# Bedienungsanleitung

## Olerup SSP®
## ohne Taq-Polymerase

# Zur Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum

## VERWENDUNGSZWECK

*Olerup* SSP® HLA-Typisierungskits sind qualitative Kits zur *in-vitro*-Diagnostik für die DNA-Typisierung von Allelen der HLA-Klassen I und II. Die Produkte werden von geschulten Experten in medizinischen Einrichtungen zur Bestimmung des HLA-Phänotyps verwendet. Das getestete Ausgangsmaterial ist DNA.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Humane Leukozyten-Antigene (HLA) wurden früher mittels des Lymphozytotoxizitätstests bestimmt. Dieser Test wurde jedoch aufgrund der Fehlerrate und der ungenügenden Auflösung der verschiedenen Allele durch DNA-Typisierungstechniken auf Grundlage der Polymerasekettenreaktion (PCR) ersetzt. Bei den meisten PCR-basierten Techniken wird der PCR-Prozess nur als Amplifikationsschritt der benötigten Ziel-DNA und als Post-Amplifikationsschritt zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen benötigten Allelen verwendet. Im Gegensatz dazu findet die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Allelen bei der PCR-SSP-Methode (sequenzspezifischer Primer – SSP) während des PCR-Prozesses statt. Dies verkürzt und vereinfacht den Post-Amplifikationsschritt zu einem einfachen Nachweisschritt mittels Gelelektrophorese. Die Ergebnisse des SSP-Tests sind entweder positiv oder negativ, somit ist keine komplizierte Interpretation der Ergebnisse mehr nötig. Zusätzlich ist die Typisierungsauflösung der PCR-SSP höher als für andere PCR-basierte Typisierungstechniken, da jedes Primerpaar zwei Sequenzmotive definiert, die in cis – d. h. auf demselben Chromosom – liegen. Außerdem wurde aufgrund der synthetischen Beschaffenheit der SSP-Reagenzien die Stabilität verbessert und die Lot-zu-Lot-Variation verringert.

## PRINZIP DER METHODE

Die PCR-SSP-Methode basiert auf dem Prinzip, dass vollständig oder fast vollständig übereinstimmende Oligonukleotid-Primer mit Übereinstimmung am 3‘-Ende von nicht-korrekturlesenden, thermostabilen DNA-Polymerasen bei der PCR-Reaktion effizienter verwendet werden als Primer mit fehlender Übereinstimmung. Primerpaare sind darauf ausgelegt, dass sie je nach benötigter Typisierungsauflösung zu einzelnen Allelen oder einer oder mehreren Gruppen von Allelen passen. Unter sorgfältig kontrollierten PCR-Bedingungen ermöglichen übereinstimmende oder fast vollständig übereinstimmende Primerpaare eine Amplifikation, d. h. ein positives Ergebnis, während Primerpaare mit fehlenden Übereinstimmungen keine Amplifikation ermöglichen, d. h. das Ergebnis ist negativ.

Nach dem PCR-Prozess werden die amplifizierten DNA-Fragmente nach Größe getrennt, z. B. durch Agarose-Gelelektrophorese, durch Färbung mit Ethidiumbromid und anschließende Exposition gegenüber UV-Licht visualisiert sowie mittels Fotografie dokumentiert und interpretiert. Die Interpretation von PCR-SSP-Ergebnissen basiert auf dem Vorhandensein oder

Nichtvorhandensein eines oder mehrerer spezifischer PCR-Produkte. Die relativen Größen der spezifischen PCR-Produkt(e) können bei der Interpretation der Ergebnisse behilflich sein. Die PCR-SSP-Methode für HLA wurde erstmals in den Jahren 1991 und 1992 von O. Olerup beschrieben.[1,2]

Da der PCR-Prozess von verschiedenen Faktoren negativ beeinflusst werden kann (z. B. Pipettierfehler, zu geringe DNA-Konzentration, schlechte DNA-Qualität, Vorhandensein von PCR-Inhibitoren, Thermocyclergenauigkeit), enthält jede PCR-Reaktion ein internes positives Kontrollprimerpaar.[2] Das interne positive Kontrollprimerpaar passt zu konservierten Bereichen des Gens für das humane Wachstumshormon, das bei allen humanen DNA-Proben vorhanden ist. In Gegenwart eines spezifischen PCR-Produkts von einem oder mehreren HLA-Allelen kann das Produkt des internen positiven Kontrollbands schwach oder gar nicht vorhanden sein. Die von den spezifischen HLA-Primerpaaren erzeugten Amplicons sind kürzer als die Amplicons des internen positiven Kontrollprimers, jedoch länger als nicht inkorporierte Primer (siehe zu erwartende Werte).

## REAGENZIEN

### A. Identifizierung

Die *Olerup*-SSP®-Typisierungskits enthalten getrocknete, sequenzspezifische Primer für die PCR-Amplifikation der HLA-Allele und des Gens für das humane Wachstumshormon, den PCR-Mastermix ohne *Taq*-Polymerase („Master Mix“), adhäsive PCR-Verschlussfolien und die Gebrauchsanweisung.

Die Primerlösungen sind vor-aliquotiert und wurden in verschiedenen 0,2-ml-Vertiefungen aus geschnittenen, dünnwandigen PCR-Platten getrocknet. Jede Vertiefung der Platte enthält eine getrocknete Primerlösung, bestehend aus einem spezifischen Primermix – d. h. allel- und gruppenspezifischen HLA-Primern – sowie einem internen positiven Kontrollprimerpaar, das nicht zu der Allel-Sequenz passt, sodass DNA-Probe, Mastermix und $H_2O$ direkt hinzugefügt werden können.

Die Primer sind auf eine optimale PCR-Amplifikation bei Verwendung des Mastermix und des empfohlenen Thermocycler-Programms ausgelegt (siehe Programmierung des Thermocyclers).

Die chargenspezifischen Spezifitäts- und Interpretationstabellen oder das Arbeitsblatt für die spezifischen, durch den jeweiligen Primermix amplifizierten HLA-Allele können unter https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/ abgerufen werden.

## B. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum.
2. Dieses Produkt darf nicht als alleinige Grundlage für eine klinische Entscheidung verwendet werden.
3. *Warnung vor Biogefährdung*: Alle Blutprodukte sind als potenziell infektiöses Material zu behandeln. Keines der heute bekannten Testverfahren kann zweifelsfrei ausschließen, dass die aus Humanblut gewonnenen Produkte keine Infektionserreger übertragen.
4. *Warnung vor Biogefährdung*: Das für die DNA-Färbung in der Agarose-Gelelektrophorese verwendete Ethidiumbromid ist ein Karzinogen. Tragen Sie bei der Verwendung daher geeignete persönliche Schutzkleidung.
5. *Vorsicht*: Tragen Sie beim Betrachten oder Fotografieren von Gelen stets einen UV-absorbierenden Augenschutz und sehen Sie nicht direkt in die UV-Lichtquelle.
6. Für ***Post***-PCR-Arbeitsschritte verwendete Pipetten und Laborinstrumente sollten ***nicht*** für Maßnahmen der ***Prä***-PCR verwendet werden.
7. Ausführlichere Informationen finden Sie auf dem Sicherheitsdatenblatt (http://www.labproducts.caredx.com).

## C. Bedienungsanleitung

Siehe Gebrauchsanweisung.

## D. Lagerungshinweise

Kit-Bestandteile im Dunkeln und bei der auf dem Verpackungsetikett angegebenen Temperatur lagern.
Vor dem auf dem Verpackungsetikett aufgedruckten Verfallsdatum verwenden.

## E: Vor der Verwendung erforderliche Reinigung oder Vorbereitung

Siehe Gebrauchsanweisung.

## F. Anzeichen für Instabilität

1. Verwenden Sie keine PCR-Röhrchen mit Sprüngen in den Vertiefungen oder Schäden an den oberen Rändern der Vertiefungen, da dies zur Evaporation während der PCR-Amplifikation führen kann. Verwenden Sie keine PCR-Deckelstreifen mit Sprüngen, da dies zur Evaporation während der PCR-Amplifikation führen kann.
2. Die Farbe der getrockneten Primer sollte rot sein. Eine gelbe Verfärbung der Primer deutet möglicherweise auf eine Zersetzung hin.
3. Der Mastermix sollte rot bis purpurfarben sein. Eine gelbe oder orange Verfärbung deutet möglicherweise auf eine Zersetzung hin.

## INSTRUMENTELLE ANFORDERUNGEN

### A. Gerät

Es sollte ein Thermocycler mit mindestens den folgenden Eigenschaften verwendet werden:

- beheizbarer Deckel mit einer Temperatur von 104 °C für eine ölfreie Verwendung
- Probenblock (Aluminium, Silber oder vergoldetes Silber) für die Verwendung mit einer PCR-Platte mit 96 Vertiefungen oder mit dünnwandigen 0,2-ml-Reagenzgefäßen
- Olerup-SSP-Typisierungskits sind auf folgenden Thermocyclern validiert.
  Empfohlene Heizraten:
  - GeneAmp 9700: GeneAmp 9700 Cycler im 9600-Modus. Dies entspricht einer **Proben-Heizrate** von 1,6 °C/s nach oben und 0,8 °C/s nach unten.
  - ProFlex 1x96-Well-Probenblock: ProFlex PCR-Cycler mit einer Block-Heizrate von 3,0 °C/s (jeder Schritt 3,0 °C/s). Eine **Block-Heizrate** von 3,0 °C/s entspricht einer Proben-Heizrate von 1,52 °C/s nach oben und 1,36 °C/s nach unten.
  - ProFlex 2x96-Well-Probenblock: ProFlex PCR-Cycler mit einer Block-Heizrate von 3,0 °C/s (jeder Schritt 3,0 °C/s). Eine **Block-Heizrate** von 3,0 °C/s entspricht einer Proben-Heizrate von 1,9 °C/s nach oben und 1,6 °C/s nach unten.

  ***Hinweis: Höhere als die hier aufgeführten Heizraten können sich auf die Typisierungsergebnisse auswirken. Bitte beachten Sie auch, dass bei verschiedenen nicht validierten Cyclern die Auswirkungen auf die Typisierung je nach Einstellungen unterschiedlich sein können.***
- Temperaturbereich von 4,0 °C bis 99,9 °C
- Temperaturgenauigkeit von ±0,25 °C im Bereich von 35 °C bis 99,9 °C
- Temperaturkonstanz des Probenblocks von ≤0,75 °C im Bereich von 55 °C bis 95 °C
- auf eine Eichnorm (z. B. NIST) zurückführbare Temperaturkalibrierung.

Programmieren Sie den Thermocycler mit den im nachfolgenden Abschnitt B angegebenen PCR-Zyklusparametern.

Spezifische Informationen zum Thermocycler finden Sie in der Bedienungsanleitung des Herstellers. Thermocycler sollten gemäß den Akkreditierungsnormen der ASHI (Amerikanische Gesellschaft für Histokompatibilität und Immungenetik) oder der EFI (Europäische Vereinigung für Immungenetik) kalibriert werden.

Programmieren Sie den Thermocycler, bevor Sie mit der Verwendung gemäß der unten beschriebenen Gebrauchsanweisung beginnen.

## B. PCR-Zyklusparameter

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1. | 1 Zyklus | 94 °C | 2 min | Denaturierung |
| 2. | 10 Zyklen | 94 °C | 10 s | Denaturierung |
| | | 65 °C | 60 s | Annealing und Extension |
| 3. | 20 Zyklen | 94 °C | 10 s | Denaturierung |
| | | 61 °C | 50 s | Annealing |
| | | 72 °C | 30 s | Extension |
| 4. | Ende – Halten | RT | | bei unter 8 Stunden |
| | | 4 °C | | bei über 8 Stunden |

Gesamte Reagenzmenge in jeder Vertiefung, 10 µl.

Für alle *Olerup*-SSP®-Kits werden dieselben PCR-Zyklusparameter verwendet.

## PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Für die SSP-Typisierung wird extrahierte, hochreine DNA benötigt. Die für die PCR-SSP-HLA-Typisierung verwendeten DNA-Proben sollten wieder in $dH_2O$ gelöst werden. Für eine optimale Bandenvisualisierung während der Elektrophorese sollte das mittels spektralphotometrischer Untersuchung bestimmte $A_{260/280}$-Verhältnis 1,6–2,0 betragen.

Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Als Ausgangsmaterial sollte ACD-Blut verwendet werden.

Alternativ kann die DNA durch ein beliebiges anderes Verfahren zur Gewinnung reiner DNA extrahiert werden. Wenn alternative Verfahren verwendet werden, sollte die DNA-Konzentration auf 30 ng/µl angepasst werden. ***Verwenden Sie für diese Verfahren kein heparinisiertes Blut.***

| Empfohlene DNA-Konzentration bei Verwendung von: |
|---|
| mittels EZ1 extrahierter DNA: 15 ng/µl. |
| mithilfe anderer Verfahren extrahierter DNA: 30 ng/µl. |

Konzentrationen über 50 ng/µl erhöhen das Risiko für unspezifische Amplifikationen und schwache zusätzliche Banden, insbesondere bei hochauflösenden SSP-Typisierungen der HLA-Klasse I. Verdünnen Sie die extrahierte DNA gegebenenfalls in $dH_2O$.

***DNA-Proben sollten nicht erneut in Lösungen gelöst werden, die Chelatbildner wie EDTA in Konzentrationen über 0,5 mM enthalten.***

DNA-Proben können sofort nach der Extraktion verwendet werden und ohne negative Auswirkungen bis zu 2 Wochen bei +4 °C gelagert werden. Bei einer Temperatur von −20 °C und darunter können DNA-Proben bis zu 9 Monate gelagert werden. Die Reinheit und Konzentration von extrahierten DNA-Proben, die längere Zeit gelagert wurden, sollte vor der HLA-Typisierung auf Akzeptanz geprüft werden.

DNA-Proben sollten bei +4 ° C oder kälter transportiert werden, um ihre Unversehrtheit zu gewährleisten.

# VERFAHREN

## A. Im Kit enthaltene Materialien

1. *Olerup* SSP® PCR-Platten/-Röhrchen.
2. Mastermix ohne *Taq*-Polymerase(entsprechend der Menge der PCR-Platten/-Röhrchen im Kit). Für alle *Olerup*-SSP®-Kits wird derselbe Mastermix verwendet.
3. Selbstklebende PCR-Verschlussfolien (den Platten des Kits entsprechende Anzahl).
4. Gebrauchsanweisung.

## B. Erforderliche, aber nicht im Kit enthaltene Materialien

1. DNA-Isolationskit/zugehörige Laborausstattung
2. UV-Spektralphotometer
3. Pipettierhilfen. Wir empfehlen die Verwendung elektronischer Einkanalpipetten, die bis zu 10 µl Aliquote abgeben können, um die Mischung aus DNA, Mastermix und $dH_2O$ in die Plattenvertiefungen zu geben.
4. Einweg-Pipettenspitzen
5. Polypropylenröhrchen
6. Vortexmixer
7. Mikrozentrifuge
8. PCR-Plattengestell
9. Thermocycler mit beheiztem Deckel für PCR mit 96 Vertiefungen, einem Temperaturgefälle des Heizblock von ≤0,75 °C und einer Platte/Halterung für dünnwandige Reagenzvertiefungen zu je 0,2 ml
10. Mikrowellenherd oder Heizplatte zum Erhitzen der Agaroselösungen
11. Elektrophorese-geeignete Agarose, z. B. FMC Seakem LE
12. 0,5x TBE-Puffer; 1 TBE-Puffer besteht aus 89 mM Tris-Borat, 2 mM Dinatrium-EDTA und hat einen pH-Wert von 8,0
13. Ethidiumbromid-Tropfflasche, Produkt-Nr. 103.301-10, oder GelRed-Tropfflasche, Produkt- Nr. 103.302-05
14. Pipettierhilfe für Gelauftrag. Wir empfehlen 8-Kanal-Pipetten für Gelauftrag, einstellbare Menge: 5–25 µl
15. DNA-Größenmarker zur Abdeckung eines Bereichs von 50–1 000 bp, z. B. 100-Basenpaarleiter, DNA-Größenmarker Produkt-Nr. 103.202-100 oder DNA-Größenmarker für kurze Gelwanderungen 103.203-100
16. Elektrophoresegerät/Netzteil
17. UV-Transilluminator
18. Fotografie- oder Bilddokumentationssystem
19. Roche *Taq* DNA Polymerase, GMP Grade. [Katalog # 03 734 927 001 (1000 U) oder # 03 734 935 001 (5000 U)].

## C. Arbeitsanleitung

Siehe Gebrauchsanweisung.

## GEBRAUCHSANWEISUNG

### A. Vorbereitung der Proben

1. Isolieren Sie die genomische DNA aus der Leukozytenprobe nach einem Verfahren Ihrer Wahl (siehe Probenentnahme und -vorbereitung oben).
2. Spezifische Informationen zur Vorbereitung und Lagerung von Proben finden Sie oben unter Probenentnahme und -vorbereitung.
3. Führen Sie die PCR-Amplifikation mit der gereinigten DNA-Probe unter Verwendung eines *Olerup*-SSP®-Typisierungskits durch oder lagern Sie die DNA-Probe bis zur Typisierung.

### B. Vorbereitung Reagenz/Ausrüstung

1. Programmieren Sie einen Thermocycler, um das *Olerup* SSP® PCR-Programm zu starten (siehe Instrumentelle Anforderungen – PCR-Zyklusparameter oben).
2. Halten Sie *Taq*-Polymerase bereit (5 U/µl), gelagert bei −20 °C.
3. Bereiten Sie ein Elektrophorese-Gel vor (siehe Abschnitt C – **Vorbereitung der Gelelektrophorese** unten).

### C. Vorbereitung der Gelelektrophorese

Für *Olerup* SSP® Gelsystem 96 (Produkt-Nr. 103.101-01)

1. Aufbau
   - Richten Sie die Gießkammer für 1 Gel (Produkt-Nr. 103.101-31) oder die Gießkammer für 3 Gele (Produkt-Nr. 103.101-33) mit der Libellenblase und den drei höhenverstellbaren Beinen aus.
   - Stellen Sie die Gelplatte(n) in die Gießkammer.
2. Vorbereitung von 2%igem (w/v) Agarose-Gel
   Verwenden Sie qualitativ hochwertige Elektrophorese-geeignete Agarose, die 50–2 000 DNA-Basenpaar-Fragmente lösen kann.
   - Geben Sie in einer 500-ml-Glasflasche 150 ml destilliertes Wasser und 2 g Agarose zu 5 ml 10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer).
   - Lösen Sie die Agarose durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen auf, bis sich 100 ml homogene Lösung gebildet haben.
   - Lassen Sie die gelöste Gellösung auf 60 °C abkühlen, z. B. in einem Wärmeschrank.
   - Färben Sie das Gel vor dem Gießen mit Ethidiumbromid (10 mg/ml), 5 µl pro 100 ml Gellösung. Verwenden Sie für eine einfache Handhabung unsere Ethidiumbromid-Tropfflaschen (Produkt-Nr. 103.301-10). **Hinweis: Ethidiumbromid ist ein Karzinogen. Tragen Sie bei der Verwendung daher geeignete persönliche Schutzkleidung.**
   - Geben Sie 100 ml der Gellösung auf die Gelplatte in der Gießkammer. Schieben Sie 6 Gelkämme (Produkt-Nr. 103.101-21) in die Spalten der Gelplatte.
   - Lassen Sie das Gel 15 Minuten aushärten.

- Geben Sie 750 ml 0,5x TBE-Puffer in den Gelbehälter. Tauchen Sie die Gelplatte in die Gelkammer und entfernen Sie die 6 Gelkämme vorsichtig, indem Sie sie anheben.

Falls Sie alternative Elektrophorese-Systeme verwenden, befolgen Sie die Gebrauchsanweisungen des Herstellers. Um mit den *Olerup* SSP® HLA-Typisierungskits verwendet werden zu können, müssen diese Systeme in der Lage sein, PCR-Produkte mit 50 bis 1100 Basenpaaren aufzulösen.

## D. Arbeitsanleitung

1. Entnehmen Sie die folgenden benötigten Reagenzien aus dem Kühlschrank mit der angegebenen Lagertemperatur: die zu testenden DNA-Proben, die SSP-Kit(s) und die für die ausgewählte(n) DNA-Probe(n)/Kit(s) benötigte Menge an Mastermix sowie *Taq*-Polymerase (5 U/µl). Das Auftauen sollte bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) erfolgen.

Für alle *Olerup*-SSP®-Kits wird derselbe Mastermix verwendet.

2. Mischen Sie die DNA-Probe(n) kurz auf dem Vortex.
3. Platzieren Sie die SSP-Kit(s) in einem PCR-Plattengestell.
4. **Kits mit niedriger und hoher Auflösung**
   - Vortexen Sie den Mastermix, bevor Sie Aliquote entnehmen.
   - Geben Sie den Mastermix, die *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und $dH_2O$ bei Raumtemperatur mit einer manuellen Einkanalpipette in ein 0,5-ml- oder 1,5-ml-Röhrchen. (Siehe Tabelle 1 unten für die richtigen Mengen.)
   - Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die gesamte Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
   - Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette 8 µl der Mischung aus Mastermix und $dH_2O$ sowie weitere 2 µl $dH_2O$ in die negative Kontrollvertiefung (die Vertiefung mit den Primerpaaren der Negativkontrolle) der Primerplatte.
   - Geben Sie die DNA-Proben bei Raumtemperatur mit einer manuellen Einkanalpipette zur restlichen Mischung aus Master Mix und $dH_2O$. (Siehe Tabelle 1 unten für die richtigen Mengen.)
   - Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die gesamte Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
   - Geben Sie mit einer elektronischen Einkanalpipette 10 µl des Proben-Reaktionsgemischs in jede Vertiefung der Primerplatte, mit Ausnahme der Vertiefung für die Negativkontrolle.

**Tabelle 1: Volumina der Komponenten, die bei Verwendung von Mastermix ohne *Taq*-Polymerase pro Test für die jeweilige Anzahl von Vertiefungen benötigt werden.**

| Anzahl der Vertiefungen pro Test | Menge an Mastermix (µl) | Menge an DNA (µl) | Menge an $dH_2O$ (µl) | Menge an *Taq*-Polymerase (µl) |
|---|---|---|---|---|
| 2 | 12 | 8 | 19,7 | 0,3 |
| 3 | 15 | 10 | 24,6 | 0,4 |
| 4 | 18 | 12 | 29,5 | 0,5 |
| 5 | 21 | 14 | 34,4 | 0,6 |
| 6 | 24 | 16 | 39,4 | 0,6 |
| 7 | 27 | 18 | 44,2 | 0,8 |
| 8 | 30 | 20 | 49,2 | 0,8 |
| 9 | 33 | 22 | 54,1 | 0,9 |
| 10 | 36 | 24 | 59 | 1,0 |
| 11 | 39 | 26 | 63,9 | 1,1 |
| 12 | 42 | 28 | 68,9 | 1,1 |
| 13 | 45 | 30 | 73,8 | 1,2 |
| 14 | 48 | 32 | 78,7 | 1,3 |
| 15 | 51 | 34 | 83,6 | 1,4 |
| 16 | 54 | 36 | 88,6 | 1,4 |
| 17 | 60 | 40 | 98,4 | 1,6 |
| 18 | 63 | 42 | 103,3 | 1,7 |
| 19 | 66 | 44 | 108,2 | 1,8 |
| 20 | 69 | 46 | 113,2 | 1,8 |
| 21 | 72 | 48 | 118,1 | 1,9 |
| 22 | 75 | 50 | 123 | 2,0 |
| 23 | 78 | 52 | 127,9 | 2,1 |
| 24 | 81 | 54 | 132,8 | 2,2 |
| | | | | |

| Anzahl der Vertiefungen pro Test | Menge an Mastermix (µl) | Menge an DNA (µl) | Menge an $dH_2O$ (µl) | Menge an *Taq*-Polymerase (µl) |
|---|---|---|---|---|
| 25 | 87 | 58 | 142,7 | 2,3 |
| 26 | 90 | 60 | 147,6 | 2,4 |
| 27 | 93 | 62 | 152,5 | 2,5 |
| 28 | 96 | 64 | 157,4 | 2,6 |
| 29 | 99 | 66 | 162,4 | 2,6 |
| 30 | 102 | 68 | 167,3 | 2,7 |
| 31 | 105 | 70 | 172,2 | 2,8 |
| 32 | 108 | 72 | 177,1 | 2,9 |
| 36 | 126 | 84 | 206,6 | 3,4 |
| 40 | 138 | 92 | 226,3 | 3,7 |
| 44 | 150 | 100 | 246 | 4,0 |
| 48 | 162 | 108 | 265,7 | 4,3 |
| 52 | 174 | 116 | 285,4 | 4,6 |
| 56 | 186 | 124 | 305 | 5,0 |
| 60 | 198 | 132 | 324,7 | 5,3 |
| 64 | 210 | 140 | 344,4 | 5,6 |
| 68 | 228 | 152 | 373,9 | 6,1 |
| 72 | 240 | 160 | 393,6 | 6,4 |
| 76 | 252 | 168 | 413,3 | 6,7 |
| 80 | 264 | 176 | 433 | 7,0 |
| 84 | 276 | 184 | 452,6 | 7,4 |
| 88 | 288 | 192 | 472,3 | 7,7 |
| 92 | 300 | 200 | 492 | 8,0 |
| 96 | 312 | 208 | 511,7 | 8,3 |

Die oben aufgeführten empfohlenen Mengen sind so berechnet, dass Pipettenvariationen und Flüssigkeitsverluste an den Innenseiten der Röhrchen kompensiert werden können.

## 5. Kombi-Kits A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ und DQA-DQB-DR Enhanced und das Kit HLA-C hohe Auflösung für häufige Allele

- Vortexen Sie den Mastermix.
- Geben Sie 8,3 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) 511,7 µl $dH_2O$ bei Raumtemperatur mit einer manuellen Einkanalpipette in das im Kit enthaltene 1,5-ml-Röhrchen mit 312 µl Mastermix.
- Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die gesamte Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
- Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette 8 µl der Mischung aus Mastermix, *Taq*-Polymerase und $dH_2O$ sowie weitere 2 µl $dH_2O$ in die negative Kontrollvertiefung Nr. 96 (die Vertiefung mit den Primerpaaren der Negativkontrolle) der Primerplatte.

- Geben Sie bei Raumtemperatur 206 µl DNA-Probe mit einer manuellen Einkanalpipette zur restlichen Mischung aus Mastermix, *Taq*-Polymerase und $dH_2O$.
- Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die gesamte Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
- Geben Sie mit einer elektronischen Einkanalpipette 10 µl des Proben-Reaktionsgemischs in jede Vertiefung der Primerplatte, mit Ausnahme der Vertiefung Nr. 96 für die Negativkontrolle.

**Wichtig:**

Pipettieren Sie die Probe immer oberhalb des PCR-Röhrchens, um eine Kreuzkontamination zwischen den Vertiefungen zu vermeiden. Berühren Sie die Innenseite der Vertiefung mit der Pipettenspitze, damit die Probe am Rand der Vertiefung nach unten laufen kann. Überprüfen Sie, ob die Proben in allen Vertiefungen nach unten gelaufen sind. Falls nicht, klopfen Sie vorsichtig auf die Tischoberfläche, damit sich vor der PCR alle Proben am Boden der Vertiefungen absetzen.

5. Decken Sie die SSP-Primer mit den im Kit enthaltenen selbstklebenden PCR-Verschlussfolien ab. Stellen Sie sicher, dass alle Reagenzvertiefungen vollständig verschlossen sind, um Evaporationsverluste während der PCR-Amplifikation zu vermeiden. Um eine Evaporation während des Wärmezyklus zu verhindern, kann das *Olerup* SSP® Druckkissen (Produkt-Nr. 103.505-06) auf den selbstklebenden PCR-Verschlussfolien angebracht werden.
6. Schieben Sie die Primerplatte(n) mit einem geeigneten Röhrchenplatten-Adapter in den Thermocycler. Zwischen dem PCR-Aufbau und dem Wärmezyklus dürfen nicht mehr als 5 Minuten vergehen.
7. Geben Sie Ihre *Olerup* SSP® Programmnummer ein. Wählen Sie als Reagenzmenge 10 µl.
8. Starten Sie das PCR-Programm. Das Programm dauert circa 1 Stunde und 20 Minuten.
9. Nehmen Sie die PCR-Platte(n) aus dem Thermocycler. Überprüfen Sie, ob sich in jeder PCR-Vertiefung der PCR-Platte in etwa dieselbe Menge Flüssigkeit befindet. Elektrophoresieren Sie die Proben gemäß Abschnitt E – Gelelektrophorese (siehe unten). Interpretieren Sie die Typisierungsergebnisse mit den ***chargenspezifischen Interpretations- und Spezifitätstabellen oder dem Arbeitsblatt***, siehe Erwartete Werte unten.

## E. Gelelektrophorese

1. Richten Sie nach Abschluss der PCR-Reaktion die Primerplatte und die Gelkammer aus. Die Vertiefungen müssen von links nach rechts und von oben nach unten angeordnet sein.
2. Entfernen Sie vorsichtig die PCR-Verschlussfolie, ohne die PCR-Produkte zu verschütten.
3. Übertragen Sie die PCR-Produkte der Reihe nach auf das 2%ige Agarose-Gel. (Es muss kein Gelauftragspuffer hinzugegeben werden.) Es wird empfohlen, für den Gelauftrag eine 8-Kanal-Pipette zu verwenden.
4. Geben Sie einen DNA-Größenmarker (100 Basenpaarleiter, DNA-Größenmarker Produkt-Nr. 103.202-100 oder DNA-Größenmarker für kurze Gelwanderungen 103.203-100) in jeweils eine Vertiefung pro Reihe.
5. Decken Sie die Gelkammer mit dem zugehörigen Deckel ab.
6. Lassen Sie das Gel für 15–20 Minuten bei 8–10 V/cm in 0,5x TBE-Puffer laufen (Puffer nicht mehrfach verwenden).
7. Schieben Sie die Gelplatte mit dem Gel in einen UV-Transilluminator.
8. Fotografieren Sie das Gel mit oder ohne Gelplatte.
9. Markieren Sie das Foto gemäß den Vorschriften des Labors.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Die HLA-Testrichtlinien der ASHI schreiben vor, dass eine Vertiefung für die negative (Kontaminierungs-)Kontrolle Teil eines jeden PCR-Aufbaus sein muss. (Standards for Accredited Laboratories, Amerikanische Gesellschaft für Histokompatibilität und Immungenetik, 2012 revidierte Normen, durch den Vorstand der ASHI genehmigt: Januar 2013, letzte Version der Leitlinie von Oktober 2012). Sämtliche Kits ab Charge 01V (DQ-Low-Kit: ab Charge 06Y) und höher enthalten eine negative Kontrollvertiefung.

Siehe Gelinterpretation auf Seite 14.

## ERGEBNISSE

Chargenspezifische Zelllinien-Validierungsblätter und Analysezertifikate können online unter https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/ abgerufen werden.

## GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der PCR-SSP-Prozess muss unter streng kontrollierten Testbedingungen durchgeführt werden, um eine angemessen diskriminierende Amplifikation sicherzustellen. Das in der Gebrauchsanweisung beschriebene Verfahren muss streng eingehalten werden.
2. Die extrahierte DNA-Probe liefert das Muster für den spezifischen PCR-Amplifikationsprozess. Die gereinigte DNA sollte ein $A_{260/280}$-Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 aufweisen, um eine optimale Bandenvisualisierung durch Elektrophorese zu erhalten.
3. Alle Instrumente wie z. B. Thermocycler und Pipettierhilfen müssen gemäß den Herstellerangaben kalibriert sein.

4. Chargenspezifische Informationen finden Sie unter Gebrauchsinformation: Chargenspezifische Informationen und auf dem chargenspezifischen Arbeitsblatt.
5. Auf Grundlage der durchgeführten Tests wurden die folgenden Substanzen mit drei (3) Extraktionsverfahren in den aufgeführten Konzentrationen bewertet, und es wurde befunden, dass sie die Testleistung nicht beeinträchtigen.

| Extraktionsverfahren | Störsubstanz | Konzentration der Störsubstanz* |
|---|---|---|
| EZ1 DSP DNA Blood System | Bilirubin | 200 mg/l |
| | Hämoglobin | 200 g/l |
| | Triglyceride | 30 g/l |
| | Protein | 110 g/l |
| | | |
| QIAamp DSP DNA Blood Kit | Bilirubin | 200 mg/l |
| | Hämoglobin | 200 g/l |
| | Triglyceride | 18,2 g/l |
| | Protein | 77–96 g/l |
| | | |
| Gentra PureGene Methode | Bilirubin | 200 mg/l |
| | Hämoglobin | 200 g/l |
| | Triglyceride | 18,2 g/l |
| | Protein | 119–146 g/l |

6. Die PCR-Platten sind mit den meisten auf dem Markt erhältlichen Thermocyclern kompatibel. Siehe Tabelle zur Thermocycler-Kompatibilität unten.
   *Hinweis: Die Tabelle ist nur als Richtlinie gedacht. Für validierte Thermocycler siehe Abschnitt Instrumentelle Anforderungen – Gerät.*

| **Kompatibilitätstabelle** | |
|---|---|
| **Hersteller** | **Thermocycler** |
| Applied Biosystems | GeneAmp 9700 |
| | ProFlex 96-Well |
| | ProFlex 2x96-Well |
| | Veriti 0,2 ml 96-Well-Probenblock |
| | GeneAmp 2700, 2720, 9600 |
| Agilent (Stratagene) | SureCycler 8800 |
| | RoboCycler |
| | Gradient Cycler |
| Biometra | Uno, Uno II |
| | T1 Thermocycler |
| | TGradient/TAdvanced |
| | TRobot |
| | TProfessional |
| Bio-Rad | MJ Mini |
| | T100 |
| | iCycler, MyCycler |
| | C1000, S1000 |
| | PTC-2(xx) |
| | PTC-100 mit 96-Well-Probenblock |
| Eppendorf | Mastercycler Gradient |
| | Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus |
| MWG | Primus 96 |
| | TheQ Lifecycler |
| Thermo Scientific | Arktik |
| Techne | Flexigene, TC-412, TC-4000 |
| | Genius, Touchgene, TC-512, TC-5000 |
| | TC-PLUS, Prime, PrimeG, Prime Elite |
| Thermo Scientific Hybaid | PCR Express, Px2, PxE |
| | MultiBlock System & MBS |
| | Omnigene, Omn-E |
| Gene Technologies | GS1, GS4, GSX |
| Takara | TP 3000 |

7. Die Leistung dieses Kits unter Verwendung des Mastermix ohne Taq-Polymerase wurde nur mit der Roche Taq DNA Polymerase, GMP Grade (Katalognummer 03 734 927 001 oder 03 734 935 001) validiert. Die Assay-Leistung mit anderen Enzymen ist unbekannt und muss vom Benutzer ermittelt und validiert werden.

## ERWARTETE WERTE

### A. Datenanalyse

Untersuchen Sie das Gelfoto sorgfältig und bestimmen Sie die positiven Amplifikate.

1. Wenn (ein) spezifische(s) HLA-Allel(e) verstärkt wurde(n), lässt sich eine schneller wandernde, kürzere Bande auf einer Gellinie beobachten. Dies zeigt ein positives Testergebnis an.
   a. Halten Sie das Vorhandensein und Nichtvorhandensein spezifischer PCR-Produkte fest.
   b. Es empfiehlt sich, bei der Interpretation der Gelergebnisse die in der chargenspezifischen Gebrauchsinformation angegebenen relativen Längen der spezifischen PCR-Produkte zu kontrollieren. Für viele Amplifikate gibt es zwei oder mehr mögliche Längen spezifischer PCR-Produkte. Diese Vertiefungen enthalten mehrere Primerpaare, die je nach HLA-Allel(en) der Proben-DNA unterschiedlich große PCR-Produkte erzeugen.
   c. Vergleichen Sie das Muster der Gellinien spezifischer PCR-Produkte mit den Informationen der chargenspezifischen Interpretations- und Spezifitätstabellen, um die HLA-Typisierung der Proben-DNA zu erhalten.
2. Als Bestätigung der erfolgreichen Amplifikation sollte in allen Gellinien (außer in der Gellinie der Negativkontrolle) eine langsamer wandernde und längere interne Positivkontrollbande sichtbar sein. Die interne Positivkontrollbande kann in positiven Gellinien schwach sein oder ganz fehlen.
   a. Halten Sie das Vorhandensein und die relative Länge der internen Positivkontrollbande fest. Die unterschiedlich großen Kontrollbanden helfen bei der richtigen Orientierung der Typisierung sowie bei der Identifizierung des Kits.
   b. Das Fehlen einer internen Positivkontrollbande ohne spezifisches PCR-Produkt weist auf eine fehlgeschlagene PCR-Reaktion hin.
      i. Falls HLA-Allele bei (einer) fehlgeschlagenen PCR-Reaktion(en) bestimmt werden können und die fehlgeschlagene(n) PCR-Reaktion(en) die Allelzuordnung nicht ändert/ändern, muss der Test nicht wiederholt werden.
      ii. Falls die fehlgeschlagene(n) PCR-Reaktion(en) jedoch die HLA-Allelzuordnung ändern könnte(n), muss die Typisierung wiederholt werden.
3. Das Vorhandensein eines spezifischen PCR-Produkts oder einer internen Positivkontrollbande in (einer) Linie(n) der Negativkontrolle weist auf eine Kontamination mit dem/den PCR-Produkt(en) hin und macht alle Testergebnisse ungültig. Mitunter können Primer-Oligomere mit 40 bis 60 Basenpaaren in der/den Linie(n) der Negativkontrolle beobachtet werden. Dies weist nicht auf eine Kontamination hin.

## B. Gelinterpretation

1. Ein DNA-Größenmarker (100 Basenpaarleiter, DNA-Größenmarker Produkt-Nr. 103.202-100 oder DNA-Größenmarker für kurze Gelwanderungen 103.203-100) sollte in jeweils einer Vertiefung pro Gelreihe oder gemäß den örtlichen Laborakkreditierungsrichtlinien eingesetzt werden.
2. Es können Banden entstehen, die länger als die internen Positivkontrollbanden sind. Diese sollten bei der Interpretation der Typisierungsergebnisse außer Acht gelassen werden.
3. Nicht verwendete Primer bilden eine unscharfe Bande, die kürzer als 50 Basenpaare ist.
4. Es können möglicherweise Primer-Oligomer-Artefakte beobachtet werden. Diese sind länger als die Primerbande, aber kürzer als die spezifischen Banden.

## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Qualitätskontrolle der Kit-Chargen

Jede Primerlösung wird gegen eine Auswahl von 48 DNA-Proben aus genau charakterisierten IHWC-Zelllinien getestet, siehe die chargenspezifischen Zelllinien-Validierungsblätter in der Gebrauchsinformation, Chargenspezifische Informationen.

Verfahrensvergleich

Es wurde eine Vergleichsstudie mit den *Olerup* SSP® HLA-Typisierungskits mit und ohne *Taq*-Polymerase im PCR-Mastermix durchgeführt. Der Zweck der Studie bestand darin, nachzuweisen, dass die manuelle Zugabe die Testergebnisse nicht beeinflusst und dass verschiedene Chargen von *Taq*-Polymerase die gleichen Ergebnisse liefern. Die Studie umfasste die niedrig auflösende Typisierung von HLA-A, -B (Klasse I) und -DRB (Klasse II) in 15

DNA-Proben der IHWC mit bekanntem HLA-Genotyp. Die Vorbereitung und Codierung der Proben erfolgte durch andere Personen als das Testpersonal. Die HLA-Typen der Proben waren den für die Durchführung der Tests verantwortlichen Personen demnach nicht bekannt. Jede Probe wurde parallel mit der *Olerup* SSP® HLA-A-B-DR-Kombiplatte mit PCR-Mastermix ohne *Taq*-Polymerase („Test“) und der *Olerup* SSP® HLA-A-B-DR-Kombiplatte mit PCR-Mastermix mit *Taq*-Polymerase („Kontrolle“) gemäß den Anweisungen des jeweiligen Assays getestet. Alle Tests wurden im Labor von *Olerup* SSP AB in Stockholm, Schweden, mit einer Kit-Charge und zwei *Taq*-Polymerase-Chargen durchgeführt. Für die Studie wurde die Roche *Taq* DNA Polymerase, GMP Grade verwendet. Für jede Probe wurde jeweils eine Typisierung mit niedriger Auflösung mit der Olerup SSP® HLA-A-B-DR-Kombiplatte durchgeführt mit: 1) PCR-Mastermix inklusive Taq-Polymerase (FDA-geprüfter Assay) (Kontrollassay), 2) PCR-Mastermix plus Roche Taq DNA Polymerase, GMP Grade, 5 U/µl; Charge #1 (Testcharge #1) und 3) PCR-Mastermix plus Roche Taq DNA Polymerase, GMP Grade, 5 U/µl; Charge #2 (Testcharge #2). Im Anschluss an die PCR erfolgte der Nachweis mittels Gelelektrophorese. Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefasst.

| Vergleich | Übereinstimmung | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Typisierungsergebnisse Klasse I (# Übereinstimmung/gesamt) | | Typisierungsergebnisse Klasse II (# Übereinstimmung/gesamt) | % Übereinstimmung (95 % Konfidenzintervall[a]) |
| | HLA-A | HLA-B | HLA-DRB | |
| Testcharge #1/Kontrollcharge | 15/15 | 15/15 | 15/15 | 100 % (84,7–100,0 %) |
| Testcharge #1/Konsensus[b] | 15/15 | 15/15 | 15/15 | 100 % (84,7–100,0 %) |
| Testcharge #2/Kontrollcharge | 15/15 | 15/15 | 15/15 | 100 % (84,7–100,0 %) |
| Testcharge #2/Konsensus | 15/15 | 15/15 | 15/15 | 100 % (84,7–100,0 %) |
| Testcharge #1/Testcharge #2 | 15/15 | 15/15 | 15/15 | 100 % (84,7–100,0 %) |

[a] Score-Methode
[b] Konsensus-Ergebnis aus der International Histocompatibility Workshop Collection

## REFERENZEN

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991: **37:** 197–204.
2. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to

serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992: **39**: 225–235.

3. Die derzeitigen HLA-Allele sind zu finden unter:
   a. http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla oder
   b. http://www.anthonynolan.org.uk/HIG.

## PROBLEMBEHEBUNG

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| **Keine Amplifikation (weder eine Amplifikation der internen Kontrollfragmente noch der spezifischen Amplifikationen).** | DNA-Menge zu gering. | Messen Sie die DNA-Konzentration und überprüfen Sie, ob die hinzugegebene Menge stimmt.<br>Eine RNA-Kontamination kann zu einer spektralphotometrischen falsch hohen DNA-Konzentration führen.<br>Extrahieren Sie die DNA erneut sorgfältig mit frisch zubereiteten Lösungen.<br>Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | Die DNA enthält PCR-Inhibitoren, z. B. Proteine, Ethanol (aus den Ausfällungsschritten), übrig gebliebene Matrizen aus DNA-Reinigungsprodukten der Festphase. | Messen Sie die DNA-Qualität. Wir empfehlen ein A260/A280-Verhältnis von 1,6–2,0 durch UV-Spektralphotometrie.<br>Befolgen Sie die DNA-Extraktionsanleitung des Herstellers genau.<br>Extrahieren Sie die DNA erneut.<br>Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | Die DNA wurde aus heparinisiertem Blut extrahiert. | Verwenden Sie nicht heparinisiertes Blut oder DNA-Extraktionsverfahren für heparinisiertes Blut. |
| | Die DNA wurde in einem EDTA enthaltenden Puffer gelöst. | Extrahieren Sie die DNA erneut und lösen Sie sie in $dH_2O$. |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Keine Amplifikation (weder eine Amplifikation der internen Kontrollfragmente noch der spezifischen Amplifikationen).** | Unbeabsichtigte Zufuhr von Bleichmittel im Test. | Überprüfen Sie Bereiche, in denen möglicherweise Bleichmittel zugeführt werden könnten. |
| | Die Kits werden nicht bei geeigneten Temperaturen gelagert. | Lagern Sie die Kits bei −20 °C. |
| | Der Thermocycler funktioniert nicht richtig. | Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6–12 Monate neu kalibriert werden. |
| | Unzureichender Kontakt des Thermocycler-Heizblocks mit der SSP-Typisierungsplatte. | Verwenden Sie die richtige Platte/Halterung für dünnwandige 0,2-ml-Reagenzvertiefungen (siehe Bedienungsanleitung des Thermocyclers). |
| **Ausfälle.** | Nicht ordnungsgemäß verschlossene PCR-Verschlussfolien/-Röhrchendeckel führen zu einer Evaporation und daher zum Ausfall der Amplifikation. | Stellen Sie sicher, dass sämtliche PCR-Verschlussfolien/-Röhrchendeckel fest verschlossen sind. Um eine Evaporation während des Wärmezyklus zu verhindern, kann das *Olerup* SSP® Druckkissen (Produkt-Nr. 103.505-06) auf den selbstklebenden PCR-Verschlussfolien angebracht werden. |
| | Fehler beim Gelauftrag. | Überprüfen Sie, ob die richtige Anzahl an Vertiefungen befüllt wurde und jede Vertiefung in etwa dieselbe Menge PCR- |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Ausfälle.** | | Mischung enthält. |
| | Verwendung von nicht kalibrierten Pipetten. | Kalibrieren Sie alle Pipetten regelmäßig gemäß den Empfehlungen des Herstellers. |
| | Pipettierfehler. | Pipettieren Sie sorgfältiger. |
| | Mastermix und Proben-DNA wurden vor der Verwendung nicht richtig vermischt. | Mischen Sie sie vor der Verwendung kurz mit dem Vortex-Mixer. Wir empfehlen nach jeder Reihe eine Durchmischung mit dem Vortex-Mixer. |
| | Eine ungleichmäßige Menge DNA-Mastermix-Mischung wurde in die Vertiefungen gegeben. | Pipettieren Sie sorgfältiger. |
| **Schwache interne Kontrollfragmente.** | Unreine DNA. | Messen Sie die DNA-Qualität. Das A260/A280-Verhältnis sollte 1,6–2,0 durch UV-Spektralphotometrie betragen.<br>Eine RNA-Kontamination kann zu einer spektralphotometrischen falsch hohen DNA-Konzentration führen.<br>Zersetzte DNA führt zu Schlieren in den Gellinien.<br>Extrahieren Sie die DNA erneut sorgfältig mit frisch zubereiteten Lösungen.<br>Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | DNA-Menge zu gering. | Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen sie diese für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Schwache interne Kontrollfragmente.** | | DSP DNA Blood System extrahiert wurde, auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl ein.<br>Eine RNA-Kontamination kann zu einer spektralphotometrischen falsch hohen DNA-Konzentration führen.<br>Zersetzte DNA führt zu Schlieren in den Gellinien.<br>Extrahieren Sie die DNA erneut sorgfältig mit frisch zubereiteten Lösungen.<br>Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | Zu hohe Annealing-Temperatur, der Thermocycler ist nicht kalibriert. | Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm.<br>Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6–12 Monate neu kalibriert werden. |
| | Der PCR-Mastermix wurde länger als 2 Wochen bei +4 °C gelagert. | Lagern Sie den PCR-Mastermix ordnungsgemäß. |
| **Unspezifische Amplifikation (Leitern oder Schlieren).** | Zu hohe DNA-Konzentration verwendet. | Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen sie diese für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System extrahiert wurde, auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl ein.<br>Einige Primerlösungen führen häufiger zu unspezifischen Amplifikationen, siehe |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Unspezifische Amplifikation (Leitern oder Schlieren).** | | die Fußnoten in den einzelnen chargenspezifischen Spezifitätstabellen. |
| | Unreine DNA. | Alle Fragmente, die größer als die internen Kontrollfragmente sind, sollten bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse außer Acht gelassen werden.<br>Überprüfen Sie die DNA-Qualität. Extrahieren Sie die DNA erneut.<br>Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.<br>Einige Primerlösungen führen häufiger zu unspezifischen Amplifikationen, siehe die Fußnoten in den einzelnen chargenspezifischen Spezifitätstabellen. |
| **Die Amplifikationssignale werden mit der Zeit immer schwächer.** | Die Ethidiumbromid-Agarose-Gelfärbelösung ist alt. | Stellen Sie eine neue Ethidiumbromid-Lösung her, um eine bessere Färbung des Agarose-Gels und ein besseres Signal zu erhalten. Die Primertrübung kann leicht erkannt werden, wenn die Färbung des Agarose-Gels normal ist. |
| | Eine der UV-Lampen ist kaputt. | Überprüfen Sie die UV-Licht-Ausrüstung. Die Primertrübung kann leicht erkannt werden, wenn das UV-Licht normal ist. |
| | Zu geringe DNA-Konzentration verwendet. | Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Die Amplifikationssignale werden mit der Zeit immer schwächer.** | | sie diese für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System extrahiert wurde, auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl ein. |
| | Zu hohe Annealing-Temperatur, der Thermocycler ist nicht kalibriert. | Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6–12 Monate neu kalibriert werden. |
| **Ungewöhnliche Amplifikationsmuster.** | Die falsche chargenspezifische Interpretationstabelle/das falsche Arbeitsblatt wird verwendet. | Überprüfen Sie die Chargennummer des verwendeten Produkts und der verwendeten Interpretationstabelle/des Arbeitsblatts. |
| | Falsche Reihenfolge beim Gelauftrag. | Überprüfen Sie die Anordnung der Mischungen und Gellinien. |
| | Das Amplifikationsmuster enthält ein falsch positives Ergebnis. | Siehe unten. |
| | Das Amplifikationsmuster enthält ein falsch negatives Ergebnis. | Siehe unten. |
| **Falsch positive Amplifikationen.** | DNA-Kontamination. | Verwenden Sie Handschuhe, Pipettenspitzen mit Sperren (Filterverschlüsse) und getrennte Räume für die Handhabung vor der PCR-Behandlung und nach der PCR-Behandlung. Stellen Sie die richtige Handhabung aller Proben in allen Schritten sicher. |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Falsch positive Amplifikationen.** | | Suchen Sie mit dem Kit *Olerup* SSP® Wipe Test nach Kontaminationen. |
| | Unreine DNA. | Messen Sie die DNA-Qualität.<br>Befolgen Sie die DNA-Extraktionsanleitung des Herstellers genau.<br>Testen Sie andere DNA-Extraktionssysteme.<br>Extrahieren Sie die DNA erneut.<br>Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | Zu hohe DNA-Konzentration verwendet. | Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen sie diese für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System extrahiert wurde, auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl ein. |
| | Annealing-Temperatur zu gering. | Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6–12 Monate neu kalibriert werden. |
| | Erhebliche Verzögerung zwischen dem PCR-Aufbau und dem Beginn des Wärmezyklus. | Die Verzögerung vor dem Wärmezyklus sollte nicht mehr als 5 Minuten betragen. |
| | Verzögerung zwischen der Platzierung der Typisierungsplatten im Thermocycler und dem Beginn des Zyklus. | Verwenden Sie einen vorgeheizten Thermocycler. |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Falsch positive Amplifikationen.** | Zu viel Ethidiumbromid verwendet. | Verwenden Sie die empfohlene Menge Ethidiumbromid. |
| | Falsche Interpretation eines Artefakts als spezifische Bande. | Überprüfen Sie die richtige Bandengröße und die Fußnoten auf der chargenspezifischen Interpretationstabelle/dem Arbeitsblatt und der Spezifitätstabelle. |
| | Das Amplifikationsmuster enthält ein falsch positives Ergebnis. | Überprüfen Sie, ob alle spezifischen Amplifikationen die richtige Größe haben, oder ob ein Artefakt (Verschleppung, Primer-Dimer) fälschlicherweise als Amplifikation interpretiert wurde. |
| | Falsche Reihenfolge beim Gelauftrag. | Überprüfen Sie die Anordnung der Mischungen und Gellinien. |
| **Falsch negative Amplifikationen.** | Der Thermocycler ist nicht richtig kalibriert. | Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6–12 Monate neu kalibriert werden.<br>Falls das Problem durch die Kalibrierung nicht behoben wurde, typisieren Sie den Test mit einer Referenzprobe derselben Ausprägung erneut. Falls das negative Ergebnis bestätigt wird, kontaktieren Sie den Kundendienst. |
| | Falsche Reihenfolge beim Gelauftrag. | Überprüfen Sie die Anordnung der |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Falsch negative Amplifikationen.** | | Mischungen und Gellinien. |
| **Allgemeine Gelprobleme (verschwommene Gele und/oder verschmierte Linien).** | Degenerierte DNA-Probe. | Erscheint als Schlieren in den Gellinien. Isolieren Sie DNA aus einer frischen Probe. |
| | Starke Schlierenbildung in willkürlichen Vertiefungen. | Ungleichmäßige DNA-Suspensionen. Stellen Sie sicher, dass die Proben-DNA gelöst ist, bevor Sie Ihr Aliquot entnehmen. Mischen Sie die gelöste DNA-Probe mit dem Vortex-Mixer. |
| | PCR-Produkt ist aus der Vertiefung geflossen. | Richten Sie die Pipettenspitzen sorgfältig an den Gelvertiefungen aus und entleeren Sie sie langsam. |
| | Der Elektrophoresepuffer ist möglicherweise zu warm. | Stellen Sie einen neuen TBE-Puffer her.<br>Stellen Sie eine niedrigere Spannung ein. |
| | Agarose-Gel mit dem falschen Masseprozent wurde verwendet. | Stellen Sie sicher, dass das empfohlene 2%ige Agarose-Gel verwendet wird. |
| | Agarose ist nicht vollständig aufgelöst. | Kurz erneut erhitzen, um die Agarose aufzulösen. |
| | Falsche TBE-Konzentration. | Verwenden Sie die empfohlene 0,5x TBE-Konzentration. |
| | Gel nicht ausgekühlt. | Das Gel kann erst 15 Minuten nach Guss verwendet werden. |
| | Das Gel ist zu alt. | Gießen Sie das Gel nicht zu früh im Voraus. |
| | Der verwendete Gelkamm hat zu dicke Kerben. | Verwenden Sie dünne Kämme (4×1 mm). |
| | Die Gelplatte ist nicht UV-durchlässig. | Entfernen Sie vor der Betrachtung das Gel von der Gelplatte. |
| | Das Gelbild ist zu hell. | Zu viel Ethidiumbromid verwendet.<br>Überprüfen Sie die |

| Problem | Ursache | Maßnahme |
|---|---|---|
| ***Fortsetzung:*** **Allgemeine Gelprobleme (verschwommene Gele und/oder verschmierte Linien).** | | Kameraeinstellungen. |
| | Das Gelbild ist zu dunkel. | Verwenden Sie die empfohlene Menge Ethidiumbromid. Überprüfen Sie die Kameraeinstellungen. |
| **Allgemeine Probleme mit falsch negativer Amplifikation oder entsprechende Variationen von Lauf zu Lauf** | Heizrate zu hoch. | Die Olerup-SSP-Kits werden mit dem GeneAmp 9700 Cycler im 9600-Modus und dem ProFlex mit einer Heizrate von 3 °C/s validiert. Höhere als die genannten Heizraten können sich auf die Typisierungsergebnisse auswirken. |

## IN DIESEM DOKUMENT/PRODUKT VERWENDETE HANDELSMARKEN

*Olerup* SSP® ist eine eingetragene Handelsmarke der *CareDx AB*.
Qiagen™ ist eine Handelsmarke von QIAGEN.

**HINWEIS AN DEN KÄUFER:** *Olerup*-SSP®-Kits ohne *Taq*-Polymerase – Dieses Produkt ist für die Verwendung mit der Roche *Taq* Polymerase, GMP Grade (Katalog # 03 734 927 001 oder 03 734 935 001) im Polymerase-Kettenreaktionsverfahren („PCR“) optimiert, die möglicherweise durch Patente von Roche Molecular Systems, Inc. und F. Hoffmann-La Roche Ltd. („Roche“) geschützt sind. Das Labor ist dafür verantwortlich, sich mit Roche Molecular Systems, Inc. in Verbindung zu setzen, um festzustellen, ob für diese Patente eine Lizenz erforderlich ist.

## GEWÄHRLEISTUNG

*CareDx AB* gewährt dem ursprünglichen Käufer bei normaler Handhabung und Verwendung der Produkte eine Garantie auf Material- und Verarbeitungsfehler. Die einzige Verpflichtung der *CareDx AB* im Rahmen dieser Garantie besteht darin, jedes Produkt, das nicht den auf dem Produktdatenblatt angegebenen Leistungsstandards entspricht, kostenlos zu ersetzen.
Diese Gewährleistung gilt nur für Produkte, die gemäß den Empfehlungen der *CareDx AB* gehandhabt und gelagert wurden. Produkte, die geändert, falsch verwendet oder missbraucht wurden, werden nicht von dieser Gewährleistung abgedeckt.
Alle Forderungen gemäß dieser Gewährleistung müssen der *CareDx AB* schriftlich zusammen mit einer Kopie des Kaufbelegs zugesandt werden. Diese Gewährleistung gilt an Stelle aller anderen Gewährleistungen, ob ausdrücklich oder stillschweigend, einschließlich der Zusicherung der Gebrauchstauglichkeit

und der Gewährleistung, dass das Produkt für einen bestimmten Zweck geeignet ist. *CareDx AB* übernimmt keine Haftung für Zufalls- oder Folgeschäden.
Dieses Produkt darf nur mit schriftlicher Genehmigung durch *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Schweden, neu gestaltet, wiederverpackt oder auf irgendeine Weise weiterverkauft werden.
Behandeln Sie alle Proben als potenziell infektiös. Tragen Sie bei sämtlichen Arbeiten Handschuhe und adäquate Schutzausrüstung.

## GARANTIE

*CareDx AB* garantiert, dass die Primer in den *Olerup* SSP® Typisierungsplatten die im Arbeitsblatt sowie den chargenspezifischen Spezifitäts- und Interpretationstabellen der Gebrauchsinformation angegebenen Eigenschaften aufweisen.

## ADRESSEN:

**Hersteller:**
**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Schweden
**Tel:** +46-8-508 939 00
**Fax:** +46-8-717 88 18
**E-Mail:** orders-se@caredx.com
**Website:** http://www.labproducts.caredx.com

**Vertrieben durch:**
**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Schweden
**Tel:** +46-8-508 939 00
**Fax:** +46-8-717 88 18
**E-Mail:** orders-se@caredx.com
**Website:** http://www.labproducts.caredx.com

**CareDx Lab Solutions Inc**., 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
**Tel:** 1-877-653-7871
**Fax:** 610-344-7989
**E-Mail:** orders-us@caredx.com
**Website:** http://www.labproducts.caredx.com

**CareDx Pty Ltd.,** 20 Collie Street, Fremantle WA 6160, Australia.
**Tel:** +61 8 9336 4212
**E-Mail**: orders-aus@caredx.com
**Website:** http://www.labproducts.caredx.com/

Informationen zu CareDx-Händlern weltweit erhalten Sie bei der CareDx AB.

0414-LBL v02 Olerup SSP® HLA-Typisierungskits ohne Taq-Polymerase ist die Übersetzung des Englischen Basisdokuments 0193-LBL v04 Olerup SSP® HLA typing kits without Taq polymerase dar.

Änderungen in der Revision 0193-LBL v04 im Vergleich zu 0193-LBL v03:
1. Kontaktdaten aktualisiert.

Änderungen in der Revision 0193-LBL v03 im Vergleich zu 0193-LBL v02:
1. Datum der Überarbeitung hinzugefügt.
2. Präzisierung der Informationen zu den Dokumenten der chargenspezifischen Gebrauchsinformationen.
3. CareDx Pty Ltd als Vertriebspartner hinzugefügt.