

INNO-LiPA HLA-DRB1 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	6
English	
Intended use	8
Test principle	8
Reagents	9
Description, preparation for use and recommended storage conditions	9
Materials required but not provided	10
Safety and environment	10
Specimens	11
Manipulations procedures	11
Strip handling	11
Directions for manual incubation	12
Directions for manual changing liquid in the troughs	12
Remarks and precautions	12
Manual test procedure	13
Samples	13
Denaturation and hybridization	13
Stringent wash	14
Color development	14
Automated test procedure: <i>Auto-LiPA</i>	14
Results	14
Reading	14
Validation	15
Interpretation of results	15
Interpretation software: LiRAS™	16
Limitations of the procedure	16
Test performance	16
Test performance using DNA obtained with DRB1 Primer Solution in combination with PCR protocol II	16
Test performance using DNA obtained with DRB1 Primer Solution in combination with PCR protocol I	18
Test performance using DNA obtained with DRB1*03,11,13,14 Primer Solution in combination with PCR protocol I	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	23
Directives pour changement des solutions	24
Remarques et précautions	24
Procédure manuelle	25
Echantillons	25
Dénaturation et hybridation	25
Lavage stringent	25
Révélation	26

Procédure automatisée: <i>Auto-LiPA</i>	26
Résultats	26
Lecture	26
Validation	26
Interprétation	27
Logiciel d'interprétation: <i>LiRAS™</i>	27
Limites du test	27
Performances	28
Performances à l'aide d'ADN obtenu à l'aide de la Solution Amorce DRB1 associée au protocole PCR II	28
Performances à l'aide d'ADN obtenu à l'aide de la Solution Amorce DRB1 associée au protocole PCR I	29
Performances à l'aide d'ADN obtenu à l'aide de la Solution Amorce DRB1*03,11,13,14 associée au protocole PCR I	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	34
Herstellung der Proben	35
Handhabung	35
Handhabung der Teststreifen	35
Hinweise zur manuellen Inkubation	35
Anleitung für das manuelle Auswechseln der Flüssigkeit in den Wannen	36
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	36
Manuelles Testverfahren	36
Proben	37
Denaturierung und Hybridisierung	37
Stringent-Waschlösung-Schritt	37
Farbentwicklung	38
Automatisches Testverfahren: <i>Auto-LiPA</i>	38
Ergebnisse	38
Ablesen	38
Validierung	38
Interpretation der Ergebnisse	39
Interpretationssoftware: <i>LiRAS™</i>	39
Grenzen der Methode	39
Leistungsfähigkeit des Tests	40
Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit DRB1 Primer-Lösung in Kombination mit dem PCR-Protokoll II ausgelöst wurde.	40
Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit DRB1 Primer-Lösung in Kombination mit dem PCR-Protokoll I ausgelöst wurde.	42
Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit DRB1*03,11,13,14 Primer-Lösung in Kombination mit dem PCR-Protokoll I ausgelöst wurde.	42
Italiano	
Usso previsto	43
Principio del test	43
Reagenti	44
Descrizione, preparazione per l'uso e condizioni di conservazione raccomandate	44
Materiali richiesti ma non forniti	46
Sicurezza e ambiente	46
Campioni	47
Procedure di manipolazione	47

Trattamento delle strisce	47
Indicazioni per l'incubazione manuale	47
Indicazioni per il cambio manuale dei liquidi nelle vaschette	48
Note e precauzioni	48
Procedura manuale del test	48
Campioni	49
Denaturazione e ibridazione	49
Lavaggio stringente	49
Sviluppo del colore	50
Procedura automatizzata del test: <i>Auto-LiPA</i>	50
Risultati	50
Lettura	50
Validazione	50
Interpretazione dei risultati	51
Software d'interpretazione: LiRAS™	51
Limiti della procedura	51
Performance del Test	52
Esecuzione del test usando DNA ottenuto con soluzione primer DRB1 in combinazione con protocollo PCR II	52
Esecuzione del test usando DNA ottenuto con soluzione primer DRB1 in combinazione con protocollo PCR I	54
Esecuzione dei test usando DNA ottenuto con soluzione primer DRB1*03,11,13,14 in combinazione con protocollo PCR I	54
Español	
Uso al que está destinado	55
Principio del ensayo	55
Reactivos	56
Descripción, preparación para el uso y condiciones de almacenamiento recomendadas	56
Materiales necesarios pero no suministrados	58
Seguridad y medio ambiente	58
Muestras	59
Procedimientos de manipulación	59
Manipulación de tiras	59
Instrucciones para la incubación manual	59
Instrucciones para el cambio manual del líquido de las cubetas	60
Observaciones y precauciones	60
Procedimiento de ensayo manual	60
Muestras	61
Desnaturalización e hibridación	61
Lavado astringente	61
Revelado de color	62
Procedimiento de ensayo automatizado: <i>Auto-LiPA</i>	62
Resultados	62
Lectura	62
Validación	62
Interpretación de los resultados	63
Software de interpretación: LiRAS™	63
Limitaciones del procedimiento	63
Eficacia del ensayo	64
Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de cebador DRB1 en combinación con el protocolo II de PCR	64
Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de cebador DRB1 en combinación con el protocolo I de PCR	66
Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de cebador DRB1*03,11,13,14 en combinación con el protocolo I de PCR	66

Português

Utilização67
Princípio do teste67
Reagentes68
Descrição, preparação para utilização e condições de conservação recomendadas68
Material necessário não fornecido70
Segurança e ambiente70
Amostras71
Procedimentos de manipulação71
Manipulação das tiras71
Instruções para a incubação manual72
Instruções para mudar manualmente o líquido nas cavidades72
Observações e precauções73
Procedimento para teste manual73
Amostras73
Desnaturação e hibridização73
Lavagem rigorosa74
Revelação da cor74
Procedimento de teste automatizado: <i>Auto-LiPA</i>75
Resultados75
Leitura75
Validação75
Interpretação dos resultados75
Software de interpretação: LiRAS™76
Limites do procedimento76
Desempenho do teste76
Desempenho do teste usando ADN obtido com a solução de iniciador DRB1 em combinação com PCR protocolo II76
Desempenho do teste usando ADN obtido com a solução de iniciador DRB1 em combinação com o PCR protocolo I78
Desempenho do teste usando ADN obtido com a solução de iniciador DRB1*03,11,13,14 em combinação com o PCR protocolo I78

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 - diagnostico *in vitro*
 Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
 Dispositivo médico para diagnóstico *In vitro*



Lot number
 Numéro de lot
 Chargennummer
 Numero di lotto
 Número de lote
 Lote número



Catalog number
 Référence catalogue
 Katalognummer
 Codice
 Número del 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
 Bandelettes
 Teststreifen
 Strisce
 Tiras

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
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-DRB1 Plus is a line probe assay, for *in vitro* use, designed for the molecular typing of human leukocyte antigen (HLA) DRB1 alleles at the allele group level (DRB1*01 to DRB1*16).

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-DRB1 Plus kit, an amplification kit (INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus) is available for standardized preparation of biotinylated amplified material. This amplification kit is based on the polymerase chain reaction (PCR*).

Amplification products are subsequently hybridized using 1 typing strip on which 37 sequence-specific DNA probes and 2 control probes are fixed (fig.1).

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

INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus: steps involved

- | | |
|--------|---|
| step 1 | Amplification of exon 2 of the HLA-DRB1 alleles. |
| step 2 | Hybridization and stringent wash with 37 probes immobilized on one INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus strip (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-DRB1 Plus kit, it is advised to start with (a) and proceed to (b), if ambiguities involving DRB1*03,11,13 or 14 alleles with other DRB1 alleles occur. This will be advised by the LiRAS™ interpretation software.

- the amplification of exon 2 of the HLA-DRB1*03,11,13,14 alleles with the HLA-DRB1 primer solution prior to analysis with the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus strip.
- group-specific amplification of exon 2 of the HLA-DRB1*03,11,13,14 alleles with HLA-DRB1*03,11,13,14 primer solution prior to analysis with the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus strip. The primer solution HLA-DRB1*03,11,13,14 provided, amplifies exon 2 of the HLA-DRB1*03,11,13,14 alleles. Exon 2 of other DRB1 alleles will not be amplified, an exception is the allele DRB1*0820.

The INNO-LiPA HLA-DRB1 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-DRB1*01).

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 minimise the possibility that strips curl before use, it is recommended to store the tube horizontally.

Reagents supplied:

Component	Quantity	Ref.	Description
Strips	1 x 20	58191	Containing 20 strips for INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus marked with a black marker line.
LiPA Control	1 x 0.05 ml	58192	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	1 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	1 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 80 ml	56951	Phosphate buffer containing NaCl, Triton®, protein stabilizers, and 0.01% MIT/0.1% CAA as preservative.
Conjugate 100x	1 x 0.8 ml	56952	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-LiPA</i> , 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 180 ml	56953	Tris buffer containing NaCl, MgCl ₂ and 0.01% MIT/0.1% CAA as preservative.

Substrate BCIP/NBT 100x1 x 0.8 ml	56954	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 1 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 10 ml in excess. The Rinse working solution is stable for 2 weeks at 2 - 8°C.
Incubation tray 3	-	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 DRB1 Amp 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 $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 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. DRB1 amplified product (use 10 µl). For sample preparation: see INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus instructions for use.
2. LiPA Control sample for INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (use 10 µl; **amplification is not required!**).
3. Blank amplified control sample (negative control; use 10 µl).

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 temperatures. 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-DRB1 Plus strips from the tube (one strip per test sample). Include a strip for the LiPA Control sample for INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus and for the blank amplified control sample. Pencil an identification number above the black marker line on the strip.
3. Take the required number of test troughs (one trough per test sample) and place them into the tray.
4. Pipette 10 µl Denaturation Solution into the upper corner of each trough.

NOTE:

- Close the vial immediately after use.
5. Add 10 µl sample (see Instructions for use of INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp 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 prewarmed Hybridization Solution and **gently** add 2 ml to the denatured amplified product into each trough. Mix by gentle shaking. Take care not to contaminate neighbouring troughs during pipetting.
 7. Immediately place the strip with the marked side of the membrane up 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 and rinse by rocking the tray briefly (10 - 20 seconds) at 20 - 25°C. Aspirate the solution from each trough. Repeat this brief washing step once.
3. At last, aspirate solution and incubate each strip in 2 ml pre-warmed Stringent Wash Solution in the shaking water bath at 56°C ± 0.5°C for **10 minutes**. Close the lid of the water bath.

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.

1. Wash each strip twice for **1 minute** using 2 ml of the Rinse working solution.
2. 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.
3. Wash each strip twice for **1 minute** using 2 ml of the Rinse working solution and wash once more using 2 ml Substrate Buffer.
 4. Add 2 ml of the diluted Substrate working solution to each trough and incubate for **30 minutes** while agitating the tray on the shaker.

CAUTION:

- Wear gloves and protective goggles.
5. 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**.
 6. 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.

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

Results

Reading

A line is considered positive when a clear purple/brown band appears at the end of the test procedure.

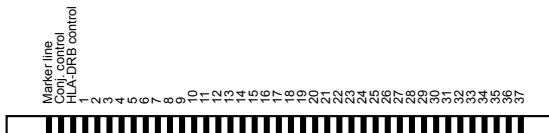


Figure 1: Location of the marker line (black), the conjugate control line (conj.control), the HLA-DRB1 Plus control line (HLA-DRB. Control) and the 37 sequence-specific DNA probes on the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus strip.

Validation

- Include one negative control and the LiPA Control for INNO-LiPA HLA-DRB1 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 line on the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus strip is the marker line (black line). This line allows correct orientation of the strip.
- The next line controls the addition of reactive Conjugate and Substrate 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 and should have approximately the same intensity on each strip in the same test run.
- The next line is the HLA-DRB positive control line (HLA-DRB control on the reading card) which indicates whether or not an appropriate amount of HLA-DRB1 amplified material was added for hybridization. This line should always be positive, except for the negative control, 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 conjugate control line.
- The LiPA Control sample for INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus should yield the following pattern of positive probes: conjugate control, HLA-DRB control, 2, 8, 23, 25, 26, 30, 33, 37. 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 the other.

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.
- 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 on request.
- Identify all probe numbers that are positive on the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus strip and deduce the DRB1 type by using the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus typing table or a version of the LiPA 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 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 procedures specified, will allow specific hybridization and correct typing of target DNA.
- The INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus is designed to give resolution at the allele group level of HLA-DRB1 (this means the first two digits after the asterisk in an allele name when following standard HLA nomenclature e.g. HLA-DRB1*01). However, combinations of certain alleles could lead to a non-unique probe combination and thus to an ambiguous answer of two or more possible allelic combinations. Knowledge of the allele frequencies in the population under study will indicate the most probable DRB1 type. In case a higher resolution typing is required, use the INNO-LiPA HLA-DRB decoder kit.
- New alleles might have polymorphisms outside the probe regions, this should be taken into consideration when interpreting results.
- The sequence at the primer binding site is not known for all alleles. The risk of mismatch at the primer sites is considered to be very low as primer failure has never been observed and more than 80 alleles spanning all groups have been tested. However, the possibility of allelic drop-out should be considered in the event of a homozygous result.

Test performance

Test performance using DNA obtained with DRB1 Primer Solution in combination with PCR protocol II (DRB1; DRB1*3+4+5; 86G; 86V; DQB1)

INNO-LiPA HLA-DRB1 has been evaluated in three European and two North American tissue typing laboratories on routine typing samples.

In the study a total of 243 samples were tested with INNO-LiPAHLA-DRB1.

The results were compared to established classical typing techniques (DNA-based assays (INNO-LiPA DRB *key/decoder*, SSP) and/or serology).

There were no INNO-LiPA HLA-DRB1 amplification failures during the study.

Probe reactivity

In total 74 false positive bands were observed with INNO-LiPA HLA-DRB1. No false negative bands were reported during the study. Consult the guidelines for specific information about 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.

A report on the quality control of the reactivities is available for accreditation purposes on request.

Application range

The lower limit of the application range was determined using a DNA titration series. As little as 0.05 µg extracted DNA ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.5$) can be used in the accompanying amplification assay, yielding more than sufficient DNA for detection in the LiPA.

Resolution

(Typing table used: K-1067/v.5.x/1998-02-20)

The INNO-LiPA HLA-DRB1 strips, with 37 DNA probes immobilized as parallel lines, allow DRB1 allele-group typing. The theoretical resolution at broad level (DRB1*01 to

DRB1*16) is calculated as 89.3%. During the study the overall allele-group resolution achieved was 86.8% (211/243). A total of 32 ambiguous results were described. These arose from seven probe combinations and were reported with the following allele combinations:

DRB1*03 x *11/*13 (8 samples)
DRB1*04 x *11/*13 (3 samples)
DRB1*01 x *13/*14 (3 samples)
DRB1*04 x *13/*14 (6 samples)
and DRB1*03 x *13/*15 (12 samples)

One antigen was ambiguous for **DRB1*11/*13** in 11/83 (13.3%) samples where either DRB1*11 or DRB1*13 was present. These ambiguity causing alleles were reported by the LiPA-Expert software as follows:- DRB1*0308 x *1324 (two samples), DRB1*0415 x *1322/*1323 (three samples) and DRB1*0308 x *1305/*1307/*1311/*1314c75L/*1314c75V (six samples).

In the presence of DRB1*03, where DRB1*13 is given as the alternative allele-group to DRB1*11, the specific DRB1*03 allele is, in each case, DRB1*0308. This allele has been described as having a very similar sequence to DRB1*03011 except at codon 58 where the similarity is with the DRB1*11 allele group. In addition, both the DRB1*0308 and the specific DRB1*13 alleles (DRB1*1305, *1307, *1311, *1314 and *1324), with which it was ambiguously reported, also have an expected low frequency.

In the presence of DRB1*04, either of two rare alleles of DRB1*13 (*1322, *1323) is given as the alternative to DRB1*11 allele-group typing and the only DRB1*04 allele they were reported with is DRB1*0415. There is documented sequence similarities between the specific DRB1*13 alleles involved and the DRB1*11 allelegroup. The frequencies of the DRB1*13 alleles causing ambiguity and of the DRB1*0415 allele are also expected to be low.

One antigen was ambiguous for **DRB1*13/*14** in 9/66 (13.6%) samples where either DRB1*13 or DRB1*14 was present. These ambiguity causing alleles were reported by the LiPA-Expert software as follows:- DRB1*0103 x *1417/*1430 (three samples), DRB1*0402/*0414c13H x *1421 (five samples) and DRB1*0402/ *0414 x *1417/*1430 (one sample).

In the presence of DRB1*04, rare and recently described alleles of DRB1*14 (*1417, *1421 and *1430) are given as the alternative to DRB1*13 allele group typing. The specific DRB1*14 alternatives (*1417 and *1430 - see above) to the DRB1*13 alleles in the presence of DRB1*01 are both expected to occur rarely.

One antigen was ambiguous for **DRB1*13/*15** in 12/97 (12.4%) samples where either DRB1*13 or DRB1*15 was present. These ambiguity causing alleles were reported by the LiPA-Expert software as DRB1*0304 x *1309 (all twelve samples).

The DRB1*1309 alternative to DRB1*15 in the presence of DRB1*03 is a rare allele of Hispanic origin. The DRB1*0304 allele it is reported with is also rare having first been detected in three unrelated Caucasians. This allele has sequence similarities with DRB1*0301, which was given as the first alternative.

Reproducibility

Repeated typing, between differing batches of INNO-LiPA HLA-DRB1, using the DNA derived from clinical samples during the study, resulted in reproducible probe reactivities in every case.

Accuracy

During the external evaluation INNO-LiPA HLA-DRB1 showed complete concordance with the reference methods.

Summary of sample numbers

243	Total number of amplification attempts (no failures)
211	Total number of unambiguous results at allele group level (32 ambiguities)
203/243	Number of samples compared with INNO-LiPA DRB key (used to measure concordancy)
40/243	Number of samples tested by PCR-SSP (also used to measure concordancy).

Test performance using DNA obtained with DRB1 Primer Solution in combination with PCR protocol I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

In order to evaluate the equivalence between PCR protocols I and II, 42 samples were tested in-house using both methods. The PCR products of both protocols gave identical typing results for all samples.

Test performance using DNA obtained with DRB1*03,11,13,14 Primer Solution in combination with PCR protocol I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

The performance of the DRB1*03,11,13,14 Primer Solution of INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus was evaluated in-house and in two Belgian tissue typing laboratories. A total of 89 anonymous samples was analyzed (50 samples externally; 39 in-house). All samples had previously been typed with INNO-LiPA HLA-DRB1. The samples included 14 ambiguous (six different ambiguities) and 75 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.

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 was 100% (89/89; 95% CI [95.9%; 100%]).

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.

Resolution

(typing table v5.8/021112)

The DRB1 Primer Solution, used in combination with the INNO-LiPA HLA-DRB1 strip, is designed for typing HLA-DRB1 alleles at allele group level.

The DRB1*03,11,13,14 Primer Solution, used in combination with the INNO-LiPA HLA-DRB1 strip, is designed to resolve the most frequent ambiguities, i.e., ambiguities involving DRB1*03, 11, 13, and/or 14 alleles.

All ambiguities, at allele group level, observed after testing with the DRB1 Primer Solution, were reduced to an unambiguous typing result using the DRB1*03,11,13,14 Primer Solution: DRB1*01, DRB1*13 or DRB1*01, DRB1*14 (3 cases); DRB1*04, DRB1*13 or DRB1*04, DRB1*14 (6 cases); DRB1*08, DRB1*11 or DRB1*11, DRB1*13 (1 case); DRB1*11, DRB1*12 or DRB1*12, DRB1*13 (2 cases).

For all ambiguous results, the LiRAS™ interpretation software advised DRB1*03,11,13,14 amplification followed by hybridization with the INNO-LiPA HLA-DRB1 strip.

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.

Accuracy

Calculations of diagnostic accuracy were only carried out on samples for which a unique reference result was available. As a consequence, two samples were excluded from this calculation.

A unique HLA-DRB1 typing result was obtained for the remaining 87 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-DRB1 (Innogenetics) or an alternative typing assay (Olerup SSP (GenoVision) or Allset⁺ DR Low Resolution (Dynal)).

The typing results of all 87 samples were concordant with the reference assay, resulting in a diagnostic accuracy of 100% (87/87; 95% CI [95.9%; 100%]).

Français

But du test

INNO-LiPA HLA-B DRB1 Plus est un test sur bandelette à usage *in vitro* pour le typage moléculaire, au niveau du groupe d'allèles, des allèles HLA-DRB1 (Human Leucocyte Antigen) au niveau du groupe d'allèles (DRB1*01 à DRB1*16).

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.

Le kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus est fourni avec un kit d'amplification (INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus) pour la préparation standardisée de matériel amplifié biotinylé. Ce kit d'amplification est basé sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR*).

Les produits amplifiés sont ensuite hybridés avec 1 bandelette LiPA comportant 37 sondes ADN spécifiques et 2 sondes de contrôle (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-DRB1 Plus: étapes

- étape 1 Amplification de l'exon 2 des allèles HLA-DRB1.
 étape 2 Hybridation et lavage stringent avec 37 sondes immobilisées sur une bandelette INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (56°C).
 étape 3 Révélation.
 étape 4 Interprétation du profil de réactivité des sondes.
 étape 5 Si nécessaire, le logiciel d'interprétation LiRAS™ recommande une étape d'amplification et d'hybridation supplémentaire.

Lors de l'utilisation du kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus, il est conseillé de commencer par (a) et de continuer en (b) en cas d'ambiguïtés entre les allèles DRB1*03,11,13 ou 14 et d'autres allèles DRB1. C'est ce que recommandera le logiciel d'interprétation LiRAS™.

- (a) amplification de l'exon 2 des allèles HLA-DRB1*03,11,13,14 à l'aide de la solution Primer HLA-DRB1 avant test avec la bandelette INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus.
 (b) amplification spécifique de groupe de l'exon 2 des allèles HLA-DRB1*03,11,13,14 à l'aide de la solution Primer HLA-DRB1*03,11,13,14 avant test avec la bandelette INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus. La solution Primer HLA-DRB1*03,11,13,14 fournie amplifie l'exon 2 des allèles HLA-DRB1*03,11,13,14. L'exon 2 des autres allèles DRB1 ne sera pas amplifié, exception faite pour l'allèle DRB1*0820.

Le test INNO-LiPA HLA-DRB1 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-DRB1*01).

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 x 20	58191	20 bandelettes INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus marquées avec une ligne de repère noire.
Contrôle LiPA	1 x 0.05 ml	58192	Contient de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 0.01% méthylisothiazolone (MIT)/ 0.1% chloracétamide (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	1 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	1 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 80 ml	56951	Tampon phosphate contenant NaCl, Triton®, protéines stabilisatrices et 0.01% MIT/0.1% CAA comme conservateur.
Conjugué (100x)	1 x 0.8 ml	56952	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 180 ml	56953	Tampon Tris contenant NaCl, MgCl ₂ et 0.01% MIT/0.1% CAA comme conservateur.
Substrat BCIP/NBT 100x	1 x 0.8 ml	56954	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'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	1 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 10 ml supplémentaires. La Solution de travail de Rinçage est stable 2 semaines à 2 - 8°C.

Plaque d'incubation	3	-	Contenant 8 compartiments chacun.
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.
- Eprouvette 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). Eviter 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 pour protection du personnel 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. 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 DRB1 Amp 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°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 d'une bonne pratique 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

NOTE:

- 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 DRB1 amplifié (utiliser 10 µl). Pour la préparation des échantillons: voir le mode d'emploi du test INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus.
2. Contrôle LiPA pour INNO-LiPA HLA-DRB1 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 $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Vérifier la température à l'aide d'un thermomètre calibré et ajuster si nécessaire. Ne pas dépasser les températures indiquées. 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 en plastique, retirer le nombre requis de bandelettes INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus du tube (une bandelette par échantillon). Inclure une bandelette pour le contrôle LiPA pour INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus et pour le contrôle blanc amplifié. A l'aide d'un crayon, inscrire un numéro d'identification au-dessus de la ligne repère noire de la bandelette.
3. Placer le nombre requis de compartiments (un par échantillon) dans le support.
4. A l'aide d'une pipette, déposer 10 µl de Solution de Dénaturation dans le coin supérieur de chaque compartiment.

NOTE:

- Refermer le flacon immédiatement après usage.
5. Ajouter 10 µl d'échantillon (voir le mode d'emploi du test INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus) et homogénéiser soigneusement par flux et reflux. Toujours utiliser des embouts de pipette stériles. Laisser dénaturer pendant **5 minutes** à $20 - 25^{\circ}\text{C}$.
 6. Agiter la Solution d'Hybridation préchauffée et en ajouter **déliatement** 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, le côté marqué de la membrane vers le haut. Les bandelettes doivent être complètement immergées dans la solution.

NOTE:

- 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 incubation manuelle), fermer le couvercle et incuber 30 minutes.

NOTE:

- Eviter 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

3. rincer en agitant le support pendant 10 - 20 secondes à 20 - 25°C. Aspirer la solution de chaque compartiment. Répéter une fois cette brève étape de lavage. Pour terminer, aspirer la solution et incuber chaque bandelette dans 2 ml de solution de Lavage Stringent préchauffée dans le bain-marie agitateur à 56°C ± 0.5°C pendant **10 minutes**. Fermer le couvercle du bain-marie.

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

NOTE:

- Diluer la Solution de Rinçage concentrée (5x) et le Conjugué (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 chaque bandelette deux fois pendant **1 minute** à l'aide de 2 ml de Solution de travail de Rinçage.
2. Ajouter 2 ml de la Solution de travail de Conjugué dans chaque compartiment et incuber 30 minutes sous agitation.

NOTE:

- 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 diluée dans chaque compartiment et incuber **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. A 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.

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

Résultats

Lecture

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 (noire), de la bande contrôle Conjugué (conj. Control), de la bande contrôle HLA-DRB1 Plus (HLB-DRB Control) et des 37 sondes ADN spécifiques sur la bandelette INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus.

Validation

- Inclure un contrôle négatif et le contrôle LiPA pour INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus lors de chaque test. 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.
- La ligne supérieure de la bandelette INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus est la ligne repère (noire). Elle permet d'orienter correctement la bandelette.
 - La bande suivante est le contrôle d'addition des solutions 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. Elle doit toujours être positive et d'intensité plus ou moins similaire sur chaque bandelette d'un même test.
 - La bande suivante est le contrôle positif HLA-DRB (HLA-DRB control de la carte de lecture), qui indique si la quantité de matériel HLA-DRB1 amplifié qui a été ajoutée pour l'hybridation est adéquate ou non). Cette bande doit toujours être positive, sauf pour le contrôle négatif, mais son intensité peut varier d'un échantillon à l'autre.
 - Le résultat du test de chaque contrôle négatif ne doit présenter aucun signal apparent pour aucune des bandes de la bandelette, à l'exception de la bande contrôle Conjugué.
 - Le contrôle LiPA pour INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus doit présenter le profil de sondes positives suivant: contrôle Conjugué, contrôle HLA-DRB, 2, 8, 23, 25, 26, 30, 33, 37. Ce contrôle est composé d'oligonucléotides biotinylés, complémentaires des sondes d'hybridation mentionnées. Une hybridation positive sur ces sondes démontre donc une performance satisfaisante du test comprenant hybridation, lavage stringent, révélation et détection. Un profil différent peut mettre en évidence des problèmes tels qu'une température incorrecte pendant l'hybridation, ou le non-respect des durées ou des températures d'incubation recommandées.
 - L'intensité de couleur des sondes d'une bandelette peut 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 la bande Contrôle conjugué de la carte de lecture en plastique.
- Contrôler que les bandes contrôles (les deux premières bandes) sont positives afin de valider chaque bandelette (voir Validation).
- Les résultats du typage sont basés sur la réactivité des sondes du kit. Une liste des caractéristiques des sondes est disponible sur demande.
- Identifier tous les numéros de sondes positives sur la bandelette INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus et déduire le type DRB1 à l'aide de la table de typage INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus ou d'une version du logiciel d'interprétation LiPA (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™ 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.
- Le test INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus est conçu pour fournir une résolution, au niveau du groupe d'allèles, de HLA-DRB1 (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-DRB1*01). 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. La connaissance des fréquences alléliques dans la population étudiée indiquera

le type DRB1 le plus probable. Si un typage de résolution supérieure était nécessaire, utiliser le kit INNO-LiPA HLA-DRB decoder.

- 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.
- La séquence au site de fixation des amorces n'est pas connue pour tous les allèles. Le risque de mésappariement au site de fixation des amorces est considéré comme très faible étant donné qu'aucun échec d'amorçage n'a jamais été constaté et que plus de 80 allèles parmi tous les groupes ont été testés. Cependant, la possibilité d'un manquement d'allèle ne peut pas être totalement exclue face à un résultat homozygote.

Performances

Performances à l'aide d'ADN obtenu à l'aide de la Solution Amorce DRB1 associée au protocole PCR II (DRB1; DRB1*3+4+5; 86G; 86V; DQB1)

Les performances du test INNO-LiPA HLA-DRB1 ont été évaluées dans trois centres européens et deux centres nord américains d'histocompatibilité sur des échantillons de routine à typer.

Au total, 243 échantillons ont été analysés avec INNO-LiPA HLA-DRB1. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec des méthodes de typage classique bien établies [biologie moléculaire, (INNO-LiPA DRB decoder, SSP) et/ou sérologie]. Aucun échec d'amplification INNO-LiPA HLA-DRB1 n'a été constaté durant cette étude.

Réactivité des sondes

Au total, 74 bandes faussement positives ont été observées avec INNO-LiPA HLA-DRB1. Aucune bande faussement négative n'a été rapportée. Consulter le guide 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 la séquence complémentaire à une base près, à moins que cela ne soit précisé autrement dans la liste. Un rapport de contrôle de qualité des réactivités à des fins d'accréditation est disponible sur demande.

Intervalle d'application

La limite la plus basse de l'intervalle d'application a été déterminée à l'aide d'une série d'ADN titrés. 0.05 µg d'ADN extrait ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.5$) amplifié avec le test d'amplification fourni est plus qu'il n'en faut pour obtenir une détection par LiPA.

Résolution

(Table de typage K-1067/v.5.x/1998-02-20)

Les bandelettes INNO-LiPA HLA-DRB1 avec 37 sondes DNA immobilisées en bandes parallèles permettent un typage DRB1 au niveau groupe d'allèles.

La résolution théorique au niveau générique (DRB1*01 à DRB1*16) est de 89.3%.

Au cours de l'étude, la résolution globale au niveau groupe d'allèles a été de 86.8% (211/243). 32 résultats ambigus ont été obtenus provenant de 7 combinaisons de sondes et ont été rapportés avec les combinaisons d'allèles suivantes:

DRB1*03 x *11/*13 (8 échantillons)
 DRB1*04 x *11/*13 (3 échantillons)
 DRB1*01 x *13/*14 (3 échantillons)
 DRB1*04 x *13/*14 (6 échantillons)
 et DRB1*03 x *13/*15 (12 échantillons)

Un antigène était ambigu pour **DRB1*11/*13** dans 11/83 échantillons (13.3%) où soit DRB1*11 soit DRB1*13 étaient présents. Ces allèles responsables de l'ambiguïté ont été rapportés par le logiciel LiPA-Expert comme suit:

DRB1*0308 x *1324 (2 échantillons), DRB1*0415 x *1322/*1323 (3 échantillons) et DRB1*0308 x *1305/*1307/*1311/*1314c75L/*1314c75V (6 échantillons).

En présence de DRB1*03, alors que DRB1*13 est donné comme groupe d'allèle alternatif à DRB1*11, l'allèle spécifique DRB1*03 est, dans chaque cas, DRB1*0308. Cet allèle a été décrit comme ayant une séquence très semblable à DRB1*03011 excepté au codon 58 pour lequel la similarité de séquence est plutôt avec le groupe d'allèle DRB1*11. De plus, DRB1*0308 et aussi les allèles spécifiques DRB1*13 (DRB1*1305, *1307, *1311, *1314 et *1324), avec lesquels une ambiguïté a été reportée, ont une fréquence attendue très faible.

En présence de DRB1*04, chacun des 2 allèles rares de DRB1*13 (*1322, 1323) est proposé comme alternative au typage de groupe d'allèles DRB1*11 et le seul allèle DRB1*04 qui était rapporté est DRB1*0415. Il a été documenté des similarités de séquence entre les allèles spécifiques DRB1*13 impliqués et le groupe d'allèles DRB1*11. Les fréquences des allèles DRB1*13 pouvant causer des ambiguïtés, ainsi que celle de l'allèle DRB1*0415, sont présumées être faibles.

Un antigène était ambigu pour **DRB1*13/*14** dans 9/66 échantillons (13.6%) où pouvaient être présent DRB1*13 ou DRB1*14. Ces allèles responsables d'ambiguïté étaient rapportés par le logiciel LiPA-Expert comme suit: DRB1*0103 x *1417/*1430 (trois échantillons), DRB1*0402/*0414c13H x *1421 (cinq échantillons) et DRB1*0402/ *0414 x *1417/*1430 (un échantillon).

En présence de DRB1*04, des allèles de DRB1*14 (*1417, *1421 et *1430), rares et nouvellement décrits, sont donnés comme alternative au typage de groupe d'allèles DRB1*13. Les alternatives spécifiques DRB1*14 (*1417 et *1430 - voir ci-dessus) aux allèles DRB1*13, en présence de DRB1*01 sont, pour les deux, attendues comme événement rare.

Un antigène était ambigu pour **DRB1*13/*15** dans 12/97 échantillons (12.4%) où pouvaient être présent DRB1*13 ou DRB1*15. Ces allèles responsables d'ambiguïté étaient rapportés par le logiciel LiPA-Expert comme suit: DRB1*0304 x *1309 (les 12 échantillons).

L'alternative DRB1*1309 au DRB1*15 en présence de DRB1*03 est une allèle rare d'origine hispanique. L'allèle DRB1*0304 qui été reporté avec, est également rare, ayant été reporté la première fois dans trois caucasiens non apparentés. Cet allèle a des similarité de séquence avec DRB1*0301, qui était donné comme première alternative.

Reproductibilité

Des typages répétés par différents lots de INNO-LiPA HLA-DRB1, utilisant l'ADN issu des échantillons cliniques de l'étude ont montré des réactivités de sondes reproductibles dans tous les cas.

Précision

INNO-LiPA HLA-DRB1 a montré durant toute l'évaluation externe une concordance absolue avec les résultats obtenus avec les méthodes de référence.

Récapitulatif des nombres d'échantillons

243	ombre total des amplifications effectuées (aucun échec observé)
211	ombre total de résultats sans ambiguïté au niveau groupe d'allèles (32 ambiguïtés)
203/243	ombre d'échantillons comparés avec INNO-LiPA DRB key (utilisé pour mesure de concordance)
40/243	ombre d'échantillons testés par PCR-SSP (également pour mesure de concordance).

Performances à l'aide d'ADN obtenu à l'aide de la Solution Amorçe DRB1 associée au protocole PCR I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

Pour évaluer l'équivalence entre les protocoles PCR I et II, quarante-deux échantillons ont été testés en interne avec les deux méthodes. Les produits PCR des deux protocoles ont donné des résultats de typage identiques pour tous les échantillons.

Performances à l'aide d'ADN obtenu à l'aide de la Solution Amorce DRB1*03,11,13,14 associée au protocole PCR I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

Les performances de la Solution Amorce DRB1*03,11,13,14 du test INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus ont été évaluées en interne et dans deux laboratoires belges de typage tissulaire. Un total de 89 échantillons anonymes ont été analysés (50 échantillons en externe, 39 en interne). Tous les échantillons avaient été préalablement typés à l'aide de INNO-LiPA HLA-DRB1. Les échantillons incluaient 14 échantillons ambigus (six ambiguïtés différentes) et 75 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 au cours de cette évaluation était de 100% (89/89; 95% CI [95,9%; 100%]).

Précision du diagnostic

Le calcul de la précision du diagnostic n'a été effectué que sur les échantillons présentant un résultat de référence unique. Deux échantillons ont donc été exclus de ce calcul. Un résultat de typage HLA-DRB1 unique a été obtenu pour les 87 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-DRB1 (Innogenetics) ou d'un autre test de typage (Olerup SSP (GenoVision) ou Allset+ DR Low Resolution (Dynal)).

Les résultats du typage des 87 échantillons correspondant au test de référence, la précision du diagnostic était donc de 100% (87/87; 95% CI [95,9%; 100%]).

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.

Résolution

(tableau de typage v5.8/021112)

La Solution Amorce DRB1 utilisée en combinaison avec les bandelettes INNO-LiPA HLA-DRB1 est destinée au typage des allèles HLA-DRB1 au niveau du groupe d'allèles.

La Solution Amorce DRB1*03,11,13,14 utilisée en combinaison avec les bandelettes INNO-LiPA HLA-DRB1 est destinée à résoudre les ambiguïtés les plus fréquentes, c'est-à-dire les ambiguïtés impliquant les allèles DRB1*03, 11, 13 et/ou 14.

Toutes les ambiguïtés, au niveau du groupe d'allèles, observées après le test à l'aide de la Solution Amorce DRB1 ont été réduites à un résultat de typage non ambigu à l'aide de la Solution Amorce DRB1*03,11,13,14: DRB1*01, DRB1*13 or DRB1*01, DRB1*14 (3 cas); DRB1*04, DRB1*13 or DRB1*04, DRB1*14 (6 cas); DRB1*08, DRB1*11 or DRB1*11, DRB1*13 (1 cas); DRB1*11, DRB1*12 or DRB1*12, DRB1*13 (2 cas).

Pour tous les résultats ambigus, le logiciel d'interprétation LiRAS™ a conseillé de procéder à une amplification DRB1*03,11,13,14 suivie d'une hybridation à l'aide de la bandelette INNO-LiPA HLA-DRB1.

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 cycleurs 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-DRB1 Plus handelt es sich um einen „line probe assay“ für die *in vitro*-Verwendung, der für die molekulare Typisierung von DRB1-Allelen des Humanen Leukozyten-Antigens (HLA) auf Allelgruppenniveau entworfen wurde (DRB1*01 bis DRB1*16).

Funktionsweise des Tests

Der INNO-LiPA HLA-Typisierungstest basiert auf dem Prinzip der reversen Hybridisierung. Amplifiziertes, biotinyliertes DNA-Material wird chemisch denaturiert und die Einzelstränge werden mit spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert, die als parallele Linien auf Membranstreifen aufgetragen wurden. Anschließend wird ein Waschschrift mit Stringent-Waschlösung vorgenommen, um unspezifisch gebundenes Amplifikat zu entfernen. Nach diesem Waschschrift mit Stringent-Waschlösung wird mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin hinzugefügt und dieses wird dann von dem zuvor gebildeten biotinylierten Hybriden gebunden. 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 zum INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus-Kit steht ein Amplifikations-Kit (INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus) zur Verfügung, 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 37 sequenzspezifischen DNA-Sonden und 2 Kontrolllinien eines Typisierungstreifens hybridisiert (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-DRB1 Plus: Die einzelnen Schritte

- | | |
|-----------|--|
| Schritt 1 | Amplifikation von Exon 2 der HLA-DRB1-Allele. |
| Schritt 2 | Hybridisierung und Waschschrift mit Stringent-Waschlösung mit 37 Sonden, die auf einem INNO-LiPA HLA-DRB1 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 Hybridisierungsschritt. |

Bei der Verwendung des INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus-Kits wird empfohlen, mit Punkt (a) zu beginnen und dann mit Punkt (b) fortzufahren, falls Mehrdeutigkeiten im Hinblick auf DRB1*03,11,13 oder 14-Allele mit anderen DRB1-Allelen auftreten. Dies wird von der LiRAS™ Interpretation Software empfohlen.

- (a) die Amplifikation von Exon 2 der HLA-DRB1*03,11,13,14-Allele mit der HLA-DRB1 Primerlösung vor der Analyse mit dem INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus-Streifen.

- (b) gruppenspezifische Amplifikation von Exon 2 der HLA-DRB1*03,11,13,14-Allele mit der HLA-DRB1*03,11,13,14 Primerlösung vor der Analyse mit dem INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus-Streifen. Die mitgelieferte HLA-DRB1*03,11,13,14 Primerlösung amplifiziert Exon 2 der HLA-DRB1*03,11,13,14-Allele. Exon 2 anderer DRB1-Allele wird nicht amplifiziert, eine Ausnahme bildet das Allel DRB1*0820.

Der INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus wurde für eine bestmögliche Auflösung auf Allelgruppen-Niveau unter Verwendung der reversen Hybridisierung (d.h. gemäß Standard-HLA-Nomenklatur die ersten zwei Stellen nach dem Stern einer Allelbezeichnung, z. B. DRB1*01).

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 Verfallsdatums.
- 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
Teststreifen	1 x 20	58191	Enthält 20 Streifen für INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus, markiert mit einer schwarzen Markierungslinie.
LiPA-Kontrolle	1 x 0.05 ml	58192	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	1 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	1 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 80 ml	56951	Phosphatpuffer mit NaCl, Triton®, Protein stabilisatoren und 0.01% MIT/ 0.1% CAA als Konservierungsmittel.
100x konzentriertes Konjugat	1 x 0.8 ml	56952	Mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin in Tris-Puffer mit Protein stabilisatoren 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 Konjugatsarbeitslösung bleibt bei Raumtemperatur (20 - 25°C) für 24 Stunden stabil, wenn sie im Dunkeln gelagert wird.
Substratpuffer	1 x 180 ml	56953	Tris-Puffer mit NaCl, MgCl ₂ und 0.01% MIT/ 0.1% CAA als Konservierungsmittel.
100x konzentriertes BCIP/NBT-Substrat	1 x 0.8 ml	56954	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	1 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 10 ml Überschuss her. Die Spülarbeitslösung bleibt bei einer Temperatur von 2 - 8°C für 2 Wochen stabil.
Halter für Inkubationswannen	3	-	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 $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$).
- Absaugvorrichtung.
- Kalibriertes Thermometer.
- Orbitalerschwenker, Horizontal- oder Wippschüttler.

Empfehlungen:Für den Orbitalerschüttler:

- 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 ergänzend ein Amplifikations-Kit zur Verfügung, der INNO-LiPA DRB1 Amp 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.
- Wannern nicht mehrmals benutzen.

Hinweise zur manuellen Inkubation

- Die Inkubation bei 56 °C ± 0.5 °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 Temperaturabweichung. 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 Wannern auf die Schüttelvorrichtung des Wasserbades gelegt werden. Den Wasserstand auf 1/3 bis 1/2 der Höhe der Wanne einstellen. Sicherstellen, dass die Wannern nicht auf dem Wasser schwimmen. Das Wasser muss in direktem Kontakt mit den Wannern 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 (Farbentwicklung) ist wichtig, um eine maximale Sensitivität und eine homogene Färbung 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 Wannen 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 Wannenränder läuft.
- Die Inkubationswannen nicht abdecken. Während der Hybridisierung und des Waschvorgangs mit Stringent-Waschlösungen können die Wannen im Wasserbad ohne Abdeckung verbleiben. Das Abdecken der Wannen mit Abklebefolien für Mikrotiterplatten kann zu einer Kreuzkontamination führen.

Anleitung für das manuelle Auswechseln der Flüssigkeit in den Wannen

- Die Flüssigkeit wird mittels einer Pipette aus den Wannen 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 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 über 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 Verfallsdatums.
- Keine Reagenzien unterschiedlicher Kits mischen, es sei denn, die Bestandteile weisen dieselbe Chargennummer auf.
- Vermeiden Sie mikrobielle Kontaminierung 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 Wannen in das Wasserbad gelegt werden. Deckel des Wasserbads immer schließen. Die LiPA-Kontrolle sollte in jeden Testlauf integriert werden.

Proben

1. DRB1 Amplifikationsprodukt (10 µl verwenden). Für die Vorbereitung der Probe: siehe INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus-Hinweise zur Verwendung.
2. LiPA-Kontrollprobe für INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (10 µl verwenden; **Amplifikation ist nicht erforderlich!**).
3. DNA-freie Amplifikationskontrollproben (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 vorgeschriebenen Temperaturen 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. Mit Hilfe einer Pinzette die erforderliche Anzahl von INNO-LiPA DRB1 Plus-Teststreifen aus dem Röhrchen entnehmen (ein Streifen pro Testprobe). Nehmen Sie zusätzlich einen Streifen für die LiPA-Kontrollprobe beim INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus und für die DNA-freie Amplifikationskontrollprobe. Schreiben Sie mit Bleistift eine Identifizierungsnummer oberhalb der schwarzen Markierungslinie auf dem Streifen.
3. Nehmen Sie die erforderliche Anzahl an Testwannen (eine Wanne pro Testprobe) und legen Sie diese in den Halter.
4. Füllen Sie mit einer Pipette 10 µl Denaturierungslösung in die obere Ecke jeder Wanne.

HINWEIS

- Schließen Sie das Fläschchen unmittelbar nach Gebrauch.
5. 10 µl Probe hinzufügen (siehe Anleitung für die Verwendung des INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp 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 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 mit der markierten Seite nach oben in die Wanne. Die Teststreifen müssen vollständig in die Lösung eingetaucht sein.

HINWEIS:

- Einweghandschuhe tragen und Pinzette verwenden.
8. Wannern in Schüttelwasserbad mit einer Temperatur von $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (80 U/min, siehe Anleitung für die manuelle Inkubation), 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, vorzugsweise an eine Vakuumpumpe angeschlossen, aus den Wannern absaugen. 2 ml vorgewärmte Waschlösung in jede Wanne geben und durch kurzes Schütteln der Schale bei $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ausspülen (10 - 20 Sekunden). Lösung aus jeder Wanne absaugen. Diesen kurzen Waschkvorgang einmal wiederholen.
3. Abschließend die Lösung absaugen und jeden Teststreifen in 2 ml vorgewärmter Stringent-Waschlösung im Schüttelwasserbad bei $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ für **10 Minuten** inkubieren. Die Klappe des Wasserbads schließen.

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. Jeden Teststreifen zweimal für **1 Minute** mit 2 ml Spülarbeitslösung waschen.
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 für **1 Minute** mit 2 ml der Spülarbeitslösung spülen und anschließend nochmals mit 2 ml Substratpuffer waschen.
 4. 2 ml der verdünnten 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.

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

Ergebnisse

AbleSEN

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 (Schwarz), der Konjugatkontrolllinie (conj. Control), der HLA-DRB1 Plus-Kontrolllinie (HLA-DRB. Control) und der 37 sequenzspezifischen DNA-Sonden auf dem INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus-Streifen.

Validierung

- Bei jedem Test eine Negativkontrolle und eine LiPA-Kontrolle für INNO-LiPA HLA-DRB1 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 oberste Linie auf den INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus-Teststreifen ist die Markierungslinie (schwarze Linie). Diese Linie ermöglicht die korrekte Ausrichtung des Teststreifens.
- An Hand 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 und sollte auf allen Teststreifen eines Testlaufs dieselbe Intensität aufweisen.
- Die nachfolgende Linie ist die HLA-DRB-Positivkontrolllinie (HLA-DRB-Kontrolle auf der Ableseschablone), die anzeigt, ob eine ausreichende Menge an HLA-DRB1-Amplifikat für die Hybridisierung zugefügt wurde. Diese Linie muss immer positiv sein, außer bei der Negativkontrolle, ihre Intensität kann jedoch von Probe zu Probe variieren.
- Die Teststreifen aller Negativ-Kontrollen dürfen außer der Konjugatkontrolllinie keine sichtbaren Linien aufweisen.
- Die LiPA-Kontrollprobe für INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus muss das folgende Muster an positiven Sonden aufweisen: Konjugatkontrolle, HLA-DRB-Kontrolle, 2, 8, 23, 25, 26, 30, 33, 37. Diese Kontrollprobe besteht aus biotinylierten Oligonukleotiden, die zu den bereits genannten Hybridisierungssonden komplementär sind. Eine positive Hybridisierung bei diesen Sonden zeigt deshalb eine zufriedenstellende Testdurchführung 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 Sonden auf einem Streifen kann von Linie zu Linie variieren.

Interpretation der Ergebnisse

- LiPA-Kontrollprobe auf korrektes Reaktivitätsmuster überprüfen.
- 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-DRB1 Plus-Teststreifen positiv sind, und den DRB1-Typ mittels der INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus-Typisierungstabelle oder einer Version der LiPA Interpretation Software ermitteln. (LiRAS™). Die Software liefert häufig mehr Ergebnisse als die beabsichtigte Verwendung vermuten lässt: es wird sowohl eine Auswertung der Allelgruppe als auch aller möglichen Allelkombinationen gegeben. Diese Informationen sollten jedoch als Zusatzinformation und nicht als ausschlaggebend berücksichtigt werden.

Interpretationssoftware: LiRAS™

Die LiRAS™ Software hilft bei der Auswertung der LiPA-Ergebnisse. Bitte kontaktieren Sie Ihren lokalen Vertreter für die aktuellste 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.
- Der INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus wurde für eine bestmögliche Auflösung auf Allelgruppen-Niveau für HLA-DRB1 entworfen (d.h., gemäß Standard-HLA-Nomenklatur die ersten zwei Stellen nach dem Stern einer Allelbezeichnung, z. B. HLA-DRB1*01). Eine Kombination bestimmter Allele könnte jedoch zu einer nicht-einzigartigen Sondenkombination und damit zu einer mehrdeutigen Antwort

für zwei oder mehr mögliche Allelkombinationen führen. Kenntnisse der Allelhäufigkeit in der untersuchten Population wird den wahrscheinlichsten DRB1-Typ anzeigen. Für den Fall, dass eine höhere Auflösungstypisierung erforderlich ist, bitte den INNO-LiPA HLA-DRB-Decoder-Kit verwenden.

- Neue Allele könnten Polymorphismen außerhalb der Sondenbereiche haben, dies sollte bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.
- Die Sequenz der Primer-bindenden Stelle ist nicht für alle Allele bekannt. Das Risiko einer unspezifischen Bindung an der Primerbindungsstelle wird als sehr gering eingeschätzt, da ein Versagen der Primer noch nie beobachtet wurde und 80 Allele aller Gruppen getestet wurden. Es sollte jedoch die Möglichkeit eines Allel-Dropouts für den Fall eines homozygoten Ergebnisses berücksichtigt werden.

Leistungsfähigkeit des Tests

Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit DRB1 Primer-Lösung in Kombination mit dem PCR-Protokoll II ausgelöst wurde. (DRB1; DRB1*3+4+5; 86G; 86V; DQB1)

INNO-LiPA HLA-DRB1 wurde in drei Gewebetypisierungslabors in Europa und in zwei Labors in Nordamerika mit Routineproben für die Typisierung evaluiert.

Leistungsfähigkeit

Insgesamt wurden 243 Proben mit INNO-LiPA HLA-DRB1 untersucht. Die Ergebnisse wurden mit klassischen Typisierungstechniken (DNATests [INNO-LiPA DRB key/Decoder, SSP] und/oder serologischen Tests) verglichen. Bei dieser Studie mit dem INNO-LiPA HLA-DRB1 Test traten keine Amplifikationsfehler auf.

Reaktivität der Sonden

Insgesamt traten bei dem INNO-LiPA HLA-DRB1 Test 74 falsch-positive Banden auf. Falsch-negative Banden wurden nicht gefunden. Für weitere Informationen über die Reaktivität der Sonden ziehen Sie bitte die entsprechenden Richtlinien zu Rate. Eine vollständige Liste aller Sonden- und Primerspezifitäten liegt vor. Alle Sonden wurden so hergestellt, dass sie, soweit in der Liste nicht anders angegeben, bis auf eine Fehlpaarung spezifisch mit den komplementären Sequenzen hybridisieren. Auf Anfrage können wir Ihnen einen Bericht über die Qualitätskontrolle der Reaktivitäten zur Verfügung stellen.

Anwendungsbereiche

Das untere Limit des Anwendungsbereiches wurde mit Hilfe einer DNATitrationsserie ermittelt. Die minimale DNA-Menge, die im zugehörigen Amplifikationstest eingesetzt werden kann, um für die Detektion im LiPA-Test ausreichende DNA-Mengen zu amplifizieren, liegt bei 0,05 µg extrahierter DNA ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} > 1,5$).

Auflösung

(Verwendete Typisierungstabelle: K-1067/v.5.x/1998-02-20)

Es ist möglich, mit den INNO-LiPA HLA-DRB1 Streifen, auf denen 37 DNA-Sonden als parallele Banden immobilisiert sind, eine DRB1 Allelgruppen-Typisierung durchzuführen. Die theoretische Auflösung über die gesamte Breite (DRB1*01 bis DRB1*16) wird als 89,3% berechnet.

Die bei der Studie erzielte Auflösung betrug bei der Gesamt-Allelgruppe 86,8% (211/243). Insgesamt wurden 32 nicht eindeutige Ergebnisse erhalten. Diese wurden bei sieben Sondenkombinationen innerhalb der folgenden Allelkombinationen erhalten:

- DRB1*03 x *11/*13 (8 Proben)
- DRB1*04 x *11/*13 (3 Proben)
- DRB1*01 x *13/*14 (3 Proben)
- DRB1*04 x *13/*14 (6 Proben)
- DRB1*03 x *13/*15 (12 Proben)

Bei 11/83 (13,3%) Proben, die entweder DRB1*11 oder DRB1*13 enthielten, war ein Antigen bei **DRB1*11/*13** nicht eindeutig. Diese Allele, die zu Nicht-Eindeutigkeit führen, werden von der LiPA-Expert Software wie folgt angegeben:- DRB1*0308 x *1324 (2 Proben), DRB1*0415 x *1322/*1323 (3 Proben) und DRB1*0308 x *1305/*1307/*1311/*1314c75L/*1314c75V (6 Proben).

In Gegenwart von DRB1*03 wird DRB1*13 als alternative Allelgruppe zu DRB1*11 angegeben. In jedem Fall ist das spezifische DRB1*03- Allel DRB1*0308. Es hat eine sehr ähnliche Sequenz wie DRB1*03011, bis auf Codon 58, das Ähnlichkeit mit der DRB1*11-Allelgruppe aufweist. treten sowohl DRB1*0308 als auch die spezifischen DRB1*13- Allele (DRB1*1305, *1307, *1311, *1314 und *1324), mit denen zusammen es nicht eindeutig bestimmt werden kann, selten auf.

In Gegenwart von DRB1*04 wird bei der Allelgruppen-Typisierung eines der beiden selten auftretenden Allele von DRB1*13 (*1322, *1323) als Alternative zu DRB1*11 angegeben. Das einzige DRB1*04-Allel, mit dem sie zusammen aufgeführt werden, ist DRB1*0415. Zwischen den spezifischen beteiligten DRB1*13-Allelen und der DRB1*11-Allelgruppe wurden Sequenzähnlichkeiten dokumentiert. Sowohl die DRB1*13- Allele, die zu Nicht-Eindeutigkeit führen als auch die des DRB1*0415- Allele treten selten auf.

Ein Antigen war in 9/66 (13,6%) der Proben mit entweder DRB1*13 oder DRB1*14 nicht eindeutig für **DRB1*13/*14**. Diese Allele, die zu Nicht-Eindeutigkeit führen, werden von der LiPA-Expert Software wie folgt angegeben:- DRB1*0103 x *1417/*1430 (3 Proben), DRB1*0402/*0414c13H x *1421 (5 Proben) und DRB1*0402/ *0414 x *1417/*1430 (1 Probe).

In Gegenwart von DRB1*04 werden erst seit kurzem bekannte, selten auftretende Allele von DRB1*14 (*1417, *1421 und *1430) als Alternative zur Allelgruppe DRB1*13 angegeben. Die spezifischen Alternativen DRB1*14, *1417 und *1430 (s. oben) zu den DRB1*13- Allelen in Gegenwart von DRB1*01 werden beide als selten angesehen.

Ein Antigen war in 12/97 (12,4%) der Proben mit entweder DRB1*13 oder DRB1*15 nicht eindeutig für **DRB1*13/*15**. Diese Allele, die zu Nicht-Eindeutigkeit führen, werden von der LiPA-Expert Software wie folgt angegeben: DRB1*0304 x *1309 (alle 12 Proben).

DRB1*1309 als Alternative zu DRB1*15 in Gegenwart von DRB1*03 ist ein seltenes Allel hispanischer Herkunft. Das Allel DRB1*0304, mit dem es zusammen gefunden wurde, tritt ebenfalls selten auf und wurde zuerst bei drei nicht untereinander verwandten Kaukasiern gefunden. Es weist Sequenzähnlichkeiten mit DRB1*0301 auf, das als die erste Alternative angegeben wurde.

Reproduzierbarkeit

Wiederholte Typisierungstestserien mit verschiedenen Chargen des INNO-LiPA HLA-DRB1 Tests mit DNA von während der Studie entnommenen klinischen Proben ergaben in jedem Fall reproduzierbare Reaktivitäten der Sonden.

Richtigkeit

Bei der externen Evaluierung zeigte der INNO-LiPA HLA-DRB1 Test vollständige Übereinstimmung mit den Referenzmethoden.

Zusammenfassung der Probenzahlen

243	Gesamtzahl der Amplifikationen (keine Fehlergebnisse)
211	Gesamtzahl eindeutiger Ergebnisse auf dem Niveau der Allelgruppen (32 Nicht-eindeutige Ergebnisse)
203/243	Probenzahl im Vergleich mit INNO-LiPA DRB key (zur Messung der Konkordanz)
40/243	Zahl der mit PCR-SSP gemessenen Proben (ebenfalls zur Bestimmung der Konkordanz herangezogen).

Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit DRB1 Primer-Lösung in Kombination mit dem PCR-Protokoll I ausgelöst wurde. (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

Um die Äquivalenz zwischen den PCR-Protokollen I und II bewerten zu können, wurden 44 Proben hausintern unter Verwendung beider Methoden getestet. Die PCR-Produkte beider Protokolle ergaben dieselben Typisierungsergebnisse für alle Proben.

Testleistung unter Verwendung von DNA, die mit DRB1*03,11,13,14 Primer-Lösung in Kombination mit dem PCR-Protokoll I ausgelöst wurde. (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

Die Leistung der DRB1*03,11,13,14 Primer-Lösung des INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus wurde hausintern sowie in zwei belgischen Laboren für Gewebetypisierung bewertet. Insgesamt wurden 89 anonyme Proben analysiert (50 Proben außer Haus, 39 hausintern). Alle Proben waren zuvor mit INNO-LiPA HLA-DRB1 typisiert worden. Die Proben enthielten 14 widersprüchliche (sechs verschiedenen Widersprüchlichkeiten) und 75 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 Bewertung lag bei 100% (89/89; 95% CI [95,9%; 100%]).

Diagnostische Genauigkeit

Die Berechnung der diagnostischen Genauigkeit wurde nur für solche Proben durchgeführt, für die individuelle Referenzergebnisse zur Verfügung standen. Daher wurden zwei Proben von der Berechnung ausgeschlossen.

Für die verbleibenden 87 Proben wurden einzigartige HLA-DRB1-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-DRB1 (Innogenetics) oder einem alternativen Typisierungstest (Olerup SSP (GenoVision) oder Allset⁺ DR Low Resolution (Dynal)) ermittelt wurde.

Die Typisierungsergebnisse aller 87 Proben waren übereinstimmend mit dem Referenzassay, was einer diagnostischen Genauigkeit von 100% (87/87; 95% CI [95,9%; 100%]) entspricht.

Reaktivität der Sonden

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.

Auflösung

(Typisierungstabelle v5.8/021112)

Die DRB1-Primer-Lösung, die in Kombination mit dem INNO-LiPA HLA-DRB1-Teststreifen verwendet wird, dient der Typisierung von HLA-DRB1-Allelen auf Allelgruppenebene.

Die DRB1*03,11,13,14 Primer-Lösung, die in Kombination mit dem INNO-LiPA HLA-DRB1-Teststreifen verwendet wird, dient der Auflösung der häufigsten Widersprüchlichkeiten, i. e. Widersprüchlichkeiten in Bezug auf DRB1*03, 11, 13 und/oder 14-Allele.

Alle Widersprüchlichkeiten auf Allelgruppenebene, die nach dem Testen mit der DRB1 Primer-Lösung festgestellt wurden, konnten unter Verwendung der DRB1*03,11,13,14 Primer-Lösung zu einem nicht widersprüchlichen Typisierungsergebnis reduziert werden. DRB1*01, DRB1*13 oder DRB1*01, DRB1*14 (3 Fälle); DRB1*04, DRB1*13 oder DRB1*04, DRB1*14 (6 Fälle); DRB1*08, DRB1*11 oder DRB1*11, DRB1*13 (1 Fall); DRB1*11, DRB1*12 oder DRB1*12, DRB1*13 (2 Fälle).

Für alle widersprüchlichen Ergebnisse empfahl die LiRAS™ Interpretationssoftware eine DRB1*03,11,13,14-Amplifikation, gefolgt von einer Hybridisierung mit dem INNO-LiPA HLA-DRB1-Teststreifen.

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-DRB1 Plus è un test su striscia a sonde allineate (LiPA), per l'uso *in vitro*, progettato per la tipizzazione molecolare degli alleli degli antigeni leucocitari umani (HLA) DRB1 a livello del gruppo allelico (da DRB1*01 a DRB1*16).

Principio del test

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

Insieme al kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus, è disponibile un kit di amplificazione (INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus) per la preparazione standardizzata di materiale amplificato e biotinitato. Questo kit di amplificazione si basa sulla reazione polimerasica a catena (PCR*).

I prodotti di amplificazione vengono successivamente ibridati usando 1 striscia di tipizzazione sulla quale sono fissate 37 sonde DNA sequenza-specifiche e 2 bande di controllo (Figura 1).

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

INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus: passaggi da eseguire

- Punto 1 Amplificazione dell'esone 2 degli alleli HLA-DRB1.
 Punto 2 Ibridazione e lavaggio stringente con 37 sonde immobilizzate su una striscia INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (56°C).
 Punto 3 Sviluppo del colore.
 Punto 4 Interpretazione del pattern di reattività delle sonde.
 Punto 5 Se necessario, il software d'interpretazione LIRAS™ consiglia un ulteriore passaggio di amplificazione e ibridazione.

Se si usa il kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus e si verificano ambiguità che coinvolgono gli alleli DRB1*03,11,13 o 14 con altri alleli DRB1 si consiglia di iniziare dal punto (a) e procedere fino al punto (b). Questo passaggio verrà consigliato dal software d'interpretazione LIRAS™.

- (a) Effettuare l'amplificazione dell'esone 2 dell'allele HLA-DRB1*03,11,13,14 con la soluzione di primer HLA-DRB1 prima dell'analisi con la striscia INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus.
- (b) Effettuare l'amplificazione gruppo-specifica dell'esone 2 degli alleli HLA-DRB1*03,11,13,14 con la soluzione di primer HLA-DRB1*03,11,13,14 prima dell'analisi con la striscia INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus. La soluzione di primer HLA-DRB1*03,11,13,14 in dotazione, amplifica l'esone 2 degli alleli HLA-DRB1*03,11,13,14. L'esone 2 degli altri alleli DRB1 non sarà amplificato (ad eccezione dell'allele DRB1*0820).

L'INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus, utilizzando il principio di ibridazione inversa, è stato progettato per dare la migliore risoluzione possibile 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-DRB1*01).

Oltre ad interpretare il gruppo allelico, il software darà tutte le possibili combinazioni a livello 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**

- Chiusi e conservati a 2 - 8°C, tutti i reagenti del test, incluse le strisce, 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 sorgente di DNA contaminante, specialmente dai prodotti di DNA amplificati.
- Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25°C) approssimativamente 60 minuti prima dell'uso e devono essere riposti in 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 pieghino prima dell'uso, si raccomanda di conservare il tubo in senso orizzontale.

Reagenti in dotazione:

Componente	Quantità	Rif.	Descrizione
Strisce	1 x 20	58191	Tubo di plastica contenente 20 strisce per INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus identificate con una linea di colore nero.
Controllo LiPA	1 x 0.05 ml	58192	Contenente acido etilendiamminotetracetico (EDTA) e 0.01% di metilisotiazolone (MIT)/ 0.1% cloroacetammide (CAA) come conservante.

Soluzione di denaturazione	1 x 1 ml	56718	Flacone con soluzione alcalina contenente EDTA. Il flacone deve essere chiuso immediatamente dopo l'uso; una esposizione prolungata di questa soluzione all'aria porta ad un rapido deterioramento della forza denaturante.
Soluzione di ibridazione	1 x 80 ml	56719	Flacone con soluzione salina-tampone sodio fosfato-EDTA (SSPE) contenente 0.5% sodio dodecil solfato (SDS). La soluzione di ibridazione deve essere pre-riscaldata a una temperatura di almeno 37°C e non deve comunque superare i 56°C (tutti i cristalli devono essere disciolti prima dell'uso).
Soluzione di Lavaggio Stringente	1 x 200 ml	56720	Flacone con 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 80 ml	56951	Tampone fosfato contenente NaCl, Triton®, proteine stabilizzatrici e 0.01% MIT/0.1% CAA come conservante.
Coniugato 100x	1 x 0.8 ml	56952	Streptavidina legata a fosfatasi alcalina in tampone Tris contenente proteine stabilizzatrici e 0.01% MIT/0.098% CAA come conservante, da diluire 1/100 prima dell'uso nel Diluyente Coniugato. Per il test manuale preparare 2 ml di soluzione di lavoro di Coniugato per ciascuna vaschetta del test + 2 ml in eccesso (la soluzione di lavoro del Coniugato può essere preparata durante il Lavaggio Stringente). Per <i>Auto-LiPA</i> , preparare 10 ml in eccesso. La soluzione di lavoro del Coniugato è stabile per 24 ore a temperatura ambiente (da 20 - 25°C) se conservata al buio.
Tampone Substrato	1 x 180 ml	56953	Tampone Tris contenente NaCl, MgCl ₂ e 0.01% MIT/0.1% CAA come conservante.
Substrato BCIP/NBT 100x	1 x 0.8 ml	56954	5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato sale di p-toluidina (BCIP) e 4-nitroblu di tetrazolio (NBT) in dimetilformamide (DMF), da diluire 1/100 in tampone Substrato prima dell'uso. Per il test manuale preparare 2 ml di soluzione di lavoro Substrato per ciascuna vaschetta + 2 ml in eccesso (la soluzione di lavoro Substrato può essere preparata durante l'incubazione del Coniugato). Per <i>Auto-LiPA</i> , 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	1 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. Per il test manuale preparare 8 ml di soluzione di lavoro di Risciacquo per ciascuna vaschetta + 10 ml in eccesso. Per <i>Auto-LiPA</i> , preparare 10 ml in eccesso. La soluzione di lavoro di

			Risciacquo è stabile per 2 settimane a temperatura compresa tra 2 - 8°C.
Vassoi Incubazione	3	-	Contenente 8 vaschette ciascuna.
Carta di lettura	1	-	Per l'identificazione delle sonde positive.
Foglio di report dei dati	2	-	Per la conservazione di strisce sviluppate.

Materiali richiesti ma non forniti

- Bagnomaria con piatto agitante (80 rpm; con coperchio inclinato; temperatura programmabile a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$).
- Sistema di aspirazione.
- Termometro tarato.
- Agitatore orbitale, reciproco o basculante.

Raccomandazioni:

Per un agitatore 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 agitatore reciproco:

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

Per un agitatore basculante:

- l'angolo di oscillazione non deve superare i 13° al fine di evitare fuoriuscita di liquido
- si raccomanda una velocità di 50 rpm.

- Agitatore Vortex o equivalente.
- Cilindri graduati (10, 25, 50 e 100 ml).
- Acqua distillata o deionizzata.
- Guanti monouso.
- Puntali sterili monouso (preferibilmente con filtro).
- Pinzette per maneggiare le strisce.
- Pipette regolabili per dispensare da 1 - 20 μl , da 20 - 200 μl , e da 200 - 1000 μl .
- Pipetta a ripetizione (Eppendorf, opzionale).
- Timer, 2 ore (± 1 minuto).

Sicurezza e ambiente

- **Per cortesia fare riferimento alle schede di sicurezza del produttore e alle etichette del prodotto per informazioni sui 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 - utilizzare le 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 inalare i vapori. Evitare il contatto con la pelle. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente ed abbondantemente con acqua e cercare consulto medico.

Contiene idrossido di sodio: Soluzione di Denaturazione

- Tutti i componenti del sangue ed i materiali biologici devono sempre essere considerati come potenzialmente infetti e manipolati come tali. L'esecuzione del test dovrebbe essere permessa solo a personale adeguatamente preparato. Tutti i componenti di sangue e i materiali biologici dovrebbero essere smaltiti in accordo a procedure di sicurezza standardizzate.
 - Autoclavare per almeno 15 minuti a 121°C.
 - Incenerire il materiale monouso.
 - Miscelare il liquido di scarto con ipoclorito di sodio in modo che la concentrazione finale sia $\pm 1\%$ di 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 equipaggiamento di protezione: indossare guanti e occhiali di sicurezza quando si manipolano agenti pericolosi o infettivi.
- Gli scarti devono essere trattati secondo le linee guida delle istituzioni in materia. Rispettare inoltre i regolamenti sull'ambiente statali e locali.

Campioni

Poichè il test LiPA utilizza come campione DNA biotinilato e amplificato, è disponibile un kit di amplificazione INNO-LiPA DRB1 Amp Plus come strumento di accompagnamento.

Procedure di manipolazione

Trattamento delle strisce

- Le strisce possono essere utilizzate solo una volta!
- Non toccare le strisce a 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 nera di identificazione della striscia.
- Durante i vari passaggi d'incubazione, le strisce devono rimanere sempre nella stessa vaschetta.
- Le strisce non usate e quelle già sviluppate devono essere mantenute lontano da fonti di luce intensa e di calore.
- Lasciare asciugare completamente le strisce prima dell'interpretazione, copertura e conservazione.
- Le strisce sviluppate e asciutte devono essere conservate preferibilmente al buio a 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 è il passaggio più critico per evitare falsi positivi (temperatura troppo bassa) o segnali falsi negativi/molto deboli (temperatura troppo alta). Un bagnomaria in agitazione con coperchio inclinato permette un buon controllo delle variazioni di temperatura. E' necessario un controllo rigoroso della temperatura con un termometro calibrato.
- **Chiudere** sempre il coperchio del bagnomaria durante le incubazioni per evitare segnali positivi falsi.
- **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 nell'acqua. L'acqua deve essere a contatto diretto con le vaschette.

- I passaggi d'incubazione per lo sviluppo del colore devono essere compresi tra 20 - 25°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 elevate colorazioni e/o segnali falsi positivi.
- Incubare sempre esattamente per il tempo indicato nel protocollo.
- L'ampiezza del movimento generato sia dal bagnomaria in agitazione (procedura di ibridazione) che dall'agitatore (procedura di sviluppo di colore) è critica nel raggiungere la massima sensibilità e una colorazione omogenea. La superficie delle strisce deve essere completamente immersa. L'ampiezza deve essere la più grande possibile. **In ogni caso, evitare che i liquidi si riversino sul bordo delle vaschette!** Ciò può portare a cross-contaminazioni e risultati non validi.
- L'agitazione delle strisce durante l'incubazione deve essere eseguita in modo tale che sia il liquido che le strisce di test si muovano avanti e indietro nella vaschetta, senza che il liquido arrivi a versarsi oltre il bordo delle vaschette.
- Non coprire il vassoio portavaschette. Durante le incubazioni di ibridazione e di lavaggio stringente, le vaschette possono essere lasciate scoperte dentro il bagnomaria. Coprire le vaschette con copripiastra adesivo può causare cross-contaminazione.

Indicazioni per il cambio manuale dei liquidi nelle vaschette

- Il liquido va aspirato dalla vaschetta con una pipetta, preferibilmente attaccata a un aspiratore a vuoto. Il vassoio va tenuto inclinato per permettere a tutto il liquido di raccogliersi ad un angolo 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 asciugare le strisce tra due lavaggi.
- Assicurarsi di non danneggiare la superficie delle strisce durante l'aspirazione. Aspirare il liquido sopra la linea di identificazione della striscia.
- Assicurarsi che tutto il liquido sia stato aspirato.
- Assicurarsi che l'intera striscia venga accuratamente lavata immergendola completamente nella soluzione.
- Adattare se necessario la velocità dell'agitatore.

Note e precauzioni

- Solo per uso professionale.
- Per evitare contaminazione da DNA, si raccomanda la massima separazione fisica tra i passaggi di pre- e post- amplificazione: stanze separate, pipette e altro materiale di laboratorio dedicato, camici e guanti separati (comprese le loro scorte) sono precauzioni minime per una buona pratica di laboratorio.
- Evitare di tornare dalla stanza di post-amplificazione alla stanza di pre-amplificazione.
- Si raccomanda l'uso di materiale di laboratorio monouso autoclavato.
- Non riutilizzare il materiale di laboratorio monouso.
- Usare un nuovo puntale sterile per ciascun campione aliquotato.
- Non usare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Non miscelare i reagenti tra kit a meno che i componenti abbiano lo stesso numero di lotto.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti.

Procedura manuale del test

NOTA:

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

Prima dell'incubazione, verificare la temperatura del bagnomaria usando un termometro tarato, e regolare la temperatura se necessario prima di posizionare il portavaschetta nel bagnomaria. Chiudere sempre il coperchio. Il Controllo LiPA dovrebbe essere sempre incluso in ciascuna seduta.

Campioni

1. Prodotti amplificati DRB1 (usare 10 µl). Per la preparazione del campione: vedi le istruzioni per l'uso INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus.
2. Controllo LiPA per INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (usare 10 µl; **l'amplificazione non è richiesta!**).
3. Controllo bianco amplificato (controllo negativo; usare 10 µl).

Denaturazione e ibridazione

1. Riscaldare un bagnomaria con agitazione a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Controllare la temperatura usando un termometro tarato, e regolare la temperatura se necessario. Non superare le temperature indicate. Preriscaldare la Soluzione d'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 sciolti.
2. Usando un paio di pinzette, rimuovere il numero richiesto di strisce INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus dal tubo (una striscia per campione di test). Includere una striscia per il Controllo LiPA di INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus e una striscia per il controllo bianco. Apporre a matita un numero identificativo sopra la linea di identificazione della striscia.
3. Prelevare il numero richiesto di vaschette (una per ciascuna striscia) e alloggiarle nel vassoio portavaschette.
4. Pipettare 10 µl di soluzione di denaturazione nell'angolo superiore di ciascuna vaschetta.

NOTA:

- Chiudere il flacone immediatamente dopo l'uso.
5. Aggiungere 10 µl di campione (vedi Istruzioni per l'uso di INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus) e miscelare attentamente pipettando su e giù. Usare sempre puntali sterili. Lasciare a denaturare per **5 minuti** a $20 - 25^{\circ}\text{C}$.
 6. Agitare la Soluzione di Ibridazione pre-riscaldata e aggiungerne **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. Porre immediatamente le strisce nelle vaschette con il lato contrassegnato dalla linea identificativa nera rivolta verso l'alto. Le strisce devono essere completamente immerse nella soluzione.

NOTA:

- Indossare guanti monouso e usare le pinzette.
8. Porre il vassoio portavaschette nel bagnomaria in agitazione a una temperatura di $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (80 rpm; vedere le indicazioni per l'incubazione manuale), chiudere il coperchio e incubare per 30 minuti.

NOTA:

- Evitare che l'acqua del bagnomaria schizzi dal bagnomaria nella vaschetta. Regolare il livello dell'acqua tra 1/3 e 1/2 dell'altezza della vaschetta. Per prevenire lo scivolamento del portavaschette, immobilizzarlo tra due oggetti pesanti.

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 preriscaldata in ciascuna vaschetta e lavare agitando brevemente il portavaschette (da 10 - 20 secondi) a temperatura compresa tra $20 - 25^{\circ}\text{C}$. Aspirare la soluzione da ciascuna vaschetta. Ripetere questo breve passaggio di lavaggio ancora una volta.

- Al termine, aspirare la soluzione e incubare ciascuna striscia in 2 ml di Soluzione di Lavaggio Stringente pre-riscaldata nel bagnomaria in agitazione a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ per **10 minuti**. Chiudere il coperchio del bagnomaria.

Prima dell'incubazione, controllare la temperatura del bagnomaria usando un termometro tarato, 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 devono muoversi avanti e indietro nella vaschetta per ottenere una colorazione omogenea.

- Lavare due volte ogni striscia per **1 minuto** usando 2 ml della Soluzione di Risciacquo.
 - Aggiungere 2 ml di soluzione di lavoro Coniugato a ciascuna vaschetta e incubare per 30 minuti sull'agitatore.
- NOTA:**
- Diluire la soluzione Substrato BCIP/NBT 100x circa 10 minuti prima della fine dell'incubazione del Coniugato. Vedi Reagenti.
- 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 di Tampone Substrato.
 - Aggiungere 2 ml di soluzione di lavoro Substrato a ciascuna vaschetta e incubare per **30 minuti** sull'agitatore.

ATTENZIONE:

- Indossare guanti e occhiali protettivi.
- Fermare lo sviluppo del colore lavando le strisce due volte in 2 ml di acqua distillata agitando il portavaschette sull'agitatore per almeno **3 minuti**.
 - 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 asciugate e sviluppate al buio.

Procedura automatizzata del test: Auto-LiPA

La procedura del test LiPA è idonea ad essere automatizzata. L'Auto-LiPA è progettato, infatti, per gestire completamente l'ibridazione, il lavaggio stringente e sviluppo del colore. L'Auto-LiPA è un sistema di walk-away con riscaldamento e raffreddamento automatici e con aspirazione e pipettaggio automatici.

Per maggiori informazioni e protocolli specifici dell'Auto-LiPA, si prega di contattare i propri distributori locali.

Risultati

Lettura

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 (nera), della banda di controllo del coniugato (conj. Control), della banda di controllo HLA-DRB1 Plus (HLA-DRB1 Control) e le 37 sonde DNA sequenza-specifiche sulla striscia INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus.

Validazione

- Includere un controllo negativo e il Controllo LiPA per INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus ogni volta che si esegue un test. Come per ogni nuova procedura di test, l'aggiunta di controlli aggiuntivi positivi e negativi deve essere presa in esame fino a raggiungere un alto grado di confidenza nella corretta esecuzione del test.

Si suggerisce di usare DNA di riferimento per assicurarsi che siano state raggiunte le condizioni idonee per l'esecuzione del test.

- La linea superiore sulla striscia INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus è la linea di identificazione (linea nera). Questa linea permette un corretto orientamento della striscia.
- La linea successiva controlla l'aggiunta delle soluzioni di lavoro del Coniugato e del Substrato durante la procedura di rilevazione. Questa linea deve essere sempre allineata con la linea di controllo del Coniugato della carta di lettura. Questa linea deve essere sempre positiva e dovrebbe avere approssimativamente la stessa intensità nelle strisce della stessa seduta.
- La linea successiva è la linea di controllo positivo HLA-DRB (controllo HLA-DRB sulla carta di lettura) che indica se si è aggiunta per l'ibridazione il quantitativo appropriato di materiale amplificato HLA-DRB1. Questa linea deve essere sempre positiva, eccetto per il controllo negativo, ma la sua intensità può variare tra i diversi campioni.
- Il risultato di ciascun controllo negativo non deve dare alcun segnale per ciascuna delle linee sulla striscia, eccetto che per la linea di controllo del Coniugato.
- Il Controllo LiPA per INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus deve mostrare il seguente pattern di sonde positive: controllo coniugato, controllo HLA-DRB, 2, 8, 23, 25, 26, 30, 33, 37. Questo controllo è composto da oligonucleotidi biotinilati, complementari alle sonde di ibridazione menzionate. L'ibridazione positiva su queste sonde dimostra così una esecuzione soddisfacente del test nei passaggi di ibridazione, lavaggio stringente, sviluppo del colore e rilevazione. Un pattern differente può indicare problemi di esecuzione quali temperatura non corretta durante l'ibridazione o deviazioni dai tempi e temperature indicate.
- 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 campione di Controllo LiPA.
- La linea di controllo del coniugato sulla striscia deve essere allineata con la linea di controllo del Coniugato sulla carta di lettura.
- Controllare la positività delle linee di controllo (prime due linee) per validare ciascuna singola striscia (vedi Validazione).
- I risultati di tipizzazione si basano sulla reattività delle sonde del kit. La lista delle specificità delle sonde e' disponibile su richiesta.
- Identificare i numeri di tutte le sonde che sono positive sulle strisce INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus e risalire al tipo di DRB1 usando la tabella di tipizzazione INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus o una versione del software d'interpretazione LiPA (LiRAS™). Il software spesso fornisce più risultati rispetto all'uso previsto del prodotto: viene fornita l'interpretazione a livello di gruppo allelico, come pure tutte le possibili combinazioni alleliche. Poiché il kit non è stato progettato per tipizzare in maniera specifica questi alleli a livello allelico, queste informazioni devono essere considerate come aggiuntive e non come decisive.

Software d'interpretazione: LiRAS™

Il software LiRAS™ è stato progettato per assistere nell'interpretazione dei risultati LiPA. Si prega di contattare il proprio fornitore locale per avere l'ultima versione aggiornata.

Limiti della procedura

- L'utilizzo di questo prodotto deve limitarsi al personale esperto nelle tecniche di ibridazione.
- Solo le buone pratiche di laboratorio e l'attenta esecuzione delle procedure specificate permetteranno una ibridazione specifica e un corretta tipizzazione del DNA target.
- L'INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus è stato progettato per permettere una risoluzione a livello di gruppo allelico (con questo si intendono, nella nomenclatura HLA standard, le prime due cifre dopo l'asterisco nel nome dell'allele, ad es. HLA-DRB1*01). Comunque, combinazioni di alcuni alleli possono portare ad una combinazione di sonde non unica e quindi fornire una risposta ambigua per due o più combinazioni

alleliche possibili. La conoscenza delle frequenze alleliche della popolazione in studio indicherà il tipo DRB1 più probabile. Nel caso sia richiesta una tipizzazione in alta risoluzione, utilizzare il kit decoder INNO-LiPA HLA-DRB.

- I nuovi alleli possono avere polimorfismi al di fuori delle regioni delle sonde, e di questo si deve tenere conto quando si interpretano i risultati.
- La sequenza a livello del sito di legame del primer non è conosciuta per tutti gli alleli. Il rischio di mismatch a livello del sito di legame del primer è da considerarsi molto basso, tanto che un fallimento del primer non è mai stato osservato e sono stati testati più di 80 alleli appartenenti a tutti i gruppi. Tuttavia, nel caso di un risultato omozigote, deve essere presa in considerazione la possibilità di una perdita allelica.

Performance del Test

Esecuzione del test usando DNA ottenuto con soluzione primer DRB1 in combinazione con protocollo PCR II (DRB1; DRB1*3+4+5; 86G; 86V; DQB1)

L'INNO-LiPA HLA-DRB1 è stato valutato su campioni di tipizzazione di routine in tre laboratori di tipizzazione tissutale europei e due laboratori Nord Americani.

Nello studio sono stati testati con INNO-LiPA HLA-DRB1 un totale di 243 campioni. I risultati sono stati comparati con tecniche di tipizzazione classiche standardizzate (test su DNA (INNO-LiPA DRB *key/decoder*, SSP) e/o sierologia). Non sono stati osservati fallimenti di amplificazione di INNO-LiPA HLA-DRB1 durante lo studio.

Reattività delle sonde

Sono state osservate in totale 74 bande false positive con INNO-LiPA HLA-DRB1. Nessuna banda falsa negativa è stata rilevata durante lo studio. Consultare le linee guida per informazioni specifiche sulla reattività delle sonde. È disponibile una lista completa delle specificità delle sonde e dei primers. Tutte le sonde sono state progettate per ibridare in maniera specifica con la loro sequenza complementare a livello di un mismatch, a meno che non riportato diversamente nella lista. Per scopi di accreditamento è disponibile su richiesta un report sul controllo di qualità delle reattività.

Range di applicazione

Il limite basso del range di applicazione è stato determinato utilizzando una serie di diluizione di DNA. Una quantità di 0.05 µg di DNA estratto ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.5$) può essere usata nel test di amplificazione relativo, producendo DNA in quantità più che sufficiente per essere rilevato con il test LiPA.

Risoluzione

(Tabella di tipizzazione usata: K-1067/v.5.x/1998-02-20)

Le strisce INNO-LiPA HLA-DRB1, con 37 sonde immobilizzate in linee parallele, consentono la tipizzazione a livello del gruppo allelico DRB1. La risoluzione teorica a livello generico (da DRB1*01 - a DRB1*16) è calcolata essere 89.3%. Durante lo studio la risoluzione complessiva a livello di gruppo-allelico raggiunta è stata del 86.8% (211/243). Sono stati descritti un totale di 32 risultati ambigui. Questi derivano da sette combinazioni di sonde e sono stati riportati con le seguenti combinazioni alleliche:

DRB1*03 x *11/*13 (8 campioni)
 DRB1*04 x *11/*13 (3 campioni)
 DRB1*01 x *13/*14 (3 campioni)
 DRB1*04 x *13/*14 (6 campioni)
 e DRB1*03 x *13/*15 (12 campioni)

Un antigene è risultato ambiguo per **DRB1*11/*13** in 11/83 (13.3%) campioni in cui era presente o DRB1*11 o DRB1*13. Questi alleli responsabili di ambiguità sono stati riportati

dal software LiPA-Expert come:- DRB1*0308 x *1324 (due campioni), DRB1*0415 x *1322/*1323 (tre campioni) and DRB1*0308 x *1305/*1307/*1311/*1314c75L/*1314c75V (sei campioni).

In presenza di DRB1*03, quando DRB1*13 viene dato come gruppo allelico alternativo a DRB1*11, lo specifico allele DRB1*03 è, in ogni caso, DRB1*0308. Questo allele è stato descritto avere una sequenza molto simile alla sequenza di DRB1*03011 ad eccezione del codone 58 dove la similitudine è con il gruppo allelico DRB1*11. Inoltre, sia l'allele DRB1*0308 che gli alleli specifici DRB1*13 (DRB1*1305, *1307, *1311, *1314 and *1324), con cui è stato riportato in maniera ambigua, hanno una frequenza attesa bassa.

In presenza di DRB1*04, uno dei due rari alleli di DRB1*13 (*1322, *1323) viene dato come possibile allele alternativo al gruppo allelico DRB1*11 e il solo allele DRB1*04 con cui essi sono stati riportati è il DRB1*0415. C'è una similarità di sequenza, documentata, tra gli alleli specifici DRB1*13 coinvolti e il gruppo allelico DRB1*11. Le frequenze attese degli alleli DRB1*13 che causano ambiguità e dell'allele DRB1*0415 sono anch'esse basse.

Un antigene è risultato ambiguo per **DRB1*13/*14** in 9/66 (13.6%) campioni quando era presente o DRB1*13 o DRB1*14. Questi alleli responsabili di ambiguità sono stati riportati dal software LiPA-Expert come:- DRB1*0103 x *1417/*1430 (tre campioni), DRB1*0402/*0414c13H x *1421 (cinque campioni) and DRB1*0402/ *0414 x *1417/*1430 (un campione).

In presenza di DRB1*04, gli alleli rari e recentemente descritti di DRB1*14 (*1417, *1421 and *1430) vengono dati come alternativi al gruppo allelico DRB1*13. Le specifiche alternative DRB1*14 (*1417 e *1430 - vedi sopra) agli alleli DRB1*13 in presenza di DRB1*01 sono entrambe attese raramente.

Un antigene è risultato ambiguo per **DRB1*13/*15** in 12/97 (12.4%) campioni quando era presente o DRB1*13 o DRB1*15. Questi alleli responsabili di ambiguità sono stati riportati dal software LiPA-Expert come DRB1*0304 x *1309 (tutti i dodici campioni).

L'allele DRB1*1309 in alternativa a DRB1*15 in presenza di DRB1*03 è un allele raro di origine Ispanica. L'allele DRB1*0304 riportato con esso è anche raro essendo stato rilevato all'inizio in tre Caucasicci non imparentati.

Questo allele ha similarità di sequenza con DRB1*0301, che era stato dato come prima alternativa.

Riproducibilità

Tipizzazioni ripetute, con diversi lotti di INNO-LiPA HLA-DRB1, usando DNA derivato dai campioni clinici durante lo studio, hanno fornito risultati sempre riproducibili nelle reattività delle sonde.

Accuratezza

Nella validazione esterna INNO-LiPA HLA-DRB1 ha mostrato una completa concordanza con i metodi di riferimento.

Riassunto del numero dei campioni

243	Numero totale di tentativi di amplificazione (nessun fallimento)
211	Numero totale di risultati non-ambigui a livello di gruppo allelico (32 ambiguità)
203/243	Numero totale di campioni comparati con INNO-LiPA DRB key (usato per misurare la concordanza)
40/243	Numero di campioni testati tramite PCR-SSP (anche usata per misurare la concordanza).

Esecuzione del test usando DNA ottenuto con soluzione primer DRB1 in combinazione con protocollo PCR I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

Allo scopo di valutare l'equivalenza tra dei protocolli PCR I e II, sono stati testati in sede quarantadue campioni utilizzando entrambi i metodi. I prodotti PCR di entrambi i protocolli hanno dato risultati di tipizzazione identici per tutti i campioni.

Esecuzione dei test usando DNA ottenuto con soluzione primer DRB1*03,11,13,14 in combinazione con protocollo PCR I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

L'esecuzione del test della soluzione primer DRB1*03,11,13,14 di INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus è stata valutata in sede e presso due laboratori di tipizzazione dei tessuti belgi. Sono stati analizzati un totale di 89 campioni anonimi (50 campioni esternamente; 39 in sede). Tutti i campioni sono stati preventivamente tipizzati con INNO-LiPA HLA-DRB1. I campioni includevano 14 campioni ambigui (sei diverse ambiguità) e 75 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 è stata del 100% (89/89; 95% CI [95,9%; 100%]).

Precisione diagnostica

I calcoli di precisione diagnostica sono stati eseguiti esclusivamente su campioni 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-DRB1 è stato ottenuto per i restanti 87 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-DRB1 (Innogenetics) o con un test di tipizzazione alternativo (Olerup SSP (GenoVision) oppure Allset⁺ DR Low Resolution (Dynal)).

I risultati di tipizzazione di tutti gli 87 campioni sono risultati concordi al test di riferimento, producendo una precisione diagnostica del 100% (87/87; 95% CI [95.9%; 100%]).

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™.

Risoluzione

(tabella di tipizzazione v5.8/021112)

La soluzione primer DRB1, usata in combinazione con la strip INNO-LiPA HLA-DRB1, è inteso per la tipizzazione di allele HLA-DRB1 a livello del gruppo di allele.

La soluzione DRB1*03,11,13,14, usata in combinazione con la strip INNO-LiPA HLA-DRB1, viene usata per risolvere le ambiguità più frequenti, cioè le ambiguità che coinvolgono DRB1*03, 11, 13 e/o 14 allele.

Tutte le ambiguità, a livello del gruppo di allele, osservate dopo aver i test con la soluzione primer DRB1, sono state ridotte a un risultato di tipizzazione non ambiguo utilizzando la

solución primer DRB1*03,11,13,14: DRB1*01, DRB1*13 o DRB1*01, DRB1*14 (3 casi); DRB1*04, DRB1*13 o DRB1*04, DRB1*14 (6 casi); DRB1*08, DRB1*11 o DRB1*11, DRB1*13 (1 caso); DRB1*11, DRB1*12 o DRB1*12, DRB1*13 (2 casi).

Per tutti i risultati ambigui, il software d'interpretazione LiRAS™ ha consigliato un'amplificazione DRB1*03,11,13,14 seguita da ibridazione con la strip INNO-LiPA HLA-DRB1.

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-DRB1 Plus es un ensayo de sondas en tira, para uso *in vitro*, diseñado para determinar el tipaje molecular de los alelos DRB1 del antígeno leucocitario humano (HLA) a nivel de grupo de alelos (de DRB1*01 a DRB1*16).

Principio del ensayo

Los ensayos INNO-LiPA HLA de tipaje se basan en el principio de hibridación reversa. Se desnaturaliza químicamente ADN biotinilado amplificado 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-DRB1 Plus está disponible un kit de amplificación (INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus) para la preparación estandarizada de material amplificado biotinilado. Este kit de amplificación se basa en la reacción en cadena de polimerasa (PCR*, polymerase chain reaction).

Los productos de amplificación se hibridan sucesivamente con 1 tira de determinación de tipo en la que se fijan 37 sondas de ADN específicas de la secuencia y 2 sondas 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-DRB1 Plus

- Paso 1 Amplificación del exón 2 de los alelos HLA-DRB1.
- Paso 2 Hibridación y lavado astringente con 37 sondas inmovilizadas en una tira de INNO-LiPA HLA-DRB1 (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-DRB1 Plus, se recomienda empezar con (a) y seguir con (b) si se producen ambigüedades relacionadas con los alelos DRB1*03,11, 13 ó 14, y otros alelos DRB1. Así lo recomendará el software de interpretación LiRAS™.

- (a) la amplificación del exón 2 de los alelos HLA-DRB1*03,11,13,14 con la solución del cebador HLA-DRB1 antes de analizar con la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus.
- (b) la amplificación específica del grupo del exón 2 de los alelos HLA-DRB1*03,11,13,14 con la solución del cebador HLA-DRB1*03,11,13,14 antes de analizar con la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus. La solución del cebador HLA-DRB1*03,11,13,14 suministrada amplifica el exón 2 de los alelos HLA-DRB1*03,11,13,14. No se amplificará el exón 2 de otros alelos DRB1, a excepción del alelo DRB1*0820.

INNO-LiPA HLA-DRB1 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-DRB1*01).

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 x 20	58191	Contiene 20 tiras para INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus marcadas con una banda de marca de color negro.
Control LiPA	1 x 0.05 ml	58192	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	1 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	1 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 80 ml	56951	Tampón fosfato con NaCl, Triton®, estabilizadores de proteínas y MIT al 0.01%/CAA al 0.1% como conservante.
Conjugado 100x	1 x 0.8 ml	56952	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</i> -LiPA, 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 180 ml	56953	Tampón Tris con NaCl, MgCl ₂ y MIT al 0.01%/CAA al 0.1% como conservante.
Sustrato BCIP/NBT 100x	1 x 0.8 ml	56954	Sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato (BCIP) y 4-nitroazol 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</i> -LiPA, 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	1 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</i> -LiPA, prepare 10 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	3	-	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 $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$).

- 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
- a 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 biotinilado amplificado, está disponible un kit de amplificación, INNO-LiPA DRB1 Amp 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, cubrirlas 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 $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 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 alícuotas.
- 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 DRB1 amplificado (use 10 μ l). Para la preparación de la muestra: consulte las instrucciones de uso de INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus.
2. Muestra de control LiPA para INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (use 10 μ l; **la amplificación no es necesaria**).
3. Muestra de control blanco amplificada (control negativo; use 10 μ l).

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 deben superar las temperaturas indicadas. 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 las pinzas para retirar el número requerido de tiras de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus del tubo (una tira por cada muestra de ensayo). Incluya una tira para la muestra de control LiPA de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus y para la muestra de control blanco amplificada. Escriba con lápiz un número de identificación por encima de la banda de marca negra de la tira.
3. Coloque en la bandeja el número requerido de cubetas de ensayo (una cubeta por cada muestra de ensayo).
4. Pipetee 10 μ l 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 μ l (consulte las instrucciones de uso de INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp 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 con el lado marcado de la membrana hacia arriba. 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 $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (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 precalentada a cada cubeta y lave la bandeja balanceándola durante 10 a 20 segundos, a una temperatura de 20 - 25°C . Aspire la solución de cada cubeta. Repita una vez este breve paso de lavado.
3. Por último, aspire la solución e incube cada tira en 2 ml de solución de lavado astringente precalentada en el baño de agua de agitación a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante **10 minutos**. Cierre la cubierta del baño de agua.

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 dos veces cada tira durante **1 minuto** con 2 ml de la solución de lavado de trabajo.
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 diluida 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.

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

Resultados

Lectura

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 (de color negro), la banda de control de conjugado (control de conjugado), la banda de control de HLA-DRB1 Plus (control de conjugado) y las 37 bandas de sonda de ADN específicas de la secuencia en la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus.

Validación

- Incluya un control negativo y el control LiPA para INNO-LiPA HLA-DRB1 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.
- La banda superior en la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus es la banda de marca (banda de color negro). Esta banda permite orientar correctamente la tira.

- La siguiente banda controla la adición de solución de conjugado y de solución de sustrato reactivas durante el procedimiento de detección. Esta banda debe estar alineada con la banda de control de conjugado de la tarjeta de lectura de plástico. Debe ser siempre positiva y tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira de un mismo ensayo.
- La siguiente banda es la banda de control positivo de HLA-DRB (control HLA-DRB de la tarjeta de lectura) que indica si se añadió una cantidad adecuada de material amplificado de HLA-DRB1 para la hibridación. Esta banda debe ser siempre positiva, excepto para el control negativo, 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 banda de control de conjugado.
- La muestra de control LiPA para INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus debe producir el siguiente patrón de sondas positivas: control de conjugado, control HLA-DRB, 2, 8, 23, 25, 26, 30, 33, 37. Esta muestra de control se compone de oligonucleótidos biotinilados complementarios de 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 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 bajo petición.
- Identifique todos los números de sonda positivos en la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus y utilice la tabla de tipos de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus o una versión del software de interpretación de LiPA (LiRAS™) para deducir el tipo de DRB1. 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™ 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 una hibridación específica y el tipaje correcto de la muestra que se está analizando.
- INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus se ha diseñado para proporcionar la resolución a nivel de grupo de alelos de HLA-DRB1 (se indica mediante los dos primeros dígitos después del asterisco en el nombre del alelo según la nomenclatura estándar de HLA, por ejemplo, HLA-DRB1*01). No obstante, las combinaciones de determinados

alelos pueden dar como resultado combinaciones de sondas no únicas y, por lo tanto, una respuesta ambigua de dos o más combinaciones posibles de alelos. El conocimiento de las frecuencias de alelos de la población estudiada indicará el tipo de DRB1 más probable. Si es necesaria una determinación de tipo de mayor resolución, utilice el kit INNO-LiPA HLA-DRB Decoder.

- Al interpretar los resultados debe tenerse en cuenta la posibilidad de polimorfismos de los nuevos alelos fuera de las regiones de sonda.
- No se conoce la secuencia del sitio de unión del cebador para todos los alelos. Se considera que el riesgo de emparejamiento incorrecto del cebador es muy bajo, ya que nunca se ha observado un fallo del cebador en este sentido y se han realizado ensayos con más de 80 alelos de todos los grupos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la posibilidad de que se produzca fallo alélico (fallo en la amplificación de algún alelo) en caso de obtener un resultado homocigótico.

Eficacia del ensayo

Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de cebador DRB1 en combinación con el protocolo II de PCR (DRB1; DRB1+3+4+5; 86G; 86V; DQB1)

El equipo INNO-LiPA HLA-DRB1 ha sido evaluado en tres centros europeos de tipaje de tejidos y en dos de Norte América con muestras de rutina.

En el estudio se ensayaron un total de 243 muestras con el equipo INNOLiPA HLA-DRB1. Los resultados se compararon con técnicas de tipaje clásicas y establecidas (basadas en ensayos de DNA (INNO-LiPA DRB *key/decoder*, SSP) y/o serología). No hubo problemas de amplificación con el equipo INNO-LiPAHLA-DRB1 durante el estudio.

Reactividad de las sondas

Durante el estudio se registraron 74 reacciones de falsos positivos utilizando el equipo INNO-LiPA DRB1. No se observaron reacciones de falsos negativos. Consultar las instrucciones de uso para información específica sobre la reactividad de las sondas. Esta disponible un listado de sondas y de especificidades de los primers.

Todas las sondas están diseñadas para hibridar específicamente con su secuencia complementaria a nivel de un error (mismatch) si no está especificado de otra manera en la lista.

Está también disponible un control de calidad de la reactividad de las distintas sondas para propósitos de acreditación.

Rango de aplicación

El límite inferior del rango de aplicación se determinó utilizando diluciones seriadas de DNA. 0,05 mg de DNA ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1,5$) fueron suficientes para realizar la reacción de amplificación, produciendo una cantidad de producto amplificado suficiente para ser analizado en el LiPA.

Resolución

(Tabla de tipaje utilizada: K-1067/v.5.x/1998-02-20)

Las tiras INNO-LiPA HLA-DRB1, con 37 sondas inmovilizadas, permiten un tipaje DRB1 a nivel de grupo de alelos. Está calculado que la resolución teórica a amplio nivel es del 89,3%.

Durante el estudio, la resolución global alcanzada a nivel de grupo de alelos fue del 86,8% (211/243). Fueron descritos un total de 32 resultados ambiguos. Estos surgieron de cuatro combinaciones de sondas y se registraron con las siguientes combinaciones de alelos:

- DRB1*03 x *11/*13 (8 muestras)
- DRB1*04 x *11/*13 (3 muestra)
- DRB1*01 x *13/*14 (3 muestras)
- DRB1*03 x *13/*15 (12 muestras)

Un antígeno fue ambiguo para **DRB1*11/*13** en 11/83 (13,3%) de las muestras en las que cualquiera de los dos alelos estaba presente. Estas ambigüedades fueron identificadas con el software *LiPA-Expert* como DRB1*0308 x *1324 (dos muestras), DRB1*0415 x *1322/*1323 (tres muestras) y DRB1*0308 x *1305/*1307/*1311/*1314c75L/*1314c75V (seis muestras).

En presencia de DRB1*03, donde DRB1*13 es dado como grupo de alelos alternativo a DRB1*11, el alelo específico DRB1*03 es, en cada caso, DRB1*0308. Se ha descrito que este alelo tiene una secuencia muy similar al alelo DRB1*03011 excepto en el codón 58 donde la secuencia es similar a la de los alelos del grupo DRB1*11. Además, tanto el alelo DRB1*0308 como los alelos específicos DRB1*13 (DRB1*1305, DRB1*1307, DRB1*1311, DRB1*1314 y DRB1*1324), con los cuales fue ambigüamente relacionado, también tienen una frecuencia esperada baja.

En presencia del alelo DRB1*04, cualquiera de los dos alelos raros DRB1*13 (*1322, *1323) se da como alternativa al grupo de alelos DRB1*11 y el único alelo DRB1*04 con el que fueron relacionados fue DRB1*0415. Hay secuencias documentadas de la similitud entre los alelos específicos DRB1*13 implicados y el grupo de alelos DRB1*11. La frecuencia de alelos DRB1*13 causantes de ambigüedades y la frecuencia del alelo DRB1*0415 también se espera que sean bajas.

Un antígeno fue ambiguo para **DRB1*13/*14** en 9/66 (4,4%) de las muestras donde uno de los dos alelos DRB1*13 o DRB1*14 estaba presente. Esta ambigüedad fue identificada por el software *LiPA-Expert* como DRB1*0103 x *1417/*1430 (tres muestras), DRB1*0402/*0414c13H x *1421 (cinco muestras) y DRB1*0402/*0414 x *1417/*1430 (una muestra).

En presencia del alelo DRB1*04, los alelos DRB1*14 (*1417, *1421 y *1430), raros y recientemente descritos, se dan como alternativa al tipaje de grupo de alelos DRB1*13. Las alternativas específicas del alelo DRB1*14 (*1417 y *1430 -ver abajo-) al grupo de alelos DRB1*13 en presencia del alelo DRB1*01 también se espera que sean bajas.

Un antígeno fue ambiguo para **DRB1*13/*15** en 12/97 (12,4%) de las muestras donde uno de los dos alelos DRB1*13 o DRB1*15 estaba presente. Esta ambigüedad fue identificada por el software *LiPA-Expert* como DRB1*0304 x *1309 (las doce muestras).

La alternativa DRB1*1309 a DRB1*15 en presencia del alelo DRB1*03 es un alelo raro de origen hispánico. El alelo DRB1*0304 relacionado es también extraño y fue detectado por primera vez en tres caucásicos no relacionados. Este alelo tiene una secuencia con similitudes a DRB1*0301, el cual fue dado como primera alternativa.

Reproducibilidad

Tipajes realizados utilizando distintos lotes del equipo INNO-LiPA HLA-DRB1 y las mismas muestras clínicas de DNA obtenidas durante el estudio dieron en cada caso resultados reproducibles en la reactividad de las sondas.

Precisión

Durante la evaluación externa el equipo INNO-LiPA HLA-DRB1 mostró una concordancia completa con los métodos de referencia.

Resumen del número de muestras

243	Número total de reacciones de amplificación intentadas (ningún fallo)
211	Número total de resultados no ambiguos a nivel de tipaje de grupo de alelos (32 ambigüedades)
203/243	Número de muestras comparadas con el INNO-LiPA DRB key (utilizado para medir la concordancia)
40/243	Número de muestras analizadas por PCR-SSP (también usado para medir la concordancia)

Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de cebador DRB1 en combinación con el protocolo I de PCR (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

Con el fin de evaluar la equivalencia entre los protocolos de PCR I y II, se probaron internamente 42 muestras utilizando ambos métodos. Los productos de PCR de ambos protocolos produjeron resultados de identificación de tipo idénticos para todas las muestras.

Eficacia del ensayo utilizando ADN obtenido con la solución de cebador DRB1*03,11,13,14 en combinación con el protocolo I de PCR (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

La eficacia de la solución de cebador DRB1*03,11,13,14 de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus se evaluó internamente y en dos laboratorios belgas de identificación de tipos de tejido. Se analizaron un total de 89 muestras anónimas (50 muestras externamente y 39 internamente). Previamente se había identificado el tipo de todas las muestras con INNO-LiPA HLA-DRB1. 14 de las muestras produjeron resultados ambiguos (seis ambigüedades distintas) y 75 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 del ensayo en esta evaluación fue del 100% (89/89; 95% CI [95.9%; 100%]).

Precisión de diagnóstico

Únicamente se llevaron a cabo cálculos de precisión de diagnóstico en las pruebas en las que se produjo un único resultado de referencia. Como consecuencia, dos de las muestras quedaron excluidas de este cálculo.

En las 87 muestras restantes se obtuvo un único resultado de identificación del tipo HLA-DRB1.

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-DRB1 (Innogenetics) o un ensayo alternativo de identificación del tipo (Olerup SSP (GenoVision) o Allset+ DR Low Resolution (Dynal)).

Los resultados de identificación del tipo de todas las muestras (87) concordaron con el ensayo de referencia, por lo que la precisión de diagnóstico fue del 100% (87/87; 95% CI [95,9%; 100%]).

Reactividades de las sondas

En una o varias ocasiones durante este estudio, algunas de las sondas produjeron 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™.

Resolução

(tabela de tipos v5.8/021112)

La solución de cebador DRB1, utilizada en combinación con la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1, se ha diseñado para identificar el tipo de los alelos HLA-DRB1 en el nivel de grupo de alelos.

La solución de cebador DRB1*03,11,13,14, utilizada en combinación con la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1, se ha diseñado para resolver las ambigüedades más frecuentes (las referentes a los alelos DRB1*03, 11, 13 y/o 14).

Todas las ambigüedades observadas en el nivel de grupo de alelos tras realizar pruebas con la solución de cebador DRB1 se redujeron a un resultado no ambiguo de identificación del tipo con la solución de cebador DRB1*03,11,13,14: DRB1*01, DRB1*13 o DRB1*01, DRB1*14 (3 casos); DRB1*04, DRB1*13 o DRB1*04, DRB1*14 (6 casos); DRB1*08, DRB1*11 o DRB1*11, DRB1*13 (1 caso); DRB1*11, DRB1*12 o DRB1*12, DRB1*13 (2 casos).

Para resolver todos los resultados ambiguos, el software de interpretación LiRAS™ sugirió utilizar la amplificación DRB1*03,11,13,14 seguida de una hibridación con la tira de INNO-LiPA HLA-DRB1.

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-DRB1 Plus é um ensaio de sondas em linha (LiPA), para uso *in vitro*, desenvolvido para a tipagem molecular de alelos DRB1 do antígeno leucocitário humano (HLA), ao nível do grupo de alelos (DRB1*01 a DRB1*16).

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.

Assim como o kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus, há também à sua disposição um kit de amplificação (INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp 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 1 tira de tipagem que contém 37 sondas ADN específicas da sequência e 2 sondas de controlo (fig. 1).

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

INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus: as etapas envolvidas

- 1ª etapa Amplificação do exão 2 dos alelos HLA-DRB1.
- 2ª etapa Hibridização e lavagem rigorosa com 37 sondas imobilizadas numa tira INNO-LiPA HLA-DRB1 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-DRB1 Plus ocorrerem ambiguidades envolvendo alelos DRB1*03,11,13 ou 14 com outros alelos DRB1 aconselhamos que comece por (a) e que prossiga com (b). Isto ser-lhe-á aconselhado pelo software de interpretação LiRAS™.

- (a) a amplificação do exão 2 dos alelos HLA-DRB1*03,11,13,14 com solução de iniciadores HLA-DRB1 anterior à análise com a tira do INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus.
- (b) a amplificação específica de grupo do exão 2 dos alelos HLA-DRB1*03,11,13,14 com solução de iniciadores HLA-DRB1*03,11,13,14 anterior à análise com a tira do INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus. A solução de iniciadores HLA-DRB1*03,11,13,14 fornecida amplifica o exão 2 dos alelos HLA-DRB1*03,11,13,14. O exão 2 ou outros alelos DRB1 não serão amplificados, à excepção do alelo DRB1*0820.

O INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus foi desenvolvido para dar a melhor resolução possível usando o formato de ensaio da 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-DRB1*01).

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 encaracolarem antes do uso.

Reagentes fornecidos:

Componente	Quantidade	Ref.	Descrição
Tiras	1 x 20	58191	Contém 20 tiras para INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus assinaladas com uma linha preta de marcação.
Controlo LiPA	1 x 0.05 ml	58192	Contém ácido etilenodiaminotetracético (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	1 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	1 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 80 ml	56951	Tampão fosfato contendo NaCl, Triton®, estabilizadores proteicos e 0.01% MIT/ 0.1% CAA como conservante.
Conjugado 100x	1 x 0.8 ml	56952	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 à temperatura ambiente (de 20 - 25°C).
Tampão de substrato	1 x 180 ml	56953	Tampão tris contendo NaCl, MgCl ₂ e 0.01% MIT/0.1% CAA como conservante.
Substrato BCIP/NBT 100x	1 x 0.8 ml	56954	Sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina (BCIP) e 4-nitro azul 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

Solução de lavagem 5x	1 x 80 ml	56721	<p>for armazenada no escuro à temperatura ambiente (de 20 - 25°C).</p> <p>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.</p> <p>Prepare 8 ml de solução de lavagem de trabalho para cada cavidade teste + 10 ml em excesso. Para <i>Auto-LiPA</i>, prepare mais 10 ml. Armazenada a uma temperatura de 2 - 8°C a solução lavagem de trabalho permanece estável por 2 semanas.</p>
Suporte de teste	3	-	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.
- Termómetro 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 (± 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. **Contem 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 LiPA utilizar como amostra material, ADN biotinilado amplificado, está disponível um kit de amplificação, INNO-LiPA DRB1 Amp Plus, que serve de instrumento 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 $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 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 e os 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 submergida. 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 alíquotada.
- 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 DRB1 amplificado (utilize 10 µl). Para a preparação da amostra: veja as instruções de utilização para INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus.
2. Amostra de controlo LiPA para INNO-LiPA HLA-DRB1 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 ultrapasse as temperaturas indicadas. 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 do tubo o número de tiras INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus necessário (uma tira por cada teste de amostra). Inclua a tira para a amostra de controlo LiPA do INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus e para a amostra amplificada de controlo em branco. Com um lápis escreva um número de identificação acima da linha preta de marcação da tira.
3. Coloque num suporte o número de cavidades de teste requerido (uma cavidade por cada teste de amostra).
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 as instruções de utilização de INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp 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 a tira de teste, com o lado assinalado da membrana virado para cima, na cavidade. As tiras devem estar totalmente submersas na solução.

NOTA:

- Use luvas descartáveis e pinças.
8. Coloque o suporte no banho agitador com água a $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (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 lave oscilando o suporte durante (10 - 20 segundos) a uma temperatura de 20 - 25°C. Aspire a solução de todas as cavidades. Repita esta etapa de lavagem mais uma vez.
 3. Por último, aspire a solução e incube cada tira em 2 ml de solução de lavagem rigorosa pré-aquecida num banho de água de agitação a uma temperatura de $56^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante **10 minutos**. Feche a tampa do banho de água.
- 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 homogênea.

1. Lave cada tira duas vezes durante **1 minuto** com 2 ml de solução de lavagem.
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 diluída 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 pipetagem automatizados.

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

Resultados

Leitura

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 (preto), da linha de controlo do conjugado (Controlo conj.), da linha de controlo HLA-DRB1 (controlo HLA-DRB.) e das 37 sondas de ADN específicas da sequência nas tiras INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus strip.

Validação

- Inclua um controlo negativo e um controlo LiPA para o INNO-LiPA HLA-DRB1 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.
- A linha superior da tira de INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus é a linha de marcação (linha preta). Esta linha permite orientar correctamente a tira.
- 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 plástico para leitura. Esta linha deve ser sempre positiva e ter aproximadamente a mesma intensidade em todas as tiras utilizadas durante o mesmo teste.
- A linha seguinte é a linha de controlo positivo do HLA-DRB1 (controlo HLA-DRB no cartão de leitura) que indica se foi ou não adicionado uma quantidade adequada de material amplificado HLA-DRB1 à hibridização. Esta linha deve ser sempre positiva, à excepção do controlo negativo, 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 linha de controlo do conjugado.
- A amostra de controlo LiPA para o INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus deve apresentar os seguintes padrões de sondas positivas: controlo conjugado, controlo HLA-DRB, 2, 8, 23, 25, 26, 30, 33, 37. 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.

- 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. A pedido encontra-se disponível uma lista de especificidades da sonda.
- Identifique todos os números das sondas que estão positivos na tira INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus e deduza o tipo de DRB1 usando a tabela de tipagem INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus ou a versão de software de interpretação LiPA (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™ 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.
- O INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus foi desenvolvido para apresentar resultados ao nível do grupo de alelos HLA-DRB1 (isto significa que os primeiros dois dígitos depois do asterisco no nome do alelo correspondem à nomenclatura HLA estandardizada, por exemplo HLA-DRB*01). No entanto, combinações de determinados alelos podem resultar numa combinação de sonda não-única e portanto apresentar um resultado ambíguo para duas ou mais possíveis combinações alélicas. O conhecimento de todas as frequências de alelos na população, que é objecto de estudo, indicará o tipo mais provável de DRB1. Se necessitar de uma tipagem de resolução mais elevada, utilize o kit descodificador INNO-LiPA HLA-DRB.
- Alelos novos podem ter polimorfismos fora das regiões de sonda, o que se deve ter em conta ao efectuar a interpretação dos resultados.
- A sequência no local ligador do iniciador não é conhecida para todos os alelos. O risco da não-ligação no locais do iniciador é considerado muito baixo, já que a falha de iniciador nunca foi observada e terem sido testado mais de 80 alelos, abrangendo todos os grupos. No entanto, a possibilidade de uma falha alélica deve ser tida em consideração no caso de se obter um resultado homogéneo.

Desempenho do teste

Desempenho do teste usando ADN obtido com a solução de iniciador DRB1 em combinação com PCR protocolo II (DRB1; DRB1+3+4+5; 86G; 86V; DQB1)

O kit INNO-LiPA HLA-DRB1 foi avaliado em laboratórios de três centros Europeus de tipagem de tecidos e dois Norte-Americanos com amostras de rotina.

No estudo testou-se um total de 243 amostras com o INNO-LiPA HLA-DRB1.

Os resultados foram comparados com técnicas de tipagem clássicas estabelecidas (ensaios baseadas em ADN (INNO-LiPA DRB *key/decoder*, SSP) e/ou serologia).

Durante o estudo, não houve problemas de amplificação com INNO-LiPA HLA-DRB1.

Reactividade das sondas

No total, foram observadas 74 bandas falso-positivas com INNO-LiPA HLA-DRB1.

Não foram referidas bandas falso-negativas durante o estudo. Consultar as directivas para informação específica sobre reactividade das sondas.

Está disponível uma lista completa de especificidades das sondas e dos primers.

Todas as sondas estão concebidas para hibridizar especificamente, com a sua sequência complementar, a nível de um erro (mismatch), se não estiver especificado

na lista de modo diferente. Está também disponível, a pedido, um controlo de qualidade das reactividades, para fins de acreditação.

Intervalo da Aplicação

O limite inferior da intervalo da aplicação foi determinado usando diluições em série de ADN. Apenas 0.05 µg de ADN extraído ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.5$) podem ser usados no acompanhamento do ensaio de amplificação, produzindo ADN mais que suficiente para detecção no LiPA.

Resolução

(Tabela de tipagem utilizada: K-1067/v.5.x/1998-02-20)

As tiras INNO-LiPA HLA-DRB1, com 37 sondas de ADN imobilizadas em linhas paralelas, permitem uma tipagem DRB1 a nível de grupo de alelos. A resolução teórica, a amplo nível (DRB1*01 a DRB1*16) é calculada como de 89.3%. Durante o estudo, a resolução global alcançada a nível de grupo de alelos foi de 86.8% (211/243). Foi descrito um total de 32 resultados ambíguos. Estes surgiram de sete combinações de sondas e foram registados com as seguintes combinações de alelos:

DRB1*03 x *11/*13 (8 amostras)
DRB1*04 x *11/*13 (3 amostras)
DRB1*01 x *13/*14 (3 amostras)
DRB1*04 x *13/*14 (6 amostras) e
DRB1*03 x *13/*15 (12 amostras)

Um antigénio foi ambíguo para **DRB1*11/*13** em 11/83 (13.3%) das amostras, nas quais quer DRB1*11 ou DRB1*13 estavam presentes.

Estas ambiguidades foram identificadas com o software LiPA-Expert como:- DRB1*0308 x *1324 (duas amostras), DRB1*0415 x *1322/*1323 (três amostras) e DRB1*0308 x *1305/*1307/*1311/*1314c75L/*1314c75V (seis amostras).

Na presença de DRB1*03, em que DRB1*13 é dado como grupo de alelos alternativo a DRB1*11, o alelo específico DRB1*03 é, em cada caso, DRB1*0308. Descreveu-se que este alelo tem uma sequência muito semelhante ao alelo DRB1*03011 excepto no códon 58 onde a sequência é semelhante à dos alelos do grupo DRB1*11. Além disso, tanto o alelo DRB1*0308 como os alelos específicos DRB1*13 (DRB1*1305, *1307, *1311, *1314 e *1324), com os quais foi ambigualmente relacionado, também têm uma frequência esperada baixa.

Em presença do alelo DRB1*04, qualquer dos dois alelos raros DRB1*13 (*1322, *1323) é dado como alternativa ao grupo de alelos DRB1*11 e o único alelo DRB1*04 com que foram relacionados foi DRB1*0415. Há sequências documentadas da semelhança entre os alelos específicos DRB1*13 envolvidos e o grupo de alelos DRB1*11. A frequência dos alelos DRB1*13 causadores de ambiguidades e a frequência do alelo DRB1*0415 também se espera que sejam baixas.

Um antigénio foi ambíguo para **DRB1*13/*14** em 9/66 (13.6%) das amostras onde estavam presentes quer o alelo DRB1*13 como o DRB1*14. Esta ambiguidade foi identificada pelo software LiPA-Expert como:- DRB1*0103 x *1417/*1430 (três amostras), DRB1*0402/*0414c13H x *1421 (cinco amostras) e DRB1*0402/ *0414 x *1417/*1430 (uma amostra).

Em presença do alelo DRB1*04, Os alelos DRB1*14 (*1417, *1421 e *1430), raros e recentemente descritos, são dados como alternativa à tipagem do grupo de alelos DRB1*13. As alternativas específicas do alelo DRB1*14 (*1417 e *1430 - ver a seguir -) ao grupo de alelos DRB1*13 em presença do alelo DRB1*01 também se espera que aconteçam raramente.

Um antígeno foi ambíguo para **DRB1*13*15** em 12/97 (12.4%) das amostras onde estavam presentes quer o alelo DRB1*13 como o DRB1*15. Esta ambiguidade foi identificada pelo software LiPA-Expert como DRB1*0304 x *1309 (todas as doze amostras).

O alelo DRB1*1309 alternativo ao DRB1*15 na presença do DRB1*03 é um alelo raro, de origem hispânica. O alelo DRB1*0304 relacionado, também é raro, tendo sido detectado pela primeira vez em três caucasianos não relacionados. Este alelo tem semelhanças de sequência com DRB1*0301, o qual foi dado como primeira alternativa.

Reprodutibilidade

Tipagens realizadas usando diferentes lotes de INNO-LiPA HLA-DRB1, e as mesmas amostras clínicas de ADN obtidas durante o estudo, deram em todos os casos resultados reproduzíveis na reactividade das sondas.

Precisão

Durante a avaliação externa, o INNO-LiPA HLA-DRB1 demonstrou uma completa concordância com os métodos de referência.

Resumo do número de amostras

43	Número total de tentativas de amplificação (nenhuma falha)
211	Número total de resultados não ambíguos, a nível de grupo de alelos (32 ambiguidades)
203/243	Número total de amostras comparadas com o INNO-LiPA DRB key (usado para medir a concordância)
40/243	Número de amostras testadas por PCR-SSP (também usadas para medir a concordância).

Desempenho do teste usando ADN obtido com a solução de iniciador DRB1 em combinação com o PCR protocolo I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

A fim de se poder avaliar a equivalência entre dos protocolos PCR I e II foram testadas internamente quarenta e duas amostras usando ambos os métodos. Os produtos PCR de ambos os protocolos apresentaram para todas as amostras resultados de tipagem idênticos.

Desempenho do teste usando ADN obtido com a solução de iniciador DRB1*03,11,13,14 em combinação com o PCR protocolo I (A; B; Bw4; C; DRB1; DRB1*03,11,13,14)

O desempenho da solução de iniciador DRB1*03,11,13,14 do INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus foi avaliado internamente e em dois laboratórios de tipagem de tecido belgas. Foi analisado um total de 89 amostras anónimas (50 amostras externamente; 39 amostras internamente). Todas as amostras foram previamente tipadas com INNO-LiPA HLA-DRB1. As amostras incluíam 14 amostras ambíguas (seis ambiguidades diferentes) e 75 amostras não ambíguas. Além disso todas as amostras ambíguas foram tipadas para 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 foi de 100% (89/89; 95% CI [95,9%; 100%]).

Precisão diagnóstica

O cálculo da precisão diagnóstica foi apenas executado para as amostras para as quais existia um resultado de referência. Consequentemente, duas amostras foram excluídas deste cálculo.

Para as 87 amostras restantes obteve-se um resultado de tipagem HLA-DRB1 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-DRB1 (Innogenetics) ou com um ensaio de tipagem alternativo (Olerup SSP (GenoVision) ou Allset⁺ DR Low Resolution (Dynal)).

Os resultados de tipagem de todas as 80 amostras foram concordantes com o ensaio de referência, o que resulta numa precisão diagnóstica de 100% (87/87; 95% CI [95,9%; 100%]).

Reactividades de sonda

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

Resolução

(tabela de tipagem v5.8/021112)

A solução de iniciador Primer Solution, utilizada em combinação com a INNO-LiPA HLA-DRB1 strip, foi desenvolvida para tipagem dos alelos HLA-DRB1 ao nível do grupo de alelos.

A solução de iniciador DRB1*03,11,13,14 utilizada em combinação com a INNO-LiPA HLA-DRB1 strip, foi desenvolvida para resolver as ambiguidades mais frequentes, ou seja ambiguidades envolvendo os alelos DRB1*03, 11, 13, e/ou 14.

Todas as ambiguidades observadas, ao nível do grupo de alelos, após o teste com a solução de iniciador DRB1, foram reduzidas para um resultado de tipagem não ambíguo usando a solução de iniciador DRB1*03,11,13,14: DRB1*01, DRB1*13 ou DRB1*01, DRB1*14 (3 casos); DRB1*04, DRB1*13 ou DRB1*04, DRB1*14 (6 casos); DRB1*08, DRB1*11 ou DRB1*11, DRB1*13 (1 caso); DRB1*11, DRB1*12 ou DRB1*12, DRB1*13 (2 casos).

O software de interpretação LiRAS™ aconselhou para todos os resultados ambíguos a amplificação DRB1*03,11,13,14 seguida por hibridização com INNO-LiPA HLA-DRB1 strip.

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.

