



## Οδηγίες χρήσης

# Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® με Taq πολυμεράση

## Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

### ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Τα κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® είναι ποιοτικά *in vitro* διαγνωστικά κιτ για την τυποποίηση DNA των αλληλόμορφων HLA κατηγορίας I και HLA κατηγορίας II. Τα προϊόντα χρησιμοποιούνται από εκπαιδευμένους επαγγελματίες σε ιατρικά περιβάλλοντα για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου του HLA. Το εξεταζόμενο υλικό προέλευσης είναι DNA.

### ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Ο προσδιορισμός των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (HLA) γινόταν στο παρελθόν με εξέταση λεμφοκυτταροτοξικότητας. Ωστόσο, η συγκεκριμένη εξέταση

έχει αντικατασταθεί από τεχνικές τυποποίησης DNA με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) λόγω του ποσοστού σφαλμάτων της και της έλλειψης ανάλυσης σε επίπεδο αλληλόμορφων. Στις περισσότερες τεχνικές με βάση PCR, η διεργασία PCR χρησιμοποιείται μόνο ως βήμα ενίσχυσης του επιθυμητού DNA στόχου και απαιτείται ένα επιπλέον βήμα μετά την ενίσχυση για τη διάκριση μεταξύ των διαφορετικών αλληλόμορφων. Αντίθετα, στη μεθοδολογία PCR-SSP (sequensce-specific primer, εκκινητής συγκεκριμένων αλληλουχιών), η διάκριση μεταξύ των διαφορετικών αλληλόμορφων λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια

της διεργασίας PCR. Αυτό συντομεύει και απλοποιεί το βήμα μετά την ενίσχυση σε ένα απλό βήμα ανίχνευσης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Τα αποτελέσματα της εξέτασης SSP είναι είτε θετικά είτε αρνητικά, γεγονός που καταργεί την ανάγκη για περίπλοκη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η ανάλυση τυποποίησης της τεχνικής PCR-SSP είναι υψηλότερη από άλλες τεχνικές τυποποίησης με βάση PCR, καθώς κάθε ζεύγος εκκινητών καθορίζει δύο μοτίβα αλληλουχίας που βρίσκονται σε θέση *cis*, δηλ. στο ίδιο χρωμόσωμα. Επιπλέον, λόγω της συνθετικής

φύσης των αντιδραστηρίων SSP, η σταθερότητα έχει βελτιωθεί και η παραλλαγή από παρτίδα σε παρτίδα έχει μειωθεί.

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η μεθοδολογία PCR-SSP βασίζεται στην αρχή ότι στην αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται πιο αποτελεσματικοί πλήρως ή μερικώς συμπληρωματικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές χωρίς ασυμφωνίες του άκρου 3', παρά μη ταυτιζόμενοι εκκινητές από θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες χαμηλής πιστότητας (χωρίς ιδιότητες διορθωτικής ανάγνωσης - proofreading). Τα ζεύγη εκκινητών είναι σχεδιασμένα ώστε να υβριδίζονται μόνο σε συγκεκριμένα αλληλόμορφα ή ομάδα(-ες) αλληλόμορφων, ανάλογα με τον απαιτούμενο βαθμό ανάλυσης της τυποποίησης. Υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες PCR, τα ζεύγη εκκινητών που υβριδίζονται πλήρως ή μερικώς επιτρέπουν την πραγματοποίηση της ενίσχυσης, δηλ. θετικό αποτέλεσμα, ενώ τα μη ταυτιζόμενα ζεύγη εκκινητών δεν επιτρέπουν την πραγματοποίηση της ενίσχυσης, δηλ. αρνητικό αποτέλεσμα.

Μετά τη διεργασία PCR, τα ενισχυμένα τμήματα DNA διαχωρίζονται βάσει μεγέθους π.χ. με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και οπτικοποιούνται με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, καταγράφονται με φωτογράφιση και ερμηνεύονται. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων PCR-SSP βασίζεται στην παρουσία ή απουσία συγκεκριμένου(-ων) προϊόντος(-ων) PCR. Το σχετικό μέγεθος του(των) συγκεκριμένου(-ων) προϊόντος(-ων) PCR μπορεί να είναι

χρήσιμο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μεθοδολογία PCR-SSP για το HLA περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον O. Olerup το 1991 και το 1992<sup>1,2</sup>.

Καθώς η διεργασία PCR μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από διάφορους παράγοντες (π.χ. λάθη στη χρήση της πιπέτας, πολύ χαμηλή συγκέντρωση DNA, κακή ποιότητα DNA, παρουσία αναστολέων PCR, ακρίβεια θερμοκυκλοποιητή), σε κάθε αντίδραση PCR περιλαμβάνεται ένα ζεύγος εκκινητών εσωτερικού θετικού ελέγχου<sup>2</sup>. Το ζεύγος εκκινητών εσωτερικού θετικού ελέγχου υβριδίζεται στις διατηρηθείσες περιοχές του γονιδίου της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης, η οποία είναι παρούσα σε όλα τα δείγματα ανθρώπινου DNA. Παρουσία ενός συγκεκριμένου προϊόντος PCR ενός ή περισσότερων αλληλόμορφων HLA, το προϊόν της ζώνης εσωτερικού θετικού ελέγχου μπορεί να είναι ασθενές ή να απουσιάζει. Τα αμπλικόνια που δημιουργούνται από τα συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών HLA εμφανίζονται κοντύτερα από τα αμπλικόνια του ζεύγους εκκινητών θετικού εσωτερικού ελέγχου, αλλά μακρύτερα από τους μη συγχωνευμένους εκκινητές (βλ. Αναμενόμενες τιμές).

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### A. Ταυτοποίηση

Τα κιτ τυποποίησης Olerup SSP® περιέχουν αποξηραμένους, προβελτιστοποιημένους εκκινητές ειδικών αλληλουχιών για ενίσχυση PCR των αλληλόμορφων HLA και του γονιδίου της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης, κύριο μίγμα PCR με Taq πολυμεράση («Master Mix»), αυτοκόλλητα σφραγίσματα PCR και το βασικό φυλλάδιο με τις Οδηγίες χρήσης.

Τα διαλύματα εκκινητών είναι προκλασματοποιημένα και αποξηραμένα σε διαφορετικά βοθρία 0,2 ml κομμένων δίσκων PCR με λεπτά τοιχώματα. Κάθε βοθρίο του δίσκου περιέχει ένα διάλυμα αποξηραμένων εκκινητών που αποτελείται από ένα συγκεκριμένο μίγμα εκκινητών, π.χ. εκκινητές με ειδικότητα για αλληλόμορφα και ομάδες HLA, καθώς και ένα ζεύγος εκκινητών θετικού εσωτερικού ελέγχου που υβριδίζεται στις μη αλληλομορφικές αλληλουχίες και είναι έτοιμα για την προσθήκη του δείγματος DNA, κύριου μίγματος και H<sub>2</sub>O.

Οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι για βέλτιστη ενίσχυση PCR, εφόσον χρησιμοποιείται το κύριο μίγμα και το συνιστώμενο πρόγραμμα κυκλοποίησης DNA (βλ. Προγραμματισμός του θερμοκυκλοποιητή).

Οι πίνακες ειδικότητας και ερμηνείας για κάθε συγκεκριμένη παρτίδα και το φύλλο εργασιών για τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα HLA που ενισχύονται από

κάθε μίγμα εκκινητών παρέχονται στον ιστότοπο  
<https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/>.

**B. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις**

1. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
2. Αυτό το προϊόν δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως αποκλειστική βάση για τη λήψη κλινικών αποφάσεων.
3. Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου: Όλα τα προϊόντα αίματος θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά. Καμία γνωστή μέθοδος εξέτασης δεν μπορεί να διασφαλίσει ότι τα προϊόντα που προέρχονται από ανθρώπινο αίμα δεν μεταδίδουν μολυσματικούς παράγοντες.
4. Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου: Το βρωμιούχο αιθίδιο που χρησιμοποιείται για τη χρώση του DNA στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι καρκινογόνο. Ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με ατομικό προστατευτικό εξοπλισμό.
5. Προσοχή: Κατά την επισκόπηση ή τη φωτογράφιση πηκτωμάτων φοράτε προστατευτικά ματιών με φίλτρο κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και μην κοιτάτε απευθείας στην πηγή UV.
6. Οι πιπέτες και ο άλλος εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για χειρισμό **μετά** την PCR **δεν** πρέπει να χρησιμοποιείται για χειρισμό **πριν** από την PCR.
7. Για λεπτομερείς πληροφορίες, βλ. φυλλάδιο δεδομένων ασφαλείας (<http://www.labproducts.caredx.com>).

**Γ. Οδηγίες χρήσης**

Βλ. Οδηγίες χρήσης.

**Δ. Οδηγίες φύλαξης**

Φυλάσσετε τα υλικά του κιτ σε σκοτεινό χώρο και στη θερμοκρασία που αναγράφεται στις ετικέτες της συσκευασίας.

Χρησιμοποιείτε πριν από την Ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες της συσκευασίας.

**Ε. Καθαρισμός ή επεξεργασία που απαιτείται για τη χρήση**

Βλ. Οδηγίες χρήσης.

**ΣΤ. Ενδείξεις αστάθειας**

1. Μη χρησιμοποιείτε δίσκους εκκινητών με ρωγμές στα βοθρία ή ζημιές στο άνω χείλος των βοθρίων, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει εξάτμιση κατά την ενίσχυση PCR. Μη χρησιμοποιείτε ταινίες πωμάτων PCR με ρωγμές, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει εξάτμιση κατά την ενίσχυση PCR.
2. Τα σφαιρίδια στα βοθρία θα πρέπει να έχουν κόκκινο χρώμα. Εάν τα σφαιρίδια έχουν αποχρωματιστεί και πλέον έχουν κίτρινο χρώμα, αυτό μπορεί να σημαίνει αλλοίωση.

3. Το κύριο μίγμα θα πρέπει να έχει κόκκινο έως μωβ χρώμα. Εάν έχει αποχρωματιστεί και πλέον έχει από κίτρινο έως πορτοκαλί χρώμα, αυτό μπορεί να σημαίνει αλλοίωση.

## ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΟΡΓΑΝΑ

### A. Όργανο

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένας θερμικός κυκλοποιητής με τις ακόλουθες ελάχιστες προδιαγραφές:

- θερμαινόμενο καπάκι με θερμοκρασία 104°C για λειτουργία χωρίς έλαια
- μονάδα δειγμάτων (αλουμίνιο, άργυρος ή επιχρυσωμένος άργυρος) για χρήση με πλάκα PCR 96 βοθρίων ή σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml με λεπτά τοιχώματα
- Τα κιτ Olerup SSP έχουν επικυρωθεί στους ακόλουθους κυκλοποιητές.

Συνιστώμενοι ρυθμοί κλιμάκωσης:

- GeneAmp 9700: GeneAmp 9700 κυκλοποιητής που έχει ρυθμιστεί στη λειτουργία 9600. Αυτό αντιστοιχεί σε **ανοδικό ρυθμό κλιμάκωσης δείγματος** 1,6 °C/s και **καθοδικό** 0,8 °C/s.
- ProFlex μπλοκ 1x96 βοθρίων: Ο ProFlex PCR κυκλοποιητής με ρυθμό κλιμάκωσης μπλόκ 3,0 °C/s (κάθε στάδιο 3,0°C/s). **Ρυθμός κλιμάκωσης μπλόκ** 3,0 °C/s, αντιστοιχεί σε ανοδικό ρυθμό κλιμάκωσης δείγματος 1,52 °C/s και καθοδικό 1,36 °C/s.
- ProFlex μπλοκ 2x96 βοθρίων: Ο ProFlex PCR κυκλοποιητής με ρυθμό κλιμάκωσης μπλόκ 3,0 °C/s (κάθε στάδιο 3,0°C/s). **Ρυθμός κλιμάκωσης μπλόκ** 3,0 °C/s, αντιστοιχεί σε ανοδικό ρυθμό κλιμάκωσης δείγματος 1,9 °C/s και καθοδικό 1,6 °C/s.

**Σημείωση: Ρυθμοί κλιμάκωσης υψηλότεροι από αυτόν που περιγράφεται μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα τυποποίησης. Σημειώστε επίσης ότι η επίδραση στις τυποποιήσεις ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών μη επικυρωμένων κυκλοποιητών, ανάλογα με τις ρυθμίσεις.**

- εύρος θερμοκρασίας από 4,0°C έως 99,9°C
- ακρίβεια θερμοκρασίας  $\pm 0,25^\circ\text{C}$  στο εύρος 35-99,9°C
- ομοιομορφία θερμοκρασίας στη μονάδα δειγμάτων  $\leq 0,75^\circ\text{C}$  στο εύρος 55-95°C
- βαθμονόμηση θερμοκρασίας βάσει προτύπου αναφοράς (δηλ. NIST)

**Οδηγίες χρήσης**  
**Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® με Taq πολυμεράση**

Προγραμματίστε το θερμικό κυκλοποιητή χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους κυκλοποίησης PCR της ενότητας Β παρακάτω.

Για πληροφορίες σχετικά με συγκεκριμένο θερμικό κυκλοποιητή ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του κατασκευαστή. Οι θερμικοί κυκλοποιητές θα πρέπει να βαθμονομούνται σύμφωνα με τους κανόνες πιστοποίησης της ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) ή της EFI (European Federation of Immunogenetics).

Προγραμματίστε το θερμικό κυκλοποιητή πριν ξεκινήσετε να ακολουθείτε τις Οδηγίες χρήσης που περιγράφονται παρακάτω.

**Β. Παράμετροι κυκλοποίησης PCR**

- |    |                    |      |          |                            |
|----|--------------------|------|----------|----------------------------|
| 1. | 1 κύκλος           | 94°C | 2 λεπτά  | αποδιάταξη                 |
| 2. | 10 κύκλοι          | 94°C | 10 δευτ. | αποδιάταξη                 |
|    |                    | 65°C | 60 δευτ. | υβριδισμός και επέκταση    |
| 3. | 20 κύκλοι          | 94°C | 10 δευτ. | αποδιάταξη                 |
|    |                    | 61°C | 50 δευτ. | υβριδισμός                 |
|    |                    | 72°C | 30 δευτ. | επέκταση                   |
| 4. | Τέλος - συγκράτηση | RT   |          | Εάν λιγότερο από 8 ώρες    |
|    |                    | 4°C  |          | Εάν περισσότερο από 8 ώρες |

Συνολικός όγκος αντίδρασης σε κάθε βοθρίο, 10 μλ.

Οι ίδιες παράμετροι PCR χρησιμοποιούνται σε όλα τα κιτ *Olerup SSP®*.

**ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Για την τυποποίηση SSP απαιτείται εκχυλισμένο DNA, υψηλής καθαρότητας. Τα δείγματα DNA προς χρήση για την τυποποίηση HLA μέσω PCR-SSP θα πρέπει να εναιωρούνται εκ νέου σε dH<sub>2</sub>O. Ο λόγος A<sub>260/280</sub> θα πρέπει να είναι 1,6 – 2,0 βάσει φασματοφωτομετρίας UV για βέλτιστη οπτικοποίηση ζώνης κατά την ηλεκτροφόρηση.

Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN. Ως υλικό έναρξης θα πρέπει να χρησιμοποιείται αίμα με ACD.

Εναλλακτικά, το DNA μπορεί να εκχυλιστεί με οποιαδήποτε προτιμώμενη μέθοδο που να δίνει DNA υψηλής καθαρότητας. Όταν χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι, η συγκέντρωση DNA θα πρέπει να προσαρμόζεται σε 30 ng/μl. **Μην χρησιμοποιείτε ηπαρινισμένο αίμα με αυτές τις μεθόδους.**

Συνιστώμενη συγκέντρωση DNA με χρήση:

DNA εκχυλισμένο με EZ1, 15 ng/μl.

DNA εκχυλισμένο με άλλες μεθόδους, 30 ng/μl.

Οι συγκεντρώσεις άνω των 50 ng/μl αυξάνουν τον κίνδυνο μη ειδικής ενίσχυσης και ασθενών επιπλέον ζωνών, ιδιαίτερα για τυποποιήσεις SSP υψηλής ανάλυσης HLA κατηγορίας I. Εάν χρειάζεται, αραιώστε το εκχυλισμένο DNA σε dH<sub>2</sub>O.

**Τα δείγματα DNA δεν θα πρέπει να εναιωρούνται εκ νέου σε διαλύματα που περιέχουν χηλικούς παράγοντες, όπως το EDTA, σε συγκέντρωση άνω του 0,5 mM.**

Τα δείγματα DNA μπορούν να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την εκχύλιση ή να φυλάσσονται στους +4°C για έως και 2 εβδομάδες χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στα αποτελέσματα. Τα δείγματα DNA μπορούν να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -20°C ή χαμηλότερη για 9 μήνες. Η καθαρότητα και η συγκέντρωση των δειγμάτων εκχυλισμένου DNA που έχουν φυλαχθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα θα πρέπει να ελέγχονται πριν από την τυποποίηση HLA για να διαπιστώνεται εάν οι σχετικές τιμές είναι αποδεκτές.

Η αποστολή των δειγμάτων DNA θα πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία +4°C ή χαμηλότερη για να διατηρείται η ακεραιότητά τους κατά τη μεταφορά.

**ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ****A. Παρεχόμενα υλικά**

1. Δίσκοι εκκινήτων *Olerup* SSP®.
2. Κύριο μίγμα (κατάλληλος όγκος για τους δίσκους του κιτ). Για όλα τα κιτ *Olerup* SSP® χρησιμοποιείται το ίδιο κύριο μίγμα.
3. Αυτοκόλλητα σφραγίσματα PCR (κατάλληλος αριθμός για τους δίσκους του κιτ).
4. Βασικό φυλλάδιο με τις Οδηγίες χρήσης.

**B. Απαιτούμενα αλλά μη παρεχόμενα υλικά**

1. Κιτ/εξοπλισμός απομόνωσης DNA
2. Φασματοφωτόμετρο UV
3. Συσκευές πιπέτας. Συνιστούμε ηλεκτρονικό διανεμητή ενός καναλιού με δυνατότητα διανομής 10 µl κλασμάτων για προσθήκη του μίγματος DNA-κύριου μίγματος-dH<sub>2</sub>O στα βοθρία του δίσκου.
4. Ρύγχη πιπετών μίας χρήσης
5. Σωληνάρια πολυπροπυλενίου
6. Αναμίκτης περιδίνησης
7. Μικροφυγοκεντρητής
8. Βάση δίσκων PCR
9. Θερμικός κυκλοποιητής με θερμαινόμενο καπάκι για PCR με διαμόρφωση 96 βοθρίων, μεταβολή θερμοκρασίας στη μονάδα θέρμανσης  $\leq 0,75^{\circ}\text{C}$  και δίσκο/ διάταξη συγκράτησης για βοθρία αντίδρασης 0,2 ml με λεπτά τοιχώματα
10. Φούρνος μικροκυμάτων ή θερμαντική βάση για τη θέρμανση των διαλυμάτων αгарόζης
11. Αγαρόζη για ηλεκτροφόρηση. π.χ. Seakem LE της FMC
12. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5x TBE (το ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE είναι 89 mM Tris-βορικό, 2 mM δινατριούχο EDTA, pH 8,0)
13. Φιάλη βρωμιούχου αιθιδίου με σταγονόμετρο, Αρ. προϊόντος 103.301-10
14. Συσκευή πιπέτας φόρτωσης πηκτώματος. Για τη φόρτωση πηκτώματος συνιστούμε πιπέτα 8 καναλιών με ρυθμιζόμενο όγκο 5-25 µl
15. Δείκτης μεγέθους DNA για κάλυψη εύρους 50-1.000 ζεύγη βάσεων, π.χ. κλίμακα 100 ζευγών βάσεων, Δείκτης Μεγέθους DNA Αρ. προϊόντος 103.202-100 ή Δείκτης μεγέθους DNA για σύντομη επεξεργασία πηκτωμάτων 103.203-100
16. Συσκευή ηλεκτροφόρησης/παροχή ενέργειας
17. Διαφανοσκόπιο UV
18. Φωτογραφικό ή απεικονιστικό σύστημα καταγραφής

**Γ. Διαδικασία βήμα προς βήμα**

Βλ. Οδηγίες χρήσης.

**ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ****A. Προετοιμασία δείγματος**

1. Καθαρίστε το γονιδιωματικό DNA από το δείγμα λευκών αιμοσφαιρίων με μέθοδο της επιλογής σας, βλ. Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων παραπάνω.
2. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία και τη φύλαξη των δειγμάτων, βλ. Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων παραπάνω.
3. Πραγματοποιήστε ενίσχυση PCR στο δείγμα κεκαθαρμένου DNA χρησιμοποιώντας ένα δίσκο τυποποίησης *Olerup* SSP® ή φυλάξτε το δείγμα DNA μέχρι να είστε έτοιμοι να πραγματοποιήσετε την τυποποίηση.

**B. Προετοιμασία αντιδραστηρίου/εξοπλισμού**

1. Προγραμματίστε ένα θερμικό κυκλοποιητή ώστε να εκτελέσει το πρόγραμμα PCR της *Olerup* SSP®, βλ. Απαιτούμενα όργανα - Παράμετροι κυκλοποίησης PCR παραπάνω.
2. Παρασκευάστε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, βλ. ενότητα Γ – **Προετοιμασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα** παρακάτω).

**Γ. Προετοιμασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα**

Για σύστημα πηκτωμάτων 96 *Olerup* SSP® (Αρ. προϊόντος 103.101-01)

1. Ρύθμιση
  - Οριζοντιώστε το θάλαμο χύτευσης για 1 πήκτωμα (Αρ. προϊόντος 103.101-31) ή το θάλαμο χύτευσης για 3 πηκτώματα (Αρ. προϊόντος 103.101-33) χρησιμοποιώντας την αεροστάθμη και τα τρία σκέλη ρυθμιζόμενου ύψους.
  - Τοποθετήστε το(τους) δίσκο(-ους) πηκτωμάτων στο θάλαμο χύτευσης.
2. Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 2% (w/v)

Χρησιμοποιήστε ένα υψηλής ποιότητας πήκτωμα αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση, με δυνατότητα ανάλυσης τμημάτων DNA 50-2.000 ζευγών βάσεων.

  - Σε μια γυάλινη φιάλη 500 ml, προσθέστε σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος 10x TBE (Tris-βορικό EDTA) 150 ml αποσταγμένου νερού και 2 g αγαρόζης.
  - Διαλύστε την αγαρόζη βράζοντάς τη σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να δημιουργηθεί ένα ομογενές διάλυμα 100 ml.
  - Αφήστε το αραιωμένο διάλυμα πηκτώματος να κρυώσει στους 60°C, π.χ. σε θάλαμο θέρμανσης.
  - Πριν από τη χύτευση, πραγματοποιήστε χρώση του πηκτώματος με βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml), 5 μl ανά 100 ml διαλύματος πηκτώματος. Για μεγαλύτερη ευκολία στο χειρισμό, χρησιμοποιήστε τις φιάλες βρωμιούχου αιθιδίου με σταγονόμετρο της εταιρίας μας (Αρ. προϊόντος 103.301-10). **Σημείωση: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι**

**καρκινογόνο. Ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με ατομικό προστατευτικό εξοπλισμό.**

- Μεταφέρετε 100 ml διαλύματος πηκτώματος στο δίσκο πηκτώματος στο θάλαμο χύτευσης. Τοποθετήστε 6 κτένες πηκτώματος (Αρ. προϊόντος 103.101-21) στις υποδοχές του δίσκου πηκτώματος.
- Αφήστε το πήκτωμα να σταθεροποιηθεί για 15 λεπτά.
- Μεταφέρετε 750 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5x TBE στη δεξαμενή πηκτώματος. Βυθίστε το δίσκο πηκτώματος στο κουτί πηκτώματος και αφαιρέστε με προσοχή τις 6 κτένες πηκτώματος ανασηκώνοντάς τις.

Όταν χρησιμοποιείτε άλλα συστήματα ηλεκτροφόρησης, ακολουθείτε τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή. Για να χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα με τα κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP®, πρέπει να έχει τη δυνατότητα ανάλυσης προϊόντων PCR με εύρος μεγέθους 50-1100 ζευγών βάσεων.

#### **Δ. Διαδικασία βήμα προς βήμα**

1. Αφαιρέστε από την ενδεδειγμένη θερμοκρασία φύλαξης: τον κατάλληλο αριθμό δειγμάτων DNA, το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών και τον όγκο κύριου μίγματος που απαιτείται για το(τα) δείγμα(-τα) DNA ή το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών της επιλογής σας. Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C).

**Για όλα τα κιτ Olerup SSP® χρησιμοποιείται το ίδιο κύριο μίγμα.**

2. Αναμίξτε σύντομα το(τα) δείγμα(-τα) DNA με περιδίνηση.
3. Τοποθετήστε το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών σε μια βάση δίσκων PCR.
4. **Κιτ χαμηλής και υψηλής ανάλυσης**
  - Περιδινήστε το κύριο μίγμα πριν λάβετε κλάσματα.
  - Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου κύριο μίγμα και dH<sub>2</sub>O σε ένα σωληνάριο 0,5 ml ή 1,5 ml. (για τις κατάλληλες ποσότητες βλ. πίνακα 1 παρακάτω.)
  - Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρική για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.
  - Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε 8 μl του μίγματος κύριου μίγματος- dH<sub>2</sub>O και 2 μl dH<sub>2</sub>O στο βοηθίο αρνητικού ελέγχου, δηλ. στο βοηθίο με τα ζεύγη εκκινητών αρνητικού ελέγχου του δίσκου εκκινητών.
  - Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου το δείγμα DNA στο υπόλοιπο μίγμα κύριου μίγματος-dH<sub>2</sub>O. (για τις κατάλληλες ποσότητες βλ. πίνακα 1 παρακάτω.)
  - Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρική για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.

**Οδηγίες χρήσης**  
**Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® με Ταq πολυμεράση**

- Χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρονικό διανεμητή ενός καναλιού, τοποθετήστε ένα κλάσμα 10 μl του μίγματος αντίδρασης δείγματος σε κάθε βοθρίο, εκτός από το βοθρίο αρνητικού ελέγχου, του δίσκου εκκινητών.

**Πίνακας 1:** Όγκοι των συστατικών που απαιτούνται ανά εξέταση για διαφορετικούς αριθμούς βοθρίων με χρήση κύριου μίγματος.

| Αρ. βοθρίων ανά εξέταση | Όγκος κύριου μίγματος (μl) | Όγκος δείγματος DNA (μl) | Όγκος dH <sub>2</sub> O (μl) | Αρ. βοθρίων ανά εξέταση | Όγκος κύριου μίγματος (μl) | Όγκος δείγματος DNA (μl) | Όγκος dH <sub>2</sub> O (μl) |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 2                       | 12                         | 8                        | 20                           | 25                      | 87                         | 58                       | 145                          |
| 3                       | 15                         | 10                       | 25                           | 26                      | 90                         | 60                       | 150                          |
| 4                       | 18                         | 12                       | 30                           | 27                      | 93                         | 62                       | 155                          |
| 5                       | 21                         | 14                       | 35                           | 28                      | 96                         | 64                       | 160                          |
| 6                       | 24                         | 16                       | 40                           | 29                      | 99                         | 66                       | 165                          |
| 7                       | 27                         | 18                       | 45                           | 30                      | 102                        | 68                       | 170                          |
| 8                       | 30                         | 20                       | 50                           | 31                      | 105                        | 70                       | 175                          |
| 9                       | 33                         | 22                       | 55                           | 32                      | 108                        | 72                       | 180                          |
| 10                      | 36                         | 24                       | 60                           | 36                      | 126                        | 84                       | 210                          |
| 11                      | 39                         | 26                       | 65                           | 40                      | 138                        | 92                       | 230                          |
| 12                      | 42                         | 28                       | 70                           | 44                      | 150                        | 100                      | 250                          |
| 13                      | 45                         | 30                       | 75                           | 48                      | 162                        | 108                      | 270                          |
| 14                      | 48                         | 32                       | 80                           | 52                      | 174                        | 116                      | 290                          |
| 15                      | 51                         | 34                       | 85                           | 56                      | 186                        | 124                      | 310                          |
| 16                      | 54                         | 36                       | 90                           | 60                      | 198                        | 132                      | 330                          |
| 17                      | 60                         | 40                       | 100                          | 64                      | 210                        | 140                      | 350                          |
| 18                      | 63                         | 42                       | 105                          | 68                      | 228                        | 152                      | 380                          |
| 19                      | 66                         | 44                       | 110                          | 72                      | 240                        | 160                      | 400                          |
| 20                      | 69                         | 46                       | 115                          | 76                      | 252                        | 168                      | 420                          |
| 21                      | 72                         | 48                       | 120                          | 80                      | 264                        | 176                      | 440                          |
| 22                      | 75                         | 50                       | 125                          | 84                      | 276                        | 184                      | 460                          |
| 23                      | 78                         | 52                       | 130                          | 88                      | 288                        | 192                      | 480                          |
| 24                      | 81                         | 54                       | 135                          | 92                      | 300                        | 200                      | 500                          |
|                         |                            |                          |                              | 96                      | 312                        | 208                      | 520                          |

Οι συνιστώμενοι όγκοι που αναφέρονται παραπάνω περιλαμβάνουν τον όγκο για την αντιστάθμιση των διακυμάνσεων της πιπέτας και των απωλειών υγρού στα εσωτερικά τοιχώματα των σωληναρίων.

**5. Κιτ Combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ και DQA-DQB-DR Enhanced και κιτ υψηλής ανάλυσης HLA-C για κοινά αλληλόμορφα**

- Περιδινήστε το κύριο μίγμα.
- Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου 520 μl dH<sub>2</sub>O στο παρεχόμενο σωληνάριο 1,5 ml που περιέχει 312 μl κύριου μίγματος.
- Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρητή για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.

Οδηγίες χρήσης  
Κιτ τυποποίησης HLA *Olerup* SSP® με Taq πολυμεράση

- Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε 8 μl του μίγματος κύριου μίγματος- dH<sub>2</sub>O και 2 μl dH<sub>2</sub>O στο βοηθίο αρνητικού ελέγχου αρ. 96, δηλ. στο βοηθίο με τα ζεύγη εκκινητών αρνητικού ελέγχου.
- Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου 206 μl δείγμα DNA στο υπόλοιπο μίγμα κύριου μίγματος-dH<sub>2</sub>O.
- Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρητή για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.
- Χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρονικό διανεμητή ενός καναλιού, τοποθετήστε ένα κλάσμα 10 μl του μίγματος αντίδρασης δείγματος σε κάθε βοηθίο, εκτός από το βοηθίο αρνητικού ελέγχου αρ. 96, του δίσκου εκκινητών.

**Σημαντικό:**

Βεβαιωθείτε ότι έχετε τοποθετήσει το δείγμα πάνω από τους εκκινητές (αποξηραμένοι στον πυθμένα κάθε βοηθίου του δίσκου εκκινητών) για την αποφυγή επιμόλυνσης μεταξύ των βοηθίων. Ακουμπήστε το εσωτερικό τοίχωμα του σωληναρίου με το ρύγχος της πιπέτας ώστε να επιτρέψετε στο δείγμα να κυλήσει προς τον πυθμένα του βοηθίου. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα δείγματα έχουν κυλήσει προς τον πυθμένα κάθε βοηθίου. Εάν όχι, κτυπήστε ελαφρά το δίσκο πάνω στην επιφάνεια του πάγκου για να βρεθούν όλα τα δείγματα στον πυθμένα του βοηθίου πριν ξεκινήσετε την PCR.

6. Καλύψτε το/τους δίσκο/δίσκους εκκινητών με τα παρεχόμενα αυτοκόλλητα σφραγίσματα PCR. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα βοηθία αντίδρασης έχουν καλυφθεί πλήρως, ώστε να αποφευχθεί η απώλεια λόγω εξάτμισης κατά την διάρκεια της ενίσχυσης PCR. Για την αποφυγή της εξάτμισης κατά την διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης μπορείτε να τοποθετήσετε πάνω από τα αυτοκόλλητα σφραγίσματα PCR επίθεμα συμπίεσης *Olerup* SSP® (Αρ. προϊόντος 103.505-06).
7. Τοποθετήστε το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών στο θερμικό κυκλοποιητή με έναν κατάλληλο προσαρμογέα σωληναρίων-δίσκων. Μην αφήσετε να περάσουν περισσότερα από 5 λεπτά μεταξύ της προετοιμασίας της PCR και της θερμικής κυκλοποίησης.
8. Εισάγετε τον αριθμό προγράμματος *Olerup* SSP®. Ορίστε όγκο αντίδρασης 10 μl.
9. Ξεκινήστε το πρόγραμμα PCR. Η διάρκεια του προγράμματος είναι 1 ώρα και 20 λεπτά περίπου.
10. Αφαιρέστε το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών από το θερμικό κυκλοποιητή. Ελέγξτε το δίσκο PCR για να βεβαιωθείτε ότι υπάρχει ο ίδιος περίπου όγκος υγρού σε κάθε βοηθίο PCR. Ηλεκτροφορήστε τα δείγματα, βλ. ενότητα E – Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα παρακάτω. Ερμηνεύστε τα αποτελέσματα τυποποίησης βάσει των **Πινάκων ερμηνείας και**

ειδικότητας ή του Φύλλου εργασίας για τη συγκεκριμένη παρτίδα, βλ. Αναμενόμενες τιμές παρακάτω.

#### Ε. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα

1. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, προσανατολίστε το δίσκο εκκινητών και το κουτί πηκτώματος. Η σειρά των βοθρίων είναι από αριστερά προς τα δεξιά και από επάνω προς τα κάτω.
2. Αφαιρέστε προσεκτικά τα καλύμματα ταινίας προσέχοντας να μη χυθούν τα προϊόντα PCR.
3. Φορτώστε τα προϊόντα PCR με τη σωστή σειρά στο πήκτωμα αγαρόζης 2%. (Δεν χρειάζεται προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης πηκτώματος.) Για τη φόρτωση του πηκτώματος συνιστάται η χρήση πιπέτας 8 καναλιών.
4. Φορτώστε ένα δείκτη μεγέθους DNA (κλίμακα 100 ζευγών βάσεων, Δείκτης μεγέθους DNA, Αρ. προϊόντος 103.202-100 ή Δείκτης μεγέθους DNA για σύντομη επεξεργασία πηκτωμάτων, Αρ. προϊόντος 103.203-100) σε ένα βοθρίο ανά σειρά.
5. Καλύψτε το κουτί πηκτώματος με το καπάκι του
6. Ηλεκτροφορέστε το πήκτωμα σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5x TBE, χωρίς επανακυκλοφορία του ρυθμιστικού διαλύματος, για 15-20 λεπτά στα 8-10 V/cm.
7. Μεταφέρετε το δίσκο πηκτώματος με το πήκτωμα σε ένα διαφανοσκόπιο UV.
8. Φωτογραφίστε το πήκτωμα με ή χωρίς το δίσκο πηκτώματος.
9. Επισημάνετε τη φωτογραφία σύμφωνα με τους κανόνες του εργαστηρίου.

#### ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της ASHI για την εξέταση HLA, σε κάθε προετοιμασία PCR πρέπει να περιλαμβάνεται ένας αρνητικός δείκτης ελέγχου (επιμόλυνσης). (Standards for Accredited Laboratories, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Final Revised Standards Approved by the ASHI Board of Directors: August 31, 2007, Guidance Final Version January 2008). Ένα βοθρίο αρνητικού ελέγχου περιλαμβάνεται σε όλα τα κιτ από τον αριθμό lot 01V και έπειτα (για το κιτ DQ low από τον αριθμό lot 06Y και έπειτα).

Ανατρέξτε στην ενότητα Ερμηνεία πηκτώματος στη σελίδα 14.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα φύλλα επικύρωσης κυτταρικών σειρών για κάθε συγκεκριμένη παρτίδα και το πιστοποιητικό ανάλυσης παρέχονται ηλεκτρονικά στη διεύθυνση <https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/>.

#### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

1. Η διεργασία PCR-SSP απαιτεί υψηλά ελεγχόμενες συνθήκες εξέτασης ώστε να διασφαλίζεται επαρκής διακριτική ενίσχυση. Η διαδικασία που περιγράφεται στις Οδηγίες χρήσης πρέπει να τηρείται αυστηρά.

**Οδηγίες χρήσης**  
**Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® με Taq πολυμεράση**

2. Το δείγμα εκχυλισμένου DNA είναι το πρότυπο για τη συγκεκριμένη διεργασία ενίσχυσης PCR. Το καθαρισμένο DNA θα πρέπει να έχει λόγο  $A_{260/280}$  μεταξύ 1,6 και 2,0 για την επίτευξη βέλτιστης οπτικοποίησης ζώνης με την ηλεκτροφόρηση.
3. Όλα τα όργανα, π.χ. θερμικός κυκλοποιητής, συσκευές πιπέτας, πρέπει να βαθμονομούνται σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
4. Πληροφορίες για τη συγκεκριμένη παρτίδα υπάρχουν στο Ένθετο προϊόντος: Πληροφορίες για τη συγκεκριμένη παρτίδα και στο Φύλλο εργασίας για τη συγκεκριμένη παρτίδα.
5. Βάσει εξέτασης που έχει πραγματοποιηθεί, οι ακόλουθες ουσίες αξιολογήθηκαν με τρεις (3) μεθόδους εκχύλισης στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζουν την απόδοση της εξέτασης.

| Μέθοδος εκχύλισης        | Παρεμποδίζουσα ουσία | Παρεμποδίζουσα συγκέντρωση* |
|--------------------------|----------------------|-----------------------------|
| EZ1 DSP DNA Blood System | Χολερυθρίνη          | 200mg/L                     |
|                          | Αιμοσφαιρίνη         | 200g/L                      |
|                          | Τριγλυκερίδια        | 30g/L                       |
|                          | Πρωτεΐνες            | 110g/L                      |
| QIAamp DSP DNA Blood Kit | Χολερυθρίνη          | 200mg/L                     |
|                          | Αιμοσφαιρίνη         | 200g/L                      |
|                          | Τριγλυκερίδια        | 18,2g/L                     |
|                          | Πρωτεΐνες            | 77 - 96g/L                  |
| Μέθοδος Gentra PureGene  | Χολερυθρίνη          | 200mg/L                     |
|                          | Αιμοσφαιρίνη         | 200g/L                      |
|                          | Τριγλυκερίδια        | 18,2g/L                     |
|                          | Πρωτεΐνες            | 119 - 146g/L                |

6. Οι πλάκες PCR είναι φυσικά συμβατές με τους περισσότερους θερμικούς κυκλοποιητές της αγοράς. Βλ. πίνακα συμβατότητας θερμικών κυκλοποιητών παρακάτω.

*Σημείωση: Ο πίνακας προορίζεται για χρήση ως οδηγός μόνο. Για επικυρωμένους κυκλοποιητές ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις Οργάνων-Όργανο.*

| Πίνακας συμβατότητας     |                                      |
|--------------------------|--------------------------------------|
| Κατασκευαστής            | Θερμικός κυκλοποιητής                |
| Applied Biosystems       | GeneAmp 9700                         |
|                          | ProFlex 96-well                      |
|                          | ProFlex 2x96-well                    |
|                          | Veriti 0.2ml 96-well Block           |
|                          | GeneAmp 2700, 2720, 9600             |
| Agilent (Stratagene)     | SureCycler 8800                      |
|                          | RoboCycler                           |
|                          | Gradient Cycler                      |
|                          | Uno, Uno II                          |
| Biometra                 | T1 Thermocycler                      |
|                          | TGradient/TAdvanced                  |
|                          | TRobot                               |
|                          | TProfessional                        |
|                          | MJ Mini                              |
| Bio-Rad                  | T100                                 |
|                          | iCycler, MyCycler                    |
|                          | C1000, S1000                         |
|                          | PTC-2(xx)                            |
|                          | PTC-100 with 96-well block           |
| 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  |
|                          | PCR Express, Px2, PxE                |
| Thermo Scientific Hybaid | MultiBlock System & MBS              |
|                          | Omnigene, Omn-E                      |
|                          | GS1, GS4, GSX                        |
| Takara                   | TP 3000                              |

## ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

### A. Ανάλυση δεδομένων

Εξετάστε τη φωτογραφία του πηκτώματος με προσοχή και καθορίστε τις θετικές λωρίδες.

1. Σε περίπτωση ενίσχυσης συγκεκριμένου(-ων) αλληλόμορφου(-ων) HLA, θα φανεί σε μια λωρίδα πηκτώματος μια κοντύτερη ζώνη η οποία μετακινείται ταχύτερα. Αυτό υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα εξέτασης.
  - a. Καταγράψτε την παρουσία και την απουσία συγκεκριμένων προϊόντων PCR.

- b. Είναι χρήσιμο να παρακολουθείτε τα σχετικά μήκη των συγκεκριμένων προϊόντων PCR, όπως δίδονται στα ένθετα προϊόντος της συγκεκριμένης παρτίδας, κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πηκτώματος. Αρκετές λωρίδες έχουν δύο ή περισσότερα πιθανά μήκη συγκεκριμένων προϊόντων PCR. Αυτά τα βοηθία περιέχουν πολλαπλά ζεύγη εκκινητών που δημιουργούν προϊόντα PCR διαφορετικών μεγεθών ανάλογα με το(τα) αλληλόμορφο(-α) του DNA δείγματος.
  - c. Για να επιτύχετε την τυποποίηση HLA του DNA δείγματος, αντιστοιχίστε το μοτίβο των λωρίδων πηκτώματος με συγκεκριμένα προϊόντα PCR με τις πληροφορίες στους Πίνακες ερμηνείας και ειδικότητας της συγκεκριμένης παρτίδας.
2. Σε όλες τις λωρίδες πηκτώματος, εκτός από τη λωρίδα πηκτώματος αρνητικού ελέγχου, θα πρέπει να είναι ορατή μια λωρίδα εσωτερικού θετικού ελέγχου, η οποία υποδεικνύει επιτυχή ενίσχυση. Η λωρίδα εσωτερικού θετικού ελέγχου μπορεί να είναι ασθενής ή να απουσιάζει στις θετικές λωρίδες πηκτώματος.
- a. Καταγράψτε την παρουσία και τα σχετικά μήκη των ζωνών εσωτερικού θετικού ελέγχου. Οι ζώνες ελέγχου διαφορετικού μεγέθους θα βοηθήσουν στο σωστό προσανατολισμό της τυποποίησης καθώς και στην ταυτοποίηση του κιτ.
  - b. Η απουσία ζώνης εσωτερικού θετικού ελέγχου χωρίς συγκεκριμένο προϊόν PCR υποδεικνύει αποτυχία της αντίδρασης PCR.
    - i. Εάν ο προσδιορισμός των αλληλόμορφων HLA μπορεί να πραγματοποιηθεί παρά την αποτυχία της(των) αντίδρασης(-ων) PCR και η συγκεκριμένη αποτυχία δεν αλλάζει την αντιστοίχιση αλληλόμορφων, δεν χρειάζεται να επαναληφθεί η εξέταση.
    - ii. Εάν, ωστόσο, η αποτυχία της(των) αντίδρασης(-ων) PCR θα μπορούσε να αλλάξει την αντιστοίχιση αλληλόμορφων, ο προσδιορισμός πρέπει να επαναληφθεί.
3. Η παρουσία ειδικού προϊόντος PCR ή ζώνης εσωτερικού θετικού ελέγχου σε λωρίδα(-ες) αρνητικού ελέγχου υποδεικνύει επιμόλυνση με προϊόν(-α) PCR και ακυρώνει όλα τα αποτελέσματα της εξέτασης. Στη(στις) λωρίδα(-ες) αρνητικού ελέγχου μπορεί να παρατηρηθούν ολιγομερή εκκινητών μεγέθους από 40 έως 60 ζεύγη βάσεων. Αυτό δεν αντιπροσωπεύει επιμόλυνση.

## B. Ερμηνεία πηκτώματος

|                                      | Θετική<br>αντίδραση                                                               | Αρνητική<br>αντίδραση                                                             | Αποτυχημένη<br>αντίδραση<br>PCR                                                     |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Βοθρίο                               |  |  |  |
| Εσωτερική<br>ζώνη θετικού<br>ελέγχου |  |  |                                                                                     |
| Ειδική ζώνη                          |  |                                                                                   |                                                                                     |
| Ζώνη<br>εκκινητών                    |  |  |  |

1. Θα πρέπει να προστεθεί ένας δείκτης μεγέθους DNA (κλίμακα 100 ζευγών βάσεων, Δείκτης μεγέθους DNA, Αρ. προϊόντος 103.202-100 ή Δείκτης μεγέθους DNA για σύντομη επεξεργασία πηκτωμάτων, 103.203-100) σε ένα βοθρίο ανά σειρά του πηκτώματος ή σύμφωνα με τις τοπικές κατευθυντήριες γραμμές πιστοποίησης του εργαστηρίου.
2. Μπορεί να προκύψουν ζώνες μακρύτερα από τη ζώνη εσωτερικού θετικού ελέγχου. Αυτές οι ζώνες δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων τυποποίησης.
3. Οι εκκινητές που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί θα σχηματίσουν μια διάχυτη ζώνη μικρότερη από 50 ζεύγη βάσεων.
4. Μπορεί να παρατηρηθούν παραμορφώσεις ολιγομερών των εκκινητών. Αυτές έχουν μεγαλύτερο μήκος από τη ζώνη εκκινητών αλλά μικρότερο από τις ειδικές ζώνες.

## ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### Ποιοτικός έλεγχος παρτίδας ΚΙΤ

Κάθε διάλυμα εκκινητών ελέγχεται βάσει ενός πάνελ 48 δειγμάτων DNA από χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές του IHWG (International Histocompatibility Workshop and Conference). Βλ. Φύλλο(-α) ελέγχου κυτταρικής σειράς της συγκεκριμένης παρτίδας στο Ένθετο προϊόντος, Πληροφορίες για τη συγκεκριμένη παρτίδα.

### Μελέτη σύγκρισης μεθόδων 1

Σκοπός της πολυκεντρικής μελέτης ήταν η εκτίμηση της συμφωνίας μεταξύ του κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® DR Χαμηλής Ανάλυσης και του

δίσκου προσδιορισμού HLA DNA One Lambda Micro SSP™ σε τρία κλινικά εργαστήρια στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής.

Τα αναλυθέντα αποτελέσματα του κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® DR Χαμηλής Ανάλυσης και του δίσκου τυποποίησης HLA DNA One Lambda Micro SSP™ έδειξαν 98,4% (123 / 125, 95% CI: 94,3 – 99,8) συμφωνία όταν δύο Olerup αμφιλεγόμενα αποτελέσματα αντιμετωπίζονται ως ασύμφωνα. Η συμφωνία ήταν 100% (123 / 123, 95% CI: 97.1 – 100) όταν τα Olerup αμφιλεγόμενα αποτελέσματα δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση, αποτυπώνοντας κανονική κλινική πρακτική.

### Μελέτη σύγκρισης μεθόδων 2

Αυτή η μελέτη σχεδιάστηκε ώστε να επιδείξει συμφωνία των αποτελεσμάτων τυποποίησης των κιτ χαμηλής ανάλυσης αλληλόμορφων HLA (A, B, C, DQ), που ελήφθησαν με τα διερευνητικά κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® και τα κιτ αναφοράς One Lambda LABType SSO. Δείγματα ολικού αίματος με ACD συλλέχθηκαν από 95 άτομα και στάλθηκαν σε 3 κλινικά κέντρα στις Ηνωμένες Πολιτείες. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA και το κεκαθαρισμένο DNA που προέκυψε ελέγχθηκε με τη διερευνητική μέθοδο Olerup SSP® και τη μέθοδο αναφοράς Lambda LabType SSO HLA.

Η συνολική συμφωνία για τα αλληλόμορφα Κατηγορίας I ήταν 99,6% (278 / 279, 95% CI: 98,0 - 100). Για τα αλληλόμορφα Κατηγορίας II η συμφωνία ήταν 100% (94 / 94, 95% CI: 96,2 – 100).

### **Πίνακας 1**

Συνολική συμφωνία των αποτελεσμάτων Olerup SSP® και OneLambda SSO για αλληλόμορφα Κατηγορίας I και Κατηγορίας II.

| HLA θέση                           | Σύνολο    |                      |
|------------------------------------|-----------|----------------------|
|                                    | n/N       | % συμφωνία (95% CI)  |
| <b>A</b>                           | 95 / 95   | 100<br>(96,2 – 100)  |
| <b>B</b>                           | 90 / 90   | 100<br>(96,0 – 100)  |
| <b>C</b>                           | 93 / 94   | 98,9<br>(94,2 – 100) |
| <b>Όλες οι θέσεις Κατηγορίας I</b> | 278 / 279 | 99,6<br>(98,0 – 100) |
| <b>Θέσεις Κατηγορίας II (DQ)</b>   | 94 / 94   | 100<br>(96,2 – 100)  |

Αποτελέσματα μελέτης αναπαραγωγιμότητας των ΚΙΤ.

Αυτή η μελέτη συνέκρινε αποτελέσματα τυποποίησης HLA *Olerup* SSP® μεταξύ τριών HLA διαγνωστικών εργαστηρίων χρησιμοποιώντας έναν πίνακα 10 καλά χαρακτηρισμένων δειγμάτων DNA των οποίων τα αποτελέσματα ομοφωνίας συμπεριλαμβάνονται στην τράπεζα UCLA HLA DNA για αλληλόμορφα Κατηγορίας I (A, B και C), κοινά αλληλόμορφα Κατηγορίας II (DRB1\*, DRB3\*/DRB4\*/DRB5\* και DQB1\*) και λιγότερο κοινώς ερευνηθέντα αλληλόμορφα Κατηγορίας II (DQA1\*, DPA1\* και DPB1\*).

**Πίνακας 2: Σύνοψη των αποτελεσμάτων της μελέτης αναπαραγωγιμότητας των κιτ Olerup SSP® HLA**

| Τύπος HLA αλληλόμορφου                                                                         | Ακρίβεια τυποποίησης %<br>n/N<br>95% Διάστ. Εμπιστοσύνης (LL, UL) |                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                | Αμφιλεγόμενο αποτέλεσμα, το οποίο αντιμετωπίστηκε ως ασύμφωνο     | Αμφιλεγόμενο αποτέλεσμα, το οποίο αντιμετωπίστηκε ως ασαφές και αποκλείστηκε από την ανάλυση |
| Κατηγορία I Χαμηλή Ανάλυση<br>(A και B συνδυασμένα)                                            | 98,3<br>(59/60)<br>91,1, 100                                      | 100<br>(59/59)<br>93,9, 100                                                                  |
| Κατηγορία I Υψηλή Ανάλυση<br>(A, B και C συνδυασμένα)                                          | 94,7<br>(142/150)<br>89,8, 97,7                                   | 98,6<br>(142/144)<br>95,1, 99,8                                                              |
| Κατηγορία II Χαμηλή ανάλυση (DRB1* και DRB3*/DRB4*/DRB5*)                                      | 100<br>(60/60)<br>94,0, 100                                       | 100<br>(60/60)<br>94,0, 100                                                                  |
| Κατηγορία II Υψηλή Ανάλυση<br>– Κοινά αλληλόμορφα (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* και DQB1*)         | 98,3<br>(118/120)<br>94,1, 99,8                                   | 100<br>(118/118)<br>96,9, 100                                                                |
| Κατηγορία II Υψηλή Ανάλυση<br>Λιγότερο κοινώς ερευνηθέντα αλληλόμορφα (DQA1*, DPA1* και DPB1*) | 83,3<br>(75/90)<br>74,0, 90,4                                     | 86,2<br>(75/87)<br>77,2, 92,7                                                                |

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας πίνακας δέκα (10) δειγμάτων DNA με καλά χαρακτηρισμένα αποτελέσματα τυποποίησης HLA.

Οι χαμηλότερες συμφωνίες που παρατηρήθηκαν για τα λιγότερο κοινώς ερευνηθέντα Κλάσης II Υψηλής Ανάλυσης αλληλόμορφα αντανακλά τη

μεγαλύτερη αβεβαιότητα στα «αποτελέσματα ομοφωνίας» των δειγμάτων DNA UCLA, λαμβάνοντας υπόψιν τις ατελείς πληροφορίες αλληλουχιών που είναι διαθέσιμες για τα αλληλόμορφα DQA1\*, DPA1\* και DPB1\*. Για 9 από τα 11 ασύμφωνα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης αναπαραγωγιμότητας (DQA1\*0505 από την Olerup SSP® έναντι DQA1\*0501 «ομοφωνία τυποποίησης») και τα τρία κέντρα δοκιμών έφτασαν στο ίδιο αποτέλεσμα υποδεικνύοντας σταθερή απόδοση του κιτ Olerup DQA1\*.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. Τα τρέχοντα αλληλόμορφα HLA υπάρχουν στους ακόλουθους ιστοτόπους:
  - a. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla> or
  - b. <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>

### ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

| Πρόβλημα                                                                                   | Αιτία                                                                                                                                                   | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Απουσία ενίσχυσης (ούτε των τμημάτων εσωτερικού ελέγχου, ούτε συγκεκριμένων ζωνών).</b> | Υπερβολικά χαμηλή ποσότητα DNA.                                                                                                                         | Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και δείτε εάν η ποσότητα που έχει προστεθεί είναι σωστή. Η επιμόλυνση με RNA μπορεί να προκαλέσει φασματοφωτομετρική υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης DNA. Επαναλάβετε την εκχύλιση DNA με προσοχή, χρησιμοποιώντας φρέσκα διαλύματα. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN. |
|                                                                                            | Το DNA περιέχει αναστολείς PCR, π.χ. πρωτεΐνες, αιθανόλη (από τα βήματα καθίζησης), υπολειπόμενες μήτρες προϊόντων στερεής φάσης από τον καθαρισμό DNA. | Μετρήστε την ποιότητα του DNA. Συνιστούμε λόγο A260/A280 της τάξης του 1,6-2,0 βάσει φασματοφωτομετρίας UV. Ακολουθήστε με ακρίβεια το πρωτόκολλο εκχύλισης DNA του προμηθευτή. Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.                                              |
|                                                                                            | Το DNA έχει εκχυλιστεί από ηπαρινισμένο αίμα.                                                                                                           | Χρησιμοποιείτε μη ηπαρινισμένο αίμα ή ακολουθείτε πρωτόκολλα εκχύλισης DNA ειδικά για ηπαρινισμένο αίμα.                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                                                                            | Το DNA έχει αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει EDTA.                                                                                           | Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA και αραιώστε το σε dH <sub>2</sub> O.                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

| Πρόβλημα                                                                                                       | Αιτία                                                                                                                           | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Συνέχεια:</b><br><b>Απουσία ενίσχυσης (ούτε των τμημάτων εσωτερικού ελέγχου, ούτε συγκεκριμένων ζωνών).</b> | Ακούσια εισχώρηση λευκαντικού στην εξέταση.                                                                                     | Ελέγξτε τις περιοχές όπου μπορεί να έχει εισχωρήσει το λευκαντικό.                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                                | Τα κιτ δεν φυλάσσονται στην κατάλληλη θερμοκρασία.                                                                              | Φυλάσσετε τα κιτ στους -20°C.                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                                                                                | Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν λειτουργεί σωστά.                                                                                   | Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.                                                                                            |
|                                                                                                                | Ακατάλληλη επαφή μεταξύ της μονάδας θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή και του δίσκου τυποποίησης SSP.                          | Χρησιμοποιείτε το σωστό δίσκο/διάταξη συγκράτησης για βοθρία αντίδρασης 0,2 ml με λεπτά τοιχώματα. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του θερμικού κυκλοποιητή.                                                                                                                                   |
| <b>Τυχαία αποτυχία της ενίσχυσης (διαρροές).</b>                                                               | Όταν τα σφραγίσματα PCR/πώματα σωληναρίων PCR δεν είναι καλά κλεισμένα, προκαλείται εξάτμιση και τελικά αποτυχία της ενίσχυσης. | Βεβαιωθείτε ότι τα σφραγίσματα PCR/όλα τα πώματα είναι καλά κλεισμένα. Για την αποφυγή της εξάτμισης κατά την διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης μπορείτε να τοποθετήσετε πάνω από τα αυτοκόλλητα σφραγίσματα PCR επίθεμα συμπίεσης <sup>Olerup</sup> SSP® (Αρ. προϊόντος 103.505-06) . |
|                                                                                                                | Σφάλματα φόρτωσης πηκτώματος.                                                                                                   | Βεβαιωθείτε ότι έχει φορτωθεί ο σωστός αριθμός βοθρίων και ότι όλα τα βοθρία περιέχουν περίπου τον ίδιο όγκο μίγματος PCR.                                                                                                                                                              |
|                                                                                                                | Χρήση μη βαθμονομημένων πιπέτων.                                                                                                | Βαθμονομήστε όλες τις πιπέτες σύμφωνα με τις συστάσεις του προμηθευτή.                                                                                                                                                                                                                  |

| Πρόβλημα                                  | Αιτία                                                                         | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                           | Σφάλματα στη χρήση των πιπετών.                                               | Χρησιμοποιείτε τις πιπέτες με μεγαλύτερη προσοχή.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                                           | Το κύριο μίγμα και το δείγμα DNA δεν έχουν αναμιχθεί σωστά πριν από τη χρήση. | Αναμίξτε σύντομα με περιδίνηση πριν από τη χρήση. Συνιστούμε περιδίνηση μετά από κάθε σειρά.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                           | Τα βοηθία περιέχουν άνισο όγκο μίγματος DNA-κυρίου μίγματος.                  | Χρησιμοποιείτε τις πιπέτες με μεγαλύτερη προσοχή.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Ασθενή τμήματα εσωτερικού ελέγχου.</b> | Μη κεκαθαρμένο DNA.                                                           | Μετρήστε την ποιότητα του DNA. Ο λόγος A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> θα πρέπει να είναι 1,6 – 2,0 βάσει φασματοφωτομετρίας UV. Η επιμόλυνση με RNA μπορεί να προκαλέσει φασματοφωτομετρική υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης DNA. Το αλλοιωμένο DNA δημιουργεί κηλίδωση στις λωρίδες πηκτώματος. Επαναλάβετε την εκχύλιση DNA με προσοχή, χρησιμοποιώντας φρέσκα διαλύματα. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN. |
|                                           | Υπερβολικά χαμηλή ποσότητα DNA.                                               | Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για DNA που έχει εκχυλιστεί με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN. Η επιμόλυνση με RNA μπορεί να προκαλέσει φασματοφωτομετρική υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης DNA.                                                                                                                                                                                                                     |

| Πρόβλημα                                                      | Αιτία                                                                                   | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                               |                                                                                         | Το αλλοιωμένο DNA δημιουργεί κηλίδωση στις λωρίδες πηκτώματος. Επαναλάβετε την εκχύλιση DNA με προσοχή, χρησιμοποιώντας φρέσκα διαλύματα. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.                                                                        |
| <b>Συνέχεια:</b><br><b>Ασθενή τμήματα εσωτερικού ελέγχου.</b> | Υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία υβριδισμού. Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν έχει βαθμονομηθεί. | Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.                                                                                                             |
|                                                               | Το κύριο μίγμα PCR έχει φυλαχθεί στους +4°C για περισσότερο από 2 εβδομάδες.            | Φυλάσσετε κατάλληλα το κύριο μίγμα PCR.                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Μη ειδική ενίσχυση (διαβαθμίσεις ή κηλιδώσεις).</b>        | Χρήση υπερβολικού δείγματος DNA.                                                        | Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για DNA που έχει εκχυλιστεί με το DSP DNA Blood System της QIAGEN. Ορισμένα διαλύματα εκκινητών τείνουν να δημιουργούν συχνότερα μη ειδική ενίσχυση. Βλ. υποσημειώσεις σε κάθε Πίνακα ειδικότητας της συγκεκριμένης παρτίδας. |
|                                                               | Μη κεκαθαρωμένο DNA.                                                                    | Όλα τα τμήματα που είναι μεγαλύτερα από το τμήμα εσωτερικού ελέγχου θα πρέπει να                                                                                                                                                                                                                         |

| Πρόβλημα                                                             | Αιτία                                                                        | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                      |                                                                              | αγνοούνται κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν.<br>Ελέγξτε την ποιότητα του DNA. Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA.<br>Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.<br>Ορισμένα διαλύματα εκκινητών τείνουν να δημιουργούν συχνότερα μη ειδική ενίσχυση. Βλ. υποσημειώσεις σε κάθε Πίνακα ειδικότητας της συγκεκριμένης παρτίδας. |
| <b>Ολοένα ασθενέστερα σήματα ενίσχυσης με την πάροδο του χρόνου.</b> | Το διάλυμα χρώσης πηκτώματος αгарόζης με βρωμιούχο αιθίδιο δεν είναι φρέσκο. | Ετοιμάστε φρέσκο διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για να επιτύχετε καλύτερη χρώση του πηκτώματος αгарόζης και καλύτερο σήμα. Οι περιοχές θολότητας των εκκινητών μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα εάν η χρώση του πηκτώματος αгарόζης είναι φυσιολογική.                                                                                                                                           |
|                                                                      | Μία από τις λυχνίες UV έχει υποστεί βλάβη.                                   | Ελέγξτε τον εξοπλισμό φωτισμού UV. Οι περιοχές θολότητας των εκκινητών μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα εάν ο φωτισμός UV είναι φυσιολογικός.                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                      | Χρησιμοποιήθηκε υπερβολικά μικρή ποσότητα DNA.                               | Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για DNA που έχει εκχυλιστεί με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.                                                                                                                                                                                                                                          |

| Πρόβλημα                          | Αιτία                                                                                             | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | Υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία υβριδισμού. Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν έχει βαθμονομηθεί.           | Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.                                                                                                                               |
| <b>Περίεργα μοτίβα ενίσχυσης.</b> | Χρησιμοποιείται εσφαλμένος πίνακας ερμηνείας/εσφαλμένο φύλλο εργασιών της συγκεκριμένης παρτίδας. | Ελέγξτε τον αριθμό παρτίδας του προϊόντος που χρησιμοποιείται και του πίνακα ερμηνείας/φύλλου εργασιών που χρησιμοποιείται.                                                                                                                                                                                                |
|                                   | Εσφαλμένη σειρά φόρτωσης πηκτώματος.                                                              | Ελέγξτε την ευθυγράμμιση των μιγμάτων και των λωρίδων πηκτώματος.                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                   | Το μοτίβο ενίσχυσης περιέχει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.                                            | Βλέπε παρακάτω.                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                                   | Το μοτίβο ενίσχυσης περιέχει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα.                                          | Βλέπε παρακάτω.                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Ψευδώς θετικές ενισχύσεις.</b> | Επιμόλυνση DNA.                                                                                   | Χρησιμοποιείτε γάντια, ρύγχη πιπέτας με φραγμούς (τάπες με φίλτρο) και πραγματοποιείτε το χειρισμό πριν από την PCR και μετά την PCR σε διαφορετικούς χώρους. Διασφαλίστε ότι ο χειρισμός όλων των δειγμάτων πραγματοποιείται με ακρίβεια, σε όλα τα βήματα. Ελέγξτε για τυχόν επιμόλυνση με το κιτ Olerup SSP® Wipe Test. |

| Πρόβλημα | Αιτία                                                                                                   | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | Μη κεκαθαρμένο DNA.                                                                                     | Μετρήστε την ποιότητα του DNA.<br>Ακολουθήστε με ακρίβεια το πρωτόκολλο εκχύλισης DNA του προμηθευτή.<br>Δοκιμάστε άλλα συστήματα εκχύλισης DNA.<br>Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA.<br>Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System κιτ της QIAGEN. |
|          | Χρήση υπερβολικού δείγματος DNA.                                                                        | Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για DNA που έχει εκχυλιστεί με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.                                                                                                                                    |
|          | Υπερβολικά χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού.                                                               | Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.                                                                                         |
|          | Μεγάλη καθυστέρηση μεταξύ της προετοιμασίας της PCR και της έναρξης της θερμικής κυκλοποίησης.          | Δεν θα πρέπει να υπάρχει καθυστέρηση πάνω από 5 λεπτά πριν από τη θερμική κυκλοποίηση.                                                                                                                                                                                               |
|          | Καθυστέρηση μεταξύ της τοποθέτησης των δίσκων στο θερμικό κυκλοποιητή και της έναρξης της κυκλοποίησης. | Χρησιμοποιείτε προθερμασμένο θερμικό κυκλοποιητή.                                                                                                                                                                                                                                    |

| Πρόβλημα                                                        | Αιτία                                                  | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Συνέχεια:</b><br><b>Ψευδώς θετικές</b><br><b>ενισχύσεις.</b> | Χρήση υπερβολικής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου.       | Χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                 | Εσφαλμένη ερμηνεία μιας παραμόρφωσης ως ειδικής ζώνης. | Ελέγξτε τον Πίνακα ερμηνείας/ Φύλλο εργασίας της συγκεκριμένης παρτίδας καθώς και τον Πίνακα ειδικότητας και τις υποσημειώσεις για το σωστό μέγεθος ζωνών.                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                                                                 | Το μοτίβο ενίσχυσης περιέχει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. | Ελέγξτε εάν όλες οι ειδικές ενισχύσεις έχουν το σωστό μέγεθος ή εάν μια παραμόρφωση (μεταφορά, διμερές εκκινήτων) έχει παρερμηνευθεί ως ενίσχυση.                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                                 | Εσφαλμένη σειρά φόρτωσης πηκτώματος.                   | Ελέγξτε την ευθυγράμμιση των μιγμάτων και των λωρίδων πηκτώματος.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Ψευδώς αρνητικές</b><br><b>ενισχύσεις.</b>                   | Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν έχει βαθμονομηθεί σωστά.   | Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.<br>Εάν το πρόβλημα δεν επιλυθεί με εκ νέου βαθμονόμηση, επαναλάβετε την εξέταση τυποποίησης με ένα δείγμα αναφοράς της ίδιας ειδικότητας. Εάν επιβεβαιωθεί το αρνητικό αποτέλεσμα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης πελατών. |

| Πρόβλημα                                                                            | Αιτία                                                             | Ενέργεια                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                     | Εσφαλμένη σειρά φόρτωσης πηκτώματος.                              | Ελέγξτε την ευθυγράμμιση των μιγμάτων και των λωρίδων πηκτώματος.                                                                         |
| <b>Γενικά προβλήματα με το πήκτωμα (ασαφή πηκτώματα ή/και λωρίδες με κηλίδωση).</b> | Αλλοιωμένο δείγμα DNA.                                            | Εμφανίζεται ως κηλίδωση στις λωρίδες πηκτώματος. Απομονώστε DNA από ένα φρέσκο δείγμα.                                                    |
|                                                                                     | Έντονη γράμμωση σε τυχαία βοθρία.                                 | Ανομοιομορφα εναιωρήματα DNA. Βεβαιωθείτε ότι το δείγμα DNA έχει αραιωθεί πριν λάβετε το κλάσμα σας. Περιδινήστε το αραιωμένο δείγμα DNA. |
|                                                                                     | Προϊόν PCR που έχει διαρρεύσει από το βοθρίο.                     | Ευθυγραμμίστε προσεκτικά τα ρύγχη των πιπετών με τα βοθρία πηκτώματος και πραγματοποιήστε τη διανομή αργά.                                |
|                                                                                     | Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι πολύ ζεστό.  | Ετοιμάστε νέο ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Χρησιμοποιήστε χαμηλότερη τάση ρεύματος.                                                            |
|                                                                                     | Έχει χρησιμοποιηθεί εσφαλμένο ποσοστό πηκτώματος αγαρόζης.        | Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται το συνιστώμενο ποσοστό 2% για το πήκτωμα αγαρόζης.                                                        |
|                                                                                     | Η αγαρόζη δεν έχει διαλυθεί πλήρως.                               | Επαναλάβετε το βρασμό για την τήξη της αγαρόζης.                                                                                          |
|                                                                                     | Εσφαλμένη συγκέντρωση TBE.                                        | Χρησιμοποιήστε τη συνιστώμενη συγκέντρωση TBE 0,5x.                                                                                       |
|                                                                                     | Τα πηκτώματα έχουν χυτευθεί πολύ πρόσφατα.                        | Τα πηκτώματα είναι έτοιμα για χρήση μόνο αφού περάσουν 15 λεπτά από τη χύτευση.                                                           |
|                                                                                     | Τα πηκτώματα είναι πολύ παλιά.                                    | Μη χυτεύετε πηκτώματα πολύ νωρίτερα.                                                                                                      |
|                                                                                     | Η κτένα πηκτωμάτων που χρησιμοποιείται έχει πολύ παχιές υποδοχές. | Χρησιμοποιείτε λεπτές κτένες (4 x 1 mm).                                                                                                  |

| Πρόβλημα                                                                                          | Αιτία                                                            | Ενέργεια                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                   | Ο δίσκος πηκτώματος δεν είναι διαπερατός από την ακτινοβολία UV. | Αφαιρέστε το πηκτώμα από το δίσκο πριν από την επισκόπηση.                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                   | Η εικόνα του πηκτώματος είναι υπερβολικά φωτεινή.                | Υπερβολική χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Ελέγξτε τις ρυθμίσεις της κάμερας.                                                                                                                                                                                    |
|                                                                                                   | Η εικόνα του πηκτώματος είναι υπερβολικά σκοτεινή.               | Χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου. Ελέγξτε τις ρυθμίσεις της κάμερας.                                                                                                                                                              |
| <b>Γενικά προβλήματα με ψευδώς αρνητική ενίσχυση ή παρόμοια προβλήματα από ανάλυση σε ανάλυση</b> | Υπερβολικά υψηλή ρύθμιση ρυθμού κλιμάκωσης.                      | Τα κιτ Olerup SSP έχουν επικυρωθεί με ρύθμιση των κυκλοποιητών GeneAmp 9700 σε τρόπο λειτουργίας 9600 και ProFlex με ρυθμό κλιμάκωσης 3° C/s. Ρυθμοί κλιμάκωσης υψηλότεροι από αυτόν που περιγράφεται μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της τυποποίησης. |

## ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΓΓΡΑΦΟ/ΠΡΟΪΟΝ

Η επωνυμία Olerup SSP® είναι εμπορικό σήμα κατατεθέν της CareDx AB.

Η επωνυμία Qiagen™ είναι εμπορικό σήμα της QIAGEN.

## ΕΓΓΥΗΣΗ

Η CareDx AB εγγυάται στον αρχικό αγοραστή ότι τα προϊόντα της δεν φέρουν ελαττώματα στα υλικά και στην κατασκευή υπό συνθήκες φυσιολογικής χρήσης και εφαρμογής. Η μόνη υποχρέωση της CareDx AB βάσει της παρούσας εγγύησης έγκειται στη δωρεάν αντικατάσταση κάθε προϊόντος που δεν πληροί τα πρότυπα απόδοσης όπως αυτά ορίζονται στο φύλλο προδιαγραφών του.

Η παρούσα εγγύηση ισχύει μόνο για προϊόντα που χρησιμοποιούνται και φυλάσσονται σύμφωνα με τις συστάσεις της CareDx AB και δεν ισχύει για προϊόντα που έχουν υποστεί τροποποιήσεις, εσφαλμένη χρήση ή κατάχρηση.

Όλες οι αξιώσεις βάσει της παρούσας εγγύησης πρέπει να απευθύνονται στην CareDx AB εγγράφως και να συνοδεύονται από αντίγραφο του τιμολογίου αγοράς. Η παρούσα εγγύηση αντικαθιστά όλες τις άλλες εγγυήσεις, ρητές ή σιωπηρές, συμπεριλαμβανομένων εγγυήσεων περί εμπορευσιμότητας και καταλληλότητας για συγκεκριμένο σκοπό. Σε καμία περίπτωση η CareDx AB δεν φέρει ευθύνη για παρεπόμενες ή αποθετικές ζημιές.

Το παρόν προϊόν δεν μπορεί να επανατροποποιηθεί, επανασυσκευαστεί ή επαναπωληθεί με οποιοδήποτε τρόπο χωρίς την έγγραφη συναίνεση της CareDx AB, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Σουηδία.

Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μέσα μετάδοσης νόσων. Όλες οι εργασίες θα πρέπει να εκτελούνται με γάντια και κατάλληλη προστασία.

### ΔΗΛΩΣΗ ΕΓΓΥΗΣΗΣ

Η CareDx AB εγγυάται ότι οι εκκινητές στους δίσκους τυποποίησης Olerup SSP® χαρακτηρίζονται από τις ειδικότητες που αναγράφονται στο φύλλο εργασίας καθώς και στους Πίνακες ειδικότητας και ερμηνείας της συγκεκριμένης παρτίδας στο ένθετο προϊόντος.

### ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ:

#### Κατασκευαστής:

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Σουηδία

**Τηλ:** +46-8-508 939 00

**Φαξ:** +46-8-717 88 18

**E-mail:** orders-se@caredx.com

**Ιστότοπος:** <http://www.labproducts.caredx.com>

#### Διανέμεται από:

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Σουηδία

**Τηλ:** +46-8-508 939 00

**Φαξ:** +46-8-717 88 18

**E-mail:** orders-se@caredx.com

**Ιστότοπος:** <http://www.labproducts.caredx.com>

**CareDx Lab Solutions Inc.**, 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382

**Τηλ:** 1-877-653-7871

**Φαξ:** 610-344-7989

**E-mail:** orders-us@caredx.com

**Ιστότοπος:** <http://www.labproducts.caredx.com>

**CareDx Pty Ltd.**, 20 Collie Street, Fremantle WA 6160, Αυστραλία

**Τηλ.:** +61 8 9336 4212

**E-mail:** orders-aus@caredx.com

**Ιστότοπος:** <http://www.labproducts.caredx.com/>

Για πληροφορίες σχετικά με τους διανομείς της CareDx παγκοσμίως, επικοινωνείτε με την CareDx AB.

**Οδηγίες χρήσης  
Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® με Taq πολυμεράση**

0410-LBL v02 Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® με Taq πολυμεράση μεταφρασμένο από το αγγλικό κυρίως κείμενο 0192-LBL v04 Olerup SSP® HLA typing kits including Taq polymerase.

Αλλαγές στην αναθεώρηση 0192-LBL έκδ. 04 συγκριτικά με την 0192-LBL έκδ. 03:

1. Τα στοιχεία επικοινωνίας αναθεωρήθηκαν.

Αλλαγές στην αναθεώρηση 0192-LBL έκδ. 03 συγκριτικά με την 0192-LBL έκδ. 02:

1. Προστέθηκε η ημερομηνία αναθεώρησης.
2. Διευκρινίστηκαν πληροφορίες σχετικά με τα έγγραφα ενθέτου προϊόντος για κάθε συγκεκριμένη παρτίδα.
3. Προστέθηκε η CareDx Pty Ltd ως διανομέας.