante la hibridación, o desviaciones respecto a los valores de tiempo o temperatura prescritos para la incubación.
- Las intensidades del color de las sondas de una tira pueden diferir de una banda a otra.

Interpretación de los resultados

- Compruebe que el patrón de reactividad de la muestra de control LiPA es correcto.
- La banda de control de conjugado de la tira debe estar alineada con la banda de control de conjugado de la tarjeta de lectura de plástico.
- Compruebe primero si las dos primeras bandas de control son positivas, para poder validar cada tira individual (consulte el apartado Validación).
- Los resultados de determinación de tipo se basan en la reactividad de las sondas del kit. Hay una lista de especificidades de las sondas disponible.
- Identifique todos los números de sonda positivos en la tira de INNO-LiPA HLA-B Update Plus y utilice la tabla de tipos de INNO-LiPA HLA-B Update Plus o una versión del software de interpretación de LiPA (consulte el apartado Software de Interpretación: LiRAS™) para deducir el tipo de HLA-B.
El software suele proporcionar más resultados de los que sugiere el uso al que está destinado el ensayo: interpretación del grupo de alelos, además de todas las combinaciones posibles de alelos. No obstante, no debe considerarse esta información como decisiva, sino como datos adicionales.

Software de interpretación: LiRAS™

El software LiRAS™ para INNO-LiPA HLA se ha diseñado como ayuda para la interpretación de los resultados de LiPA.

Póngase en contacto con el distribuidor local para obtener la versión actualizada más reciente.

Limitaciones del procedimiento

- Este producto sólo debe ser utilizado por personal que haya recibido formación en las técnicas de hibridación.
- Sólo una buena práctica de laboratorio y la realización meticulosa de los procedimientos especificados permitirán la hibridación específica y correcto tipaje de las muestras analizadas.
- Las tiras de INNO-LiPA HLA-B Update Plus han sido diseñadas para proporcionar resolución a nivel de grupo de alelos (B*07 a B*83). No obstante, una combinación de determinados alelos puede dar como resultado una combinación de sondas no única y, por lo tanto, una respuesta ambigua de dos o más combinaciones posibles de alelos.

- Al interpretar los resultados debe tenerse en cuenta la posibilidad de polimorfismos de los nuevos alelos fuera de las regiones de sonda.
- Las bandas de control de HLA-B Update Plus no son específicas de HLA-B únicamente, sino también de algunos alelos HLA-A y HLA-C. Por tanto, las bandas de control HLA-B también pueden reaccionar con productos amplificados con HLA-A y HLA-C.

Eficacia del ensayo

Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de primers HLA-B Multiplex

La evaluación del equipo INNO-LiPA HLA-B Update se realizó en cuatro laboratorios europeos de tipaje de tejidos en tipajes de muestras de rutina. Se analizaron un total de 347 muestras. El DNA se obtuvo de muestras de sangre frescas o congeladas, con EDTA o citrato como anticoagulante. La extracción del DNA se realizó utilizando el "salting out" o los equipos QIAamp 96 DNA blood kit (Qiagen), Genomic DNA Purification kit (Promega) y Puregene (Gentra Systems). El DNA, recién obtenido o congelado, fue amplificado con los termocicladores Perkin Elmer 9600 o 9700, y los amplicones se conservaron a 2 - 8°C o -25/-15°C antes de ser aplicados a las tiras.

No se encontraron fallos en la amplificación, aunque dos muestras tuvieron que ser tipadas dos veces en un centro. Las muestras fueron procesadas utilizando un *Auto-LiPA* y se analizaron con una versión para ensayos clínicos del software de interpretación LiRAS™.

Precisión

Se obtuvo un resultado de tipaje HLA-B para 342 de 347 muestras de DNA. En un centro se tuvo que repetir el tipaje de 4 muestras. Una muestra fue definida como "tipaje no deducible" pero de acuerdo con el investigador esto fue probablemente debido a una contaminación del DNA. Para cuatro muestras de un centro, el investigador no obtuvo ningún resultado en el tipaje, aunque hubo opciones disponibles via modificación para una de ellas.

La exactitud a nivel de grupo de alelos se calculó como porcentaje de concordancia observada con ensayos de DNA alternativos (Biotest ELPHA HLA-AB LowRes Typing kit, Dynal SSP, LiPA HLA-B, secuenciación, Micro SSP™, OLERUP SSP™, Biotest HLA-B SSP). Los resultados del INNO-LiPA HLA-B Update se consideraron concordantes con el ensayo de referencia cuando los dos resultados fueron idénticos, si el resultado del INNO-LiPA HLA-B Update fue más específico que el resultado de referencia o cuando los resultados del INNO-LiPA HLA-B Update mostraron menor resolución pero un resultado correcto en comparación a los métodos de referencia. La exactitud fue del 100% (342/342).

Resolución

(versión v1.0/2001-03-31 de la tabla de tipaje)

El equipo INNO-LiPA HLA-B Update está pensado para determinar alelos HLA-B a nivel de grupo de alelos. 'Grupo de alelos' es la designación de los dos primeros dígitos que siguen al asterisco en la nomenclatura HLA estándar (p.e. HLA B*07). Además, el equipo está pensado para determinar los siguientes alelos nulos: 0808N (exón 3), 1526N (exón 3) y 5111N (exón 4). La resolución a nivel de grupo de alelos observada durante este estudio fue del 92.4% (316/342).

Las ambigüedades observadas fueron B*08xB*51 o B*08xB*78 (8 casos), B*15xB*35 o B*15xB*15 (2 casos), B*35xB*38 o B*39xB*53 (2 casos), B*08xB*38 o B*08xB*39 (2 casos), B*15xB*51 o B*15xB*52 o B*15xB*78 (2 casos), B*35xB*51 o B*53xB*78 (2 casos), B*35xB*38 o B*35xB*53 (1 caso), B*35xB*49 o B*50xB*53 (1 caso), B*35xB*47 o B*53xB*47 (1 caso), B*40xB*78 o B*40xB*52 (1 caso), B*35xB*55 o B*35xB*56 (1 caso), B*15xB*49 o B*15xB*50 (1 caso), B*49xB*78 o B*50xB*51 (1 caso), B*15xB*51 o B*52xB*78 (1 caso).

Para seis de estos casos tanto el ensayo de referencia como el equipo INNO-LiPA HLA-B Update dieron resultados ambiguos. Dos ambigüedades (6 muestras) observadas con el método de referencia fueron reducidas a un único resultado de tipaje utilizando el ensayo INNO-LiPA HLA-B Update.

Reactividad de las sondas

Cuatro sondas reaccionaron como falsos positivos y nueve débilmente como falsos negativos en una o más ocasiones durante el ensayo clínico. Esta información, si aún no estaba presente, se ha aplicado en el software y/o en las instrucciones para facilitar el tipaje. Cuando se utilizó el software de interpretación LiRAS™ todas las falsas reactividades fueron identificadas como tal y se alcanzó un tipaje concordante a nivel de grupo de alelo.

Consultar las instrucciones para información específica sobre la reactividad de las sondas.

Está disponible una lista completa de especificidad de las sondas y los primers. Todas las sondas están diseñadas para hibridar específicamente con su secuencia complementaria a nivel de un mismatch, excepto si está especificado de manera distinta en la lista.

Sensibilidad de la prueba

Una evaluación interna de series de diluciones de tres muestras de DNA, variando de 0.01 µg/µl hasta 2 µg/µl, recomendó el uso de DNA con una concentración mínima de 0.1 µg/µl.

La evaluación externa del equipo incluyó 347 muestras de DNA con una concentración entre 20 y 1500 ng/µl y una pureza (A_{260nm}/A_{280nm}) ≥ 1.5 . El DNA fue diluido hasta una concentración de entre 20 ng/µl y 250 ng/µl antes de la amplificación. No se encontraron fallos en la amplificación, aunque dos muestras tuvieron que ser tipadas dos veces en un centro.

Precisión

Datos internos:

Tres muestras fueron ensayadas por cuadruplicado, por dos personas distintas utilizando el método manual, o por una persona en dos *Auto*-LiPA distintos. Dos muestras fueron analizadas en tres lotes distintos en dos ensayos diferentes. La interpretación de los resultados fue la misma para todas las muestras. La reactividad de las sondas fue comparable en todos los casos.

Validación externa:

- La variación inter-lote fue evaluada analizando un panel de proficiencia (cinco muestras con reactividad e interpretación conocidas) con dos lotes distintos del producto. Para cada muestra se obtuvo el mismo resultado, independientemente del lote utilizado.
- La variación inter-laboratorio fue evaluada analizando el mismo panel de proficiencia en cuatro centros distintos. Cada uno de ellos obtuvo los mismos resultados para las cinco muestras.

Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de primers HLA-Bw4.

La eficacia de la solución de cebador HLA-Bw4 de INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus se evaluó internamente y en dos laboratorios belgas de identificación de tipos de tejido. Se analizaron un total de 82 muestras anónimas (50 muestras externamente y 32 internamente). Previamente se había identificado el tipo de todas las muestras con INNO-LiPA HLA-B Update. 31 de las muestras produjeron resultados ambiguos (18 ambigüedades distintas) y 51 de ellas resultados no ambiguos. Se identificó nuevamente el tipo de todas las muestras ambiguas hasta obtener un único resultado con uno o varios ensayos de identificación del tipo basados en ADN. Todas las hibridaciones se llevaron a cabo con el instrumento *Auto*-LiPA, utilizando el programa HLA56v3, y la interpretación se realizó con una versión de prueba clínica del software de interpretación LiRAS™ para LiPA HLA v3.00.

Sensibilidad de la prueba

La sensibilidad de la prueba del ensayo en el nivel de grupo de alelos se calculó como el número de resultados correctos de identificación del tipo sobre el número total de muestras probadas.

La sensibilidad de la prueba en esta evaluación, tras repetir una prueba de amplificación en cuatro de las muestras, fue del 98,8% (81/82; 95% CI [93,4%; 100%]). La muestra en la que se obtuvieron resultados incorrectos de amplificación tras repetir la prueba en el centro se amplificó de forma correcta internamente y se obtuvo un resultado de identificación del tipo correcto.

Precisión de diagnóstico

Únicamente se llevaron a cabo cálculos de precisión de diagnóstico en las pruebas que se amplificaron correctamente y en las que se produjo un único resultado de referencia. Como consecuencia, dos de las muestras quedaron excluidas de este cálculo. En las 80 muestras restantes se obtuvo un único resultado de identificación del tipo HLA-B.

La precisión de diagnóstico del ensayo en el nivel de grupo de alelos se calculó como el número de resultados correctos de identificación del tipo, en comparación con el resultado único de identificación del tipo obtenido con INNO-LiPA HLA-B Update (Innogenetics) o un ensayo alternativo de identificación del tipo (Olerup SSP (GenoVision), SBT (Abbott), Biotest HLA-B SSP (Biotest), Allset⁺ HLA-B Low Resolution (Dynal) y métodos de secuenciación realizados internamente).

Los resultados de identificación del tipo de todas las muestras (80) concordaron con el ensayo de referencia, por lo que la precisión de diagnóstico fue del 100% (80/80; 95% CI [95,5%; 100%]).

Resolución

(tabla de tipos v.1.4/031010)

La solución de cebador HLA-B Multiplex, utilizada en combinación con las tiras de INNO-LiPA HLA-B Update, se ha diseñado para identificar el tipo de los alelos HLA-B en el nivel de grupo de alelos.

La solución de cebador HLA-Bw4, utilizada en combinación con la tira 1 de INNO-LiPA HLA-B Update, se ha diseñado para resolver las ambigüedades más frecuentes (las referentes a los alelos Bw4/Bw6).

Todas las ambigüedades observadas en el nivel de grupo de alelos tras realizar pruebas con la solución de cebador HLA-B Multiplex se redujeron a un resultado no ambiguo de identificación del tipo con la solución de cebador HLA-Bw4: B*08, B*38 o B*08, B*39 (2 casos); B*08, B*51 o B*08, B*78 (4 casos); B*13, B*49 o B*13, B*50 (2 casos); B*15, B*38 o B*15, B*39 (1 caso); B*15, B*51 o B*15, B*52 o B*15, B*78 (1 caso); B*15, B*51 o B*15, B*52 o B*15, B*78 o B*35, B*52 (1 caso); B*35, B*38 o B*39, B*53 (4 casos); B*35, B*40 o B*40, B*53 (1 caso); B*35, B*47 o B*47, B*53 (1 caso); B*35, B*49 o B*50, B*53 (2 casos); B*35, B*52 o B*53, B*78 (2 casos); B*38, B*44 o B*39, B*44 (1 caso); B*38, B*50 o B*39, B*49 (1 caso); B*38, B*78 o B*39, B*51 (1 caso); B*40, B*49 o B*40, B*50 (2 casos); B*41, B*53 o B*42, B*53 (1 caso); B*44, B*49 o B*44, B*50 (2 casos).

Para resolver todos los resultados ambiguos, el software de interpretación LiRAS™ sugirió utilizar la amplificación Bw4 seguida de una hibridación con la tira 1 de INNO-LiPA HLA-B Update.

Reactividades de las sondas

En una o varias ocasiones durante este estudio, algunas de las sondas tuvieron reacciones débiles. La concordancia de identificación del tipo en el nivel de grupo de alelos se obtuvo cuando se utilizó el software de interpretación LiRAS™.

Precisión

Se evaluó internamente la variación tras comparar un mismo ensayo (repetitividad), varios ensayos y ensayos realizados por varias personas. Una de las muestras, que se había amplificado por duplicado, se probó con el instrumento *Auto-LiPA* utilizando tres termocicladores distintos y procesando dos pruebas en cada termociclador. Dos personas distintas realizaron este mismo protocolo por duplicado.

No se observó ninguna variación significativa y se obtuvo en todos los casos un resultado de identificación del tipo idéntico sin necesidad de edición.

Português

Utilização

O INNO-LiPA HLA-B Update Plus é um ensaio de sondas em linha (LiPA), para uso *in vitro*, desenvolvido para a tipagem molecular, de alelos B do antígeno leucocitário humano (HLA) ao nível do grupo de alelos.

Princípio do teste

Os testes INNO-LiPA HLA baseiam-se no princípio da hibridização reversa. O material com ADN amplificado com biotina é quimicamente desnaturado, as cadeias separadas são hibridizadas com sondas de oligonucleótidos específicos e imobilizadas como linhas paralelas nas tiras das membranas. De seguida é executada a etapa de lavagem rigorosa para remover qualquer material amplificado incompatível. Depois da lavagem rigorosa, a streptavidina conjugada com fosfatase alcalina é adicionada e liga-se a quaisquer híbridos com biotina formados anteriormente. A incubação com uma solução de substrato contendo um cromogénio origina um precipitado púrpura/castanho. Esta reacção é terminada por uma etapa de lavagem e o padrão de reactividade das sondas é registado.

Com o INNO-LiPA HLA-B Update Plus, está disponível um kit de amplificação (INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) para a preparação estandardizada de material biotinilado amplificado. O kit de amplificação tem como base a reacção em cadeia da polimerase (PCR* - polymerase chain reaction).

Os produtos amplificados são em seguida hibridizados usando 2 tiras de tipagem que contêm 66 linhas de sonda específicas da sequência e 2 linhas de controlo (figura 1).

* *A utilização deste produto está protegida por patente da F. Hoffmann - La Roche Ltd. e Roche Molecular Systems, Inc.*

INNO-LiPA HLA-B Update Plus as etapas envolvidas

- | | |
|----------|---|
| 1ª etapa | Amplificação Multiplex do exão 2 a 4 dos alelos HLA-B. |
| 2ª etapa | Hibridização e lavagem rigorosa com 67 linhas de sonda imobilizadas em duas tiras INNO-LiPA HLA-B Update Plus (56°C). |
| 3ª etapa | Revelação da cor. |
| 4ª etapa | Interpretação do padrão de reactividade da sonda. |
| 5ª etapa | Se necessário, o software de interpretação LiRAS™ sugere uma etapa adicional de amplificação e de hibridização. |

Se ao utilizar o kit INNO-LiPA HLA-B Update Plus ocorrerem ambiguidades envolvendo alelos Bw4/Bw6 aconselhamos que comece por (a) e que prossiga com (b). Isto ser-lhe-á aconselhado pelo software de interpretação LiRAS™.

- a amplificação dos exões 2, 3 e 4 dos alelos HLA-B com a solução de iniciadores HLA-B Multiplex precedente à análise com as tiras 1 e 2 do INNO-LiPA HLA-B Update Plus.
- amplificação específica de grupo do exão 2 dos alelos HLA-Bw4 com solução de iniciadores HLA-Bw4 anterior à análise com a tira 1 do INNO-LiPA HLA-B

Update Plus. A solução de iniciadores HLA-Bw4 fornecida amplifica o exão 2 dos alelos HLA-Bw4. O exão 2 ou outros alelos HLA-B não serão amplificados, à exceção dos alelos B*4411, B*4703 e B*5708.

O INNO-LiPA HLA-B Update Plus foi desenvolvido para dar a melhor resolução possível usando o formato de ensaio de hibridização invertida ao nível do grupo de alelos (isto significa que os primeiros dois dígitos depois do asterisco no nome do alelo correspondem à nomenclatura HLA estandardizada, por exemplo HLA-B*07). Além da interpretação do grupo de alelos, o software dará todas as combinações possíveis de alelos. No entanto, esta informação deve ser considerada como informação adicional e não como sendo informação decisiva.

Reagentes

Descrição, preparação para utilização e condições de conservação recomendadas

- Os reagentes, abertos ou fechados, permanecem estáveis até à data limite de validade do kit, se os mantiver a uma temperatura de 2 - 8°C e estiverem guardados nos frascos originais. Não congele os reagentes. Não utilize os reagentes para além da data de validade.
- Não se deve guardar o kit junto de qualquer fonte de contaminação de ADN, em especial de produtos amplificados.
- A temperatura de todos reagentes deve ser elevada à temperatura ambiente (20 - 25°C) aproximadamente 60 minutos antes da utilização e recolocados imediatamente no frigorífico após o uso.
- Alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou deterioração.
- É recomendável guardar o tubo horizontalmente para minimizar a possibilidade das tiras se encarcolarem antes do uso.

Reagentes fornecidos:

Componente	Quantidade	Ref.	Descrição
Tiras 1	1 x 20	58188	Contém 20 tiras para INNO-LiPA HLA-B Update Plus assinaladas com uma linha castanha de marcação.
Tiras 2	1 x 20	58189	Contém 20 tiras para INNO-LiPA HLA-B Update Plus assinaladas com uma linha cromo de marcação.
Controlo LiPA	1 x 0.05 ml	58190	Contém ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e 0.01% de metilisotiazolona (MIT) 0.1% de cloroacetamida (CAA) como conservante.
Solução de desnaturação	1 x 1 ml	56718	Solução alcalina contendo EDTA. Deve-se fechar o frasco imediatamente após uso, a exposição prolongada da solução ao ar resulta na rápida deterioração da força de desnaturação.
Solução de hibridização	2 x 80 ml	56719	Tampão salino de fosfato de sódio EDTA (SSPE) contendo 0.5% sulfato de sódio dodecil (SDS). A solução de hibridização deve ser pré-aquecida até atingir pelo menos os 37°C não podendo a temperatura exceder os 56°C (todos os cristais devem ser dissolvidos antes da sua utilização).
Solução para lavagem rigorosa	2 x 200 ml	56720	Tampão SSPE contendo 0.1% SDS. A solução de lavagem rigorosa deve ser pré-aquecida até atingir pelo menos os 37°C não podendo a temperatura exceder os 56°C (todos os cristais devem ser dissolvidos antes da sua utilização).

Diluyente de conjugado	1 x 150 ml	55671	Tampão fosfato contendo NaCl, Triton®, estabilizadores proteicos e 0.01% MIT/0.1% CAA como conservante.
Conjugado 100x	1 x 1.5 ml	56716	Streptavidina marcada com fosfatase alcalina em tampão tris contendo estabilizadores proteicos e 0.01% MIT/0.098% CAA como conservante, para ser diluída a 1/100 em diluyente conjugado antes de usar. Prepare 2 ml de solução conjugada de trabalho para cada cavidade teste + 2 ml em excesso (a solução conjugada de trabalho pode ser preparada durante a lavagem rigorosa) para o teste manual. Para <i>Auto</i> -LiPA, prepare mais 10 ml. A solução conjugado de trabalho permanece estável durante 24 horas se for armazenada no escuro à temperatura ambiente (de 20 - 25°C).
Tampão de substrato	1 x 235 ml	55732	Tampão Tris contendo NaCl, MgCl ₂ e 0.01% MIT/0.1% CAA como conservante.
Substrato BCIP/NBT 100x	1 x 1.5 ml	55723	Sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina (BCIP) e 4-nitro azul de tetrazólio (NBT) em dimetilformamida (DMF), para ser diluída a 1/100 no tampão de substrato antes de usar. Prepare 2 ml de solução de substrato de trabalho para cada cavidade teste + 2 ml em excesso (a solução de Substrato de trabalho pode ser preparada durante a incubação do conjugado) para o teste manual. Para <i>Auto</i> -LiPA, prepare mais 10 ml. A solução substrato de trabalho permanece estável durante 24 horas se for armazenada no escuro à temperatura ambiente (de 20 - 25°C).
Solução de lavagem 5x	2 x 80 ml	56721	Tampão fosfato contendo NaCl, Triton®, e 0.05% MIT/0.48% CAA como conservante, para ser diluído a 1/5 (1 parte + 4 partes) em água destilada ou desionizada antes de usar. Prepare 8 ml de solução de lavagem de trabalho para cada cavidade teste + 10 ml em excesso. Para <i>Auto</i> -LiPA, prepare mais 20 ml. Armazenada a uma temperatura de 2 - 8°C a solução lavagem de trabalho permanece estável por 2 semanas.
Suporte de teste	5	-	Contendo 8 cavidades cada um.
Cartão de leitura	1	-	Para a identificação de sondas positivas.
Folha de relatório de dados	2	-	Para guardar tiras processadas.

Material necessário não fornecido

- Banho de água com plataforma agitadora (80 rpm; com tampa inclinada, temperatura ajustável até aos 56°C ± 0.5°C).
- Aparelho aspirador.
- Termômetro calibrado.
- Plataforma agitadora orbital, recíproca ou oscilador.

Recomendações:Para um agitador orbital:

- o diâmetro do movimento circular deve ser igual ou superior a 13 mm
- a velocidade recomendada para um movimento circular de 13 mm é de 160 rpm.

Para um agitador recíproco:

- a velocidade recomendada para o movimento de ida e volta é de 80 movimentos por minuto.

Para a plataforma agitadora de oscilação:

- o movimento de agitação não deve exceder dos 13° para evitar o derramamento de líquido
- a velocidade recomendada é de 50 rpm.
- Agitador de vortex ou equivalente.
- Provetas graduados (10, 25, 50 e 100 ml).
- Água destilada ou desionizada.
- Luvas descartáveis.
- Pontas de pipetas estéreis descartáveis (de preferência com filtro de algodão).
- Pinças para manipulação das tiras.
- Pipetas ajustáveis capazes de dispensar 1 - 20 µl, 20 - 200 µl, e 200 - 1000 µl.
- Pipetas dispensadoras multi canal (Eppendorf, opcional).
- Cronómetro, 2 horas (\pm 1 minuto).

Segurança e ambiente

- **Consulte as "safety data sheet" do fabricante e a rotulagem do produto para obter informação sobre componentes potencialmente perigosos.**



R20/21, R36, R45, R61, S36/37, S45-53

Tóxico! (T) Perigoso por inalação e em contacto com a pele. Pode provocar irritação nos olhos. Pode provocar o cancro. Durante uma gravidez pode causar perigo para o bebé. Usar roupas e luvas adequadas e de protecção. Em caso de acidente ou se se sentir mal, procurar conselho médico imediatamente (mostrar o rótulo sempre que possível). Evitar exposição - obter instruções especiais de utilização. Limitado a utilizadores profissionais. **Contém dimetilformamida, sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina:** Substrato BCIP/NBT 100x.



R43, S24-37

Provoca irritação! (Xi) Evite o contacto com a pele. Pode causar sensibilização em contacto com a pele. Utilize luvas de protecção adequadas.

Contém 2-cloroacetamida: Solução de lavagem, tampão substrato, diluente conjugado e controlo LiPA.



R36/38, S23-24-26

Provoca irritação! (Xi) provoca irritação dos olhos e pele. Não respire o vapor. Evite o contacto com a pele. Em caso de contacto com os olhos, lave imediatamente com muita água e procure auxílio médico.

Contém hidróxido de sódio: Solução de desnaturação.

- As amostras devem ser manipuladas como potencialmente infecciosas. Todos os componentes sanguíneos e materiais biológicos devem ser considerados como sendo potencialmente infecciosos e devem ser manipulados em conformidade. O procedimento do teste deve ser realizado apenas por pessoal com formação e qualificações necessárias. Todos os componentes sanguíneos e materiais

biológicos devem ser eliminados em conformidade com os procedimentos de segurança estabelecidos.

- Realize uma autoclavagem durante pelo menos 15 minutos a 121°C.
 - Incinere o material descartável.
 - Misture os resíduos líquidos com hipoclorito de sódio para que a concentração final seja de $\pm 1\%$ de hipoclorito de sódio. Deixe em repouso durante a noite antes de eliminar. CUIDADO: neutralize os resíduos líquidos que contêm ácido antes de adicionar o hipoclorito de sódio.
- É necessário utilizar equipamento de protecção: luvas e óculos de segurança quando manipular agentes perigosos ou infecciosos.
- Os resíduos devem ser manipulados de acordo com as directivas de eliminação de resíduos da instituição. Cumpra também todos os regulamentos ambientais, federais, locais e nacionais.

Amostras

Visto o teste INNO-LiPA HLA-B utilizar material com ADN biotinilado amplificado como amostra, está disponível um kit de amplificação, INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus Amplification, que serve de ferramenta adicional.

Procedimentos de manipulação

Manipulação das tiras

- As tiras foram desenvolvidas para serem utilizadas uma só vez!
- Não pegue as tiras com as mãos, utilize pinças limpas.
- Utilize um **lápiz** para identificar as tiras do teste. Não utilize canetas, etc. Escreva o ID acima da linha de marcação das tiras.
- Durante as várias etapas de incubação, as tiras de teste devem permanecer na mesma cavidade.
- As tiras não utilizadas ou processadas devem ser mantidas ao abrigo de luz forte e do calor.
- Para interpretar, cobrir ou armazenar as tiras processadas aguarde até que estas estejam completamente secas.
- Tiras processadas e secas devem de preferência ser armazenadas no escuro a uma temperatura de 20 - 25°C.
- Não reutilize as cavidades.

Instruções para a incubação manual

- A incubação a 56°C $\pm 0.5^\circ\text{C}$ durante a hibridização e a lavagem rigorosa são as etapas mais importantes para evitar falsos positivos (temperatura demasiado baixa) ou falsos negativos/sinais muito fracos (temperatura demasiado elevada). O uso de um banho de água com agitação e com tampa inclinada assegura um melhor controlo das variações de temperatura. É necessário realizar um controlo rigoroso da temperatura com um termómetro calibrado.
- Durante a incubação deve sempre **fechar** a tampa do banho de água a fim de evitar sinais positivos falsos.
- **Não utilize um agitador de ar quente** para efectuar a hibridização e a lavagem rigorosa.
- Para a hibridização e a lavagem rigorosa deve colocar as cavidades na plataforma agitadora do banho de água. Ajuste o nível da água entre 1/3 e 1/2 da altura da cavidade. Certifique-se que as cavidades não ficam a boiar na água. A água deve estar em contacto directo com as cavidades.
- As etapas de incubação para a revelação da cor devem encontrar-se entre os 20 - 25°C. Uma temperatura inferior aos 20°C pode causar resultados mais fracos. Uma temperatura superior aos 25°C pode causar uma cor de fundo acentuada e/ou sinais positivos falsos.
- Execute a incubação durante o tempo indicado respeitando exactamente o protocolo.
- A amplitude do movimento gerado tanto pela agitação do banho de água (procedimento de hibridização) como pelo agitador (procedimento da revelação da cor) é extremamente importante para obter a máxima sensibilidade e coloração

homogénea. A superfície da tira deve estar totalmente submersa. A amplitude deve ser a mais alta possível. **No entanto, o derrame de líquido pelos cantos da cavidade deve ser evitado!** Isto pode levar à contaminação cruzada e resultados inválidos.

- A agitação durante a incubação das tiras deve ser feita de forma a que tanto o líquido como as tiras de teste se movimentam de cá para lá dentro da cavidade, sem fazer transbordar o líquido das cavidades.
- Não tape as cavidades. Durante as incubações de hibridização e de lavagem rigorosa pode deixar as cavidades destapadas no banho de água. Tapar as cavidades pode causar a contaminação cruzada.

Instruções para mudar manualmente o líquido nas cavidades

- O líquido deve ser aspirado da cavidade com uma pipeta, de preferência ligada a aspirador de vácuo. O suporte é inclinado de modo a permitir que o líquido se desloque para um lado da cavidade.
- Adicione 2 ml da solução apropriada e siga o protocolo. A pipeta dispensadora multi canal (Eppendorf) é útil para esta aplicação.
- Repita esta etapa tantas vezes quantas as indicadas no procedimento de teste.

NOTA:

- Não deixe que as tiras sequem entre as duas etapas.
- Certifique-se de que não danificou a superfície das tiras durante a aspiração. Aspire o líquido pela parte superior da tira, acima da linha de marcação.
- Certifique-se de que aspirou todo o líquido.
- Certifique-se de que a tira foi cuidadosamente lavada por submersão completa na solução de lavagem.
- Adaptar a velocidade do agitador, quando necessário.

Observações e precauções

- Exclusivamente para uso profissional.
- A fim de evitar a contaminação de ADN, é recomendada a máxima separação física entre etapas de pré e pós amplificação: locais diferentes, pipetas e outro material de laboratório diferentes, batas e luvas de laboratório diferentes (armazenagem separada) são precauções mínimas para uma boa prática de laboratório.
- Evite transferir qualquer elemento do local de pós-amplificação para o local de pré-amplificação.
- A utilização de material de laboratório autoclavado descartável é recomendada.
- Não reutilize material de laboratório descartável.
- Utilize uma ponta de pipeta nova por cada amostra aliquotada.
- Não utilize os reagentes para além da data de validade.
- Não misturar reagentes de kits diferentes, a não ser que os componentes tenham números de lote idênticos.
- Evite a contaminação microbiana dos reagentes.

Procedimento para teste manual

NOTA:

- Durante as diferentes etapas de incubação as tiras de teste devem permanecer na mesma cavidade.

Antes da incubação, meça a temperatura do banho de água com um termómetro calibrado e, se necessário, ajuste a temperatura antes de colocar o suporte no banho de água. Feche sempre a tampa.

O controlo LiPA deve ser incluído em cada série de teste.

Amostras

1. Produto HLA-B amplificado (utilize 10 µl). Para a preparação da amostra: veja as instruções de utilização para INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus.

NOTA:

- Assegure-se de que adicionou exactamente 10 µl de amostra amplificada. Uma quantidade superior ou inferior pode resultar numa tipagem errada.
2. Amostra de controlo LiPA para INNO-LiPA HLA-B Update Plus (utilize 10 µl; **não requer amplificação!**)
 3. Amostra amplificada de controlo em branco (controlo negativo, utilize 10 µl).

Desnaturação e hibridização

1. Aqueça um banho de água com agitação aos 56°C ± 0.5°C. Controle a temperatura com um termómetro calibrado e, se necessário, ajuste a temperatura. Não exceda a temperatura indicada. Pré-aqueça a Solução de hibridização e a Solução de lavagem rigorosa no banho de água até atingir uma temperatura mínima de 37°C e não superior aos 56°C. Agite-as antes de usar. Todos os cristais devem estar dissolvidos.
2. Utilize uma pinça para retirar o número de tiras INNO-LiPA HLA-B Update Plus 1 e 2 do tubo (uma tira 1 e uma tira 2 por cada teste de amostra para INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus, e uma tira 1 para o amplificado INNO-LiPA HLA-Bw4). Inclua ambas as tiras para a amostra de controlo LiPA do INNO-LiPA HLA-B Update Plus e para a amostra amplificada de controlo em branco. Com um lápis escreva um número de identificação acima da linha amarela/cromo de marcação da tira.
3. Coloque num suporte o número de cavidades de teste requerido (duas cavidades para cada amostra de teste para HLA-B Multiplex Plus e uma cavidade para cada amostra de teste para HLA-Bw4).
4. Com uma pipeta adicione 10 µl de Solução de desnaturação nos cantos superiores das cavidades.

NOTA:

- Feche o frasco imediatamente depois de uso.
5. Adicione 10 µl de cada amostra (veja Exemplos; veja as instruções de utilização de INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus) e misture cuidadosamente pipetando para cima e para baixo. Utilize sempre pontas de pipetas estéreis. Permita a desnaturação durante **5 minutos** a uma temperatura de 20 - 25°C.
 6. Agite a solução de hibridização pré-aquecida e adicione **cuidadosamente** 2 ml ao produto amplificado desnaturado em cada cavidade. Misture agitando suavemente. Ao pipetar tenha cuidado em não contaminar as cavidades vizinhas.
 7. Coloque imediatamente a tira na cavidade. As tiras devem estar totalmente submergidas na solução.

NOTA:

- Use luvas descartáveis e pinças.
8. Coloque o suporte no banho agitador com água a 56°C ± 0.5°C/80 rpm (veja as Instruções para a incubação manual), feche a tampa e incube durante **30 minutos**.

NOTA:

- Evite salpicar a cavidade com água do banho. Ajuste o nível da água entre 1/3 e 1/2 da altura da cavidade. Para evitar que o suporte escorregue imobilize-o entre dois pesos.

Lavagem rigorosa

1. Após a hibridização retire o suporte do banho com água.
2. Incline o suporte a um ângulo ligeiro e aspire o líquido da cavidade com uma pipeta, de preferência ligada a um aspirador de vácuo. Adicione 2 ml de solução de lavagem rigorosa pré-aquecida a cada cavidade e coloque o suporte no banho agitador com água a 56°C ± 0.5°C, feche a tampa e incube durante **3 minutos**.
3. Após a hibridização retire o suporte do banho com água e aspire o líquido da cavidade.
4. Repita mais uma vez a etapa de incubação de **3 minutos** e a etapa de aspiração.
5. Por último, adicione 2 ml de solução de lavagem rigorosa pré-aquecida a cada cavidade e coloque o suporte no banho agitador com água a 56°C ± 0.5°C,

feche a tampa e incube durante **4 minutos**.

Antes da incubação, meça a temperatura do banho de água com um termómetro calibrado e, se necessário, aqueça ou arrefeça a água.

Feche sempre a tampa.

NOTA:

- Dilua a solução concentrada de lavagem 5x e o conjugado 100x ao realizar a lavagem rigorosa. Veja Reagentes.

Revelação da cor

Todas as incubações seguintes devem ser realizadas **num agitador a uma temperatura de 20 - 25°C**. Durante as incubações, tanto o líquido como as tiras de teste devem movimentar-se para a frente e para trás na cavidade para garantir uma coloração homogénea.

1. Lave cada tira durante 1 minuto com 2 ml de solução de lavagem (veja as Instruções para mudar o líquido nas cavidades).
2. Adicione 2 ml de solução conjugado de trabalho a cada cavidade e incube durante **30 minutos** agitando o suporte no agitador.

Nota:

- Dilua a solução de substrato BCIP/NBT 100x uns 10 minutos antes de acabar a incubação do conjugado. Veja Reagentes.
3. Lave cada tira duas vezes durante **1 minuto** com 2 ml da solução de lavagem de trabalho e adicionalmente mais uma vez com 2 ml de tampão substrato.
 4. Adicione 2 ml da solução de substrato de trabalho a cada cavidade e incube durante **30 minutos** agitando o suporte no agitador.

CUIDADO:

- Utilize luvas e óculos de protecção.
5. Pare a revelação da cor lavando as tiras duas vezes com 2 ml de água destilada, agitando o suporte no agitador durante pelo menos **3 minutos**.
 6. Utilize pinças para retirar as tiras das cavidades e coloque as mesmas em papel absorvente. Espere até as tiras estarem totalmente secas e só depois proceda à leitura dos resultados. Armazene em lugar escuro as tiras secas e processadas.

Procedimento de teste automatizado: Auto-LiPA

O procedimento de teste LiPA é muito apropriado para a automatização.

O que significa que o *Auto-LiPA* foi desenvolvido para controlar totalmente as etapas da hibridização, da lavagem rigorosa e da revelação da cor. O *Auto-LiPA* caracteriza-se por ser um instrumento independente com aquecimento, refrigeração, aspiração e pipetação automatizados.

O protocolo standard para o *Auto-LiPA 48* indica a execução de até 24 amostras quando se utiliza uma única tira por cavidade. Contudo, este número pode ser aumentado até um máximo de 48. Para executar este número, deverão ser testadas duas tiras do mesmo loco numa cavidade, mantendo na mesma todos os outros parâmetros do protocolo. De notar também que poderão ser observadas ocasionalmente reactividades de sonda fracas. Por esse motivo, os utilizadores que pretendam aumentar o número de amostras a testar, são alertados para validar este procedimento de "2 tiras numa cavidade" no seu laboratório.

Para mais informações sobre protocolos específicos do *Auto-LiPA*, contacte o seu distribuidor local.

Resultados

Leitura

A figura 1 mostra a posição das diferentes sondas de oligonucleótidos nas tiras de INNO-LiPA HLA-B Update Plus. Uma linha é considerada positiva quando no final do teste aparecer uma faixa de cor púrpura/castanho claro.

Figura 1 (ver página 15): Lugar da linha de marcação (linha castanha na tira 1 e linha cromo na tira 2), da linha de controlo do conjugado (controlo conj.), da linha de controlo HLA-B Update Plus (controlo HLA-B) e das 66 linhas de sondas de ADN específicas da sequência nas tiras INNO-LiPA HLA-B Update Plus.

Validação

- Inclua um controlo negativo e um controlo LiPA (para INNO-LiPA HLA-B Update Plus) cada vez que realize um teste. Tal como sucede com qualquer outro novo procedimento de teste, até se ter alcançado um grau de confiança mais elevado quanto à execução correcta do procedimento do teste deve ser considerada a inclusão de controlos positivos e negativos adicionais. Recomenda-se a utilização de ADN de referência para validar as condições adequadas estabelecidas.
- As linhas superiores nas tiras de INNO-LiPA HLA-B Update Plus (figura 1) são as linhas de marcação (a linha castanha e cromo). Estas linhas permitem orientar correctamente as tiras.
- A linha seguinte controla a adição do conjugado reactivo e da solução de substrato de trabalho durante o processo de detecção. Esta linha deve ser alinhada com a linha de controlo de conjugado no cartão de leitura de plástico. Esta linha deve ser sempre positiva (caso contrário: não se deve prosseguir a interpretação!) e ter aproximadamente a mesma intensidade em todas as tiras utilizadas durante o mesmo teste.
- A linha seguinte é a linha interna de controlo da hibridização do HLA-B Update Plus (controlo HLA-B no cartão de leitura) que indica se foi ou não adicionado uma quantidade adequada de material amplificado HLA-B à hibridização. Esta linha deve ser sempre positiva, à excepção para o controlo negativo da amplificação HLA-B multiplex, mas a sua intensidade pode divergir entre amostras.
- O resultado do ensaio de cada controlo negativo não deve apresentar nenhum sinal visível em nenhuma das linhas da tira, excepto para a amplificação HLA-Bw4 onde a linha interna de controlo da hibridização (controlo HLA-B) também será positiva.
- A amostra de **controlo LiPA** para o INNO-LiPA HLA-B Update Plus deve apresentar os seguintes padrões de sondas positivas: tira 1: controlo conjugado, controlo HLA-B, 22 e 35; tira 2: controlo conjugado, controlo HLA-B, 53, 56 e 57. Qualquer outra sonda deve apresentar um resultado negativo. Esta amostra de controlo é composta por oligonucleótidos biotinilados, complementares às sondas de hibridização mencionadas. Portanto a hibridização positiva demonstra o desempenho satisfatório do ensaio incluindo a hibridização, lavagem rigorosa, revelação da cor e detecção. Um padrão diferente pode indicar problemas no desempenho do ensaio tais como a utilização de uma temperatura incorrecta durante a hibridização ou o desvio da temperatura ou das vezes de incubação prescritas.
- As intensidades das cores nas sondas numa tira podem divergir de uma linha para a outra.

Interpretação dos resultados

- Verifique a ocorrência de um padrão de reactividade correcto na amostra de controlo LiPA.
- A linha de controlo de conjugado na tira deve estar alinhada com a linha de controlo de conjugado do cartão de plástico para leitura.
- Primeiro verifique se as linhas de controlo (as primeiras duas linhas) são positivas a fim de poder validar cada tira individualmente (veja Validação).
- Os resultados de tipagem baseiam-se na reactividade das sondas do kit. Encontra-se disponível uma lista de especificidades da sonda.
- Identifique todos os números das sondas que estão positivos nas tiras INNO-LiPA HLA-B Update Plus e deduza o tipo de HLA-B usando a tabela de tipagem INNO-LiPA HLA-B Update Plus ou a versão de software de interpretação LiPA (veja o software de interpretação: LiRAS™). Na maioria das vezes o software oferece mais resultados do que indicado na utilização: uma interpretação ao nível do grupo de alelos, bem como todas as

combinações de alelos possíveis. No entanto, esta informação deve ser considerada como informação adicional e não como sendo informação decisiva.

Software de interpretação: LiRAS™

O software LiRAS™ para INNO-LiPA HLA foi desenvolvido para ajudar a interpretar os resultados da LiPA.

Para obter a versão mais recente, contacte o seu distribuidor local.

Limites do procedimento

- A utilização deste produto deve ficar reservado ao pessoal qualificado em técnicas de hibridização.
- Apenas a adopção de uma boa prática de laboratório e a realização meticulosa dos procedimentos específicos permitem a hibridização específica e a determinação do tipo correcto do ADN alvo.
- As tiras INNO-LiPA HLA-B Update Plus foram desenvolvidas para apresentar resultados ao nível do grupo de alelos (B*07 a B*83). No entanto, a combinação de determinados alelos pode resultar numa combinação de sonda não-única e portanto dar uma resposta ambígua de duas ou mais possíveis combinações alélicas.
- Alelos novos podem ter polimorfismos fora das regiões de sonda, o que se deve ter em conta ao efectuar a interpretação dos resultados.
- As linhas de controlo HLA-B Update Plus não são específicas apenas para o HLA-B, mas também abrangem alguns dos alelos HLA-A e alguns dos alelos HLA-C.

Desempenho do teste

Desempenho do teste utilizando ADN obtido com solução de iniciadores HLA-B Multiplex

A avaliação do kit INNO-LiPA HLA-B Update realizou-se em quatro laboratórios europeus de tipagem de tecidos em tipagens de amostras de rotina. Analisaram-se um total de 347 amostras. O ADN obteve-se de amostras de sangue frescas ou congeladas, com EDTA ou citrato como anticoagulante. A extracção do ADN realizou-se utilizando o método de "salting out" ou os kits QIAamp 96 DNA blood kit (Qiagen), Genomic DNA Purification kit (Promega) e Puregene (Gentra Systems).

O ADN, recém obtido ou congelado, foi amplificado com os termocicladores Perkin Elmer 9600 ou 9700, e os amplicons conservaram-se a 2 - 8°C ou -25/-15°C antes de serem aplicados nas tiras.

Não se encontraram falhas na amplificação, ainda que duas amostras tenham tido que ser tipadas duas vezes num dos centros. As amostras foram processadas utilizando um *Auto-LiPA* e foram analisadas com uma versão para ensaios clínicos do software de interpretação LiRAS™.

Precisão

Obteve-se um resultado de tipagem HLA-B para 342 de 347 amostras de ADN. Num centro teve que se repetir a tipagem de 4 amostras. Uma amostra foi definida como "tipagem não deduzível" mas de acordo com o investigador isto foi provavelmente devido a uma contaminação do ADN. Para quatro amostras de um centro, o investigador não obteve nenhum resultado na tipagem, ainda que tenham havido opções disponíveis via modificação para uma delas.

A exactidão a nível de grupo de alelos calculou-se como a percentagem de concordância observada com ensaios de ADN alternativos (Biotest ÉLPHA HLA-AB LowRes Typing kit, Dynal SSP, LiPA HLA-B, sequênciação, Micro SSP™, OLERUP SSP™, Biotest HLA-B SSP). Os resultados do INNO-LiPA HLA-B Update foram considerados concordantes com o ensaio de referência quando os dois resultados foram idênticos, se o resultado do INNO-LiPA HLA-B Update foi mais específico que o resultado de referência ou quando os resultados do INNO LiPA HLA-B Update mostraram menor resolução mas um resultado correcto em comparação com os métodos de referência. A exactidão foi de 100% (342/342).

Resolução

(versão v1.0/2001-03-31 da tabela de tipagem)

O kit INNO-LiPA HLA-B Update está pensado para determinar alelos HLA-B a nível de grupo de alelos. 'Grupo de alelos' é a designação dos dois primeiros dígitos que se seguem ao asterisco na nomenclatura HLA standard (p.e. HLA B*07).

Além disso, o kit está pensado para determinar os seguintes alelos nulos: 0808N (exón 3), 1526N (exón 3) e 5111N (exón 4). A resolução a nível de grupo de alelos observada durante este estudo foi do 92.4% (316/342).

As ambiguidades observadas foram B*08xB*51 ou B*08xB*78 (8 casos), B*15xB*35 ou B*15xB*15 (2 casos), B*35xB*38 ou B*39xB*53 (2 casos), B*08xB*38 ou B*08xB*39 (2 casos), B*15xB*51 ou B*15xB*52 ou B*15xB*78 (2 casos), B*35xB*51 ou B*53xB*78 (2 casos), B*35xB*38 ou B*35xB*53 (1 caso), B*35xB*49 ou B*50xB*53 (1 caso), B*35xB*47 ou B*53xB*47 (1 caso), B*40xB*78 ou B*40xB*52 (1 caso), B*35xB*55 ou B*35xB*56 (1 caso), B*15xB*49 ou B*15xB*50 (1 caso), B*49xB*78 ou B*50xB*51 (1 caso), B*15xB*51 ou B*52xB*78 (1 caso).

Para seis destes casos tanto o ensaio de referência como o kit INNO-LiPA HLA-B Update deram resultados ambíguos.

Duas ambiguidades (6 amostras) observadas com o método de referência foram reduzidas a um único resultado de tipagem utilizando o ensaio INNO-LiPA HLA-B Update.

Reactividade das sondas

Quatro sondas reagiram como falsos positivos e nove débilmente como falsos negativos em uma ou mais ocasiões durante o ensaio clínico. Esta informação, se ainda não estava presente, foi aplicada ao software e/ou nas instruções para facilitar a tipagem. Quando se utilizou o software de interpretação LiRAS™ todas as falsas reactividades foram identificadas como tal e alcançou-se uma tipagem concordante a nível de grupo de alelo.

Consultar as instruções para informação específica sobre a reactividade das sondas.

Está disponível uma lista completa de especificidades das sondas e dos primers. Todas as sondas estão desenhadas para hibridar especificamente com a sua sequência complementar a nível de um mismatch, excepto se está especificado de outro modo na lista.

Sensibilidade do teste

Uma avaliação interna de séries de diluições de três amostras de ADN, variando de 0.01 µg/µl até 2 µg/µl, recomendou o uso de ADN com uma concentração mínima de 0.1 µg/µl.

A avaliação externa do kit incluiu 347 amostras de ADN com uma concentração entre 20 e 1500 ng/µl e uma pureza (A_{260nm}/A_{280nm}) ≥ 1.5 . O ADN foi diluído até uma concentração entre 20 ng/µl e 250 ng/µl antes da amplificação. Não se encontraram falhas na amplificação, ainda que duas amostras tenham tido que ser tipadas duas vezes num dos centros.

Precisão

Dados internos:

Três amostras foram ensaiadas em quadruplicado, por duas pessoas distintas utilizando o método manual, ou por uma pessoa em dois *Auto*-LiPA distintos. Duas amostras foram analisadas em três lotes distintos em dois ensaios diferentes. A interpretação dos resultados foi a mesma para todas as amostras. A reactividade das sondas foi comparável em todos os casos.

Validação externa:

- A variação inter-lote foi avaliada analisando um painel de proficiência (cinco amostras com reactividade e interpretação conhecidas) com dois lotes

distintos do produto. Para cada amostra obteve-se o mesmo resultado, independentemente do lote utilizado.

- A variação inter-laboratório foi avaliada analisando o mesmo painel de proficiência em quatro centros distintos. Cada um deles obteve os mesmos resultados para as cinco amostras.

Desempenho do teste utilizando ADN obtido com solução de iniciadores HLA-Bw4

O desempenho da solução de iniciador HLA-Bw4 do INNO-LiPA HLA-B Multiplex Plus foi avaliado internamente e em dois laboratórios de tipagem de tecido belgas. Foi analisado um total de 82 amostras anónimas (50 amostras externamente; 32 amostras internamente). Todas as amostras foram previamente tipadas com INNO-LiPA HLA-B Update. As amostras incluíam 31 amostras ambíguas (18 ambiguidades diferentes) e 51 amostras não ambíguas. Além disso todas as amostras ambíguas foram tipadas em um resultado único com um ou mais ensaios de tipagem alternativos baseados em ADN.

Todas as hibridizações foram executadas usando o instrumento de *Auto-LiPA*, usando o programa HLA56v3 e a interpretação foi executada usando uma versão experimental clínica do LiRAS™ para o software de interpretação LiPA HLA v3.00.

Sensibilidade do teste

A sensibilidade do teste ao nível do grupo de alelos foi calculada através do número de tipagens bem sucedido sobre o número total de amostras testadas.

A sensibilidade nesta avaliação, depois de uma amplificação de teste repetida de quatro amostras, foi de 98,8% (81/82; 95% CI [93,4%; 100%]). A amplificação da amostra executada num dos centros e que tinha falhado duas vezes, foi repetida internamente com êxito e foi obtido um resultado de tipagem correcto.

Precisão diagnóstica

O cálculo de precisão diagnóstica foi apenas executado para as amostras que foram amplificadas com êxito e para as quais existia um resultado de referência.

Consequentemente, duas amostras foram excluídas deste cálculo.

Para as 80 amostras restantes obteve-se um resultado de tipagem HLA-B único.

A precisão diagnóstica do teste ao nível do grupo de alelos foi calculada através do número de resultados de tipagem correctos em comparação com o resultado de tipagem único do INNO-LiPA HLA-B Update (Innogenetics) ou com um ensaio de tipagem alternativo (Olerup SSP (GenoVision), SBT (Abbott), Biotest HLA-B SSP (Biotest), Allset⁺ HLA-B Low Resolution (Dynal) e sequenciação (método interno)).

Os resultados de tipagem de todas as 80 amostras foram concordantes com o ensaio de referência, o que resulta numa precisão diagnóstica de 100% (80/80; 95% CI [95,5%; 100%]).

Resolução

(tabela de tipagem v.1.4/031010)

O primer multiplex HLA-B, utilizado em combinação com as tiras INNO-LiPA HLA-B Update, foi desenvolvido para tipagem dos alelos HLA-B ao nível do grupo de alelos.

A solução de iniciador HLA-Bw4, utilizada em combinação com a INNO-LiPA HLA-B Update strip 1, foi desenvolvida para resolver as ambiguidades mais frequentes, ou seja ambiguidades envolvendo os alelos Bw4/Bw6.

Todas as ambiguidades observadas, ao nível do grupo de alelos, após o teste com o primer multiplex HLA-B Multiplex, foram reduzidas para um resultado de tipagem não ambígua usando a solução de iniciador HLA-Bw4: B*08, B*38 ou B*08, B*39 (2 casos); B*08, B*51 ou B*08, B*78 (4 casos); B*13, B*49 ou B*13, B*50 (2 casos); B*15, B*38 ou B*15, B*39 (1 caso); B*15, B*51 ou B*15, B*52 ou B*15, B*78 (1 caso); B*15,

B*51 ou B*15, B*52 ou B*15, B*78 ou B*35, B*52 (1 caso); B*35, B*38 ou B*39, B*53 (4 casos); B*35, B*40 ou B*40, B*53 (1 caso); B*35, B*47 ou B*47, B*53 (1 caso); B*35, B*49 ou B*50, B*53 (2 casos); B*35, B*52 ou B*53, B*78 (2 casos); B*38, B*44 ou B*39, B*44 (1 caso); B*38, B*50 ou B*39, B*49 (1 caso); B*38, B*78 ou B*39, B*51 (1 caso); B*40, B*49 ou B*40, B*50 (2 casos); B*41, B*53 ou B*42, B*53 (1 caso); B*44, B*49 ou B*44, B*50 (2 casos).

O software de interpretação LiRAS™ aconselhou para todos os resultados ambíguos a amplificação Bw4 seguida por hibridização com INNO-LiPA HLA-B Update strip 1.

Reactividades de sonda

Em uma ou mais ocasiões deste estudo algumas sondas apresentaram reações fracas. Ao utilizar o software de interpretação LiRAS™ obteve-se uma tipagem concordante ao nível do grupo de alelos.

Precisão

A repetibilidade (intra-ensaio), a variação inter-ensaio e interpessoal foram avaliadas internamente. Uma amostra, amplificada em duplicado usando três termocicladores diferentes e processada em duas séries por cada termociclador, foi testada com o instrumento Auto-LiPA. Este protocolo foi executado em duplicado por duas pessoas diferentes.

Não foi observada variação significativa e em todos os casos se obteve um resultado de tipagem idêntico, não sendo necessário fazer alterações.

