



Instrukcja użytkowania

Olerup SSP®
wraz z polimerazą Taq

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO

ZASTOSOWANIE

Olerup SSP® HLA są wysokiej jakości zestawami diagnostycznymi *in vitro* do typowania DNA alleli HLA klasy I i HLA klasy II. Produkty te są wykorzystywane przez przeszkolonych specjalistów medycznych w celu określenia fenotypu HLA. Materiałem źródłowym poddawany testom jest DNA.

OPIS

Dawniej ludzkie antygeny leukocytarne (HLA) oznaczano na podstawie wyników testów limfocytotoksycznych. Jednak badanie to zostało zastąpione przez techniki typowania DNA oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) ze względu na poziom błędów poprzedniej metody i brak rozdzielczości na poziomie alleli. W większości technik opartych na PCR, proces PCR wykorzystywany jest tylko na etapie amplifikacji potrzebnego DNA docelowego oraz, już po amplifikacji, do rozróżnienia poszczególnych alleli. Tymczasem w metodzie PCR-SSP (sequence-specific primer – SSP), rozróżnienie pomiędzy poszczególnymi allelami odbywa się podczas reakcji PCR. Skracza to i upraszcza etap poamplifikacyjny do prostego etapu detekcji elektroforezy żelowej. Wyniki testu SSP są albo pozytywne albo negatywne, co eliminuje konieczność skomplikowanej interpretacji wyników. Ponadto rozdzielczość typowania PCR-SSP jest wyższa niż w przypadku innych technik typowania opartych na PCR, jako że każda para starterów (primerów) definiuje dwa motywy sekwencyjne zlokalizowane w pozycji *cis*, tzn. na tym samym chromosomie. Co więcej, ze względu na syntetyczną naturę odczynników SSP, została ulepszona stabilność oraz zredukowana liczba wariacji „lot to lot”.

ZASADY POSTĘPOWANIA

Metodologia PCR-SSP opiera się na zasadzie, zgodnie z którą całkowicie lub prawie całkowicie dopasowane startery oligonukleotydowe bez błędów na końcu 3' są wykorzystywane bardziej wydajnie w reakcji PCR niż niedopasowane startery przy pomocy termostabilnych polimeraz DNA bez właściwości korekcji błędów. Pary starterów są zaprojektowane tak, by pasowały do pojedynczych alleli lub grupy/grup alleli, w zależności od wymaganej rozdzielczości typowania. W ściśle kontrolowanych warunkach PCR, dopasowane lub prawie całkowicie dopasowane pary starterów umożliwiają amplifikację, tzn. dają wynik pozytywny, podczas gdy źle dopasowane pary starterów uniemożliwiają amplifikację, tzn. dają wynik negatywny.

Po zakończeniu procesu PCR, zamplifikowane fragmenty DNA są rozdzielane ze względu na wielkość, np. przy pomocy elektroforezy na żelu agarozowym, uwidaczniane przez barwienie bromkiem etydydny i ekspozycję na światło UV, a następnie rejestrowane na fotografiach i analizowane. Interpretacja wyników PCR-SSP opiera się na obecności lub nieobecności specyficznego produktu/specyficznych produktów PCR. Względne wielkości specyficznego produktu/specyficznych produktów PCR mogą być pomocne w interpretacji

wyników. Metodologia PCR-SSP dla HLA została po raz pierwszy opisana przez O. Olerupa w 1991 i 1992^{1,2}.

Ponieważ na reakcję PCR mogą wpływać niekorzystnie różne czynniki (np. błędy pipetowania, zbyt niskie stężenie DNA, niska jakość DNA, obecność inhibitorów PCR, stopień dokładności termocyklera), w każdej reakcji PCR zawarta jest para starterów wewnętrznej kontroli pozytywnej². Para starterów wewnętrznej kontroli pozytywnej pasuje do konserwatywnych regionów ludzkiego genu hormonu wzrostu, który jest obecny we wszystkich próbkach ludzkiego DNA. W obecności specyficznego produktu PCR allelu/alleli HLA, pasek produktu wewnętrznej kontroli pozytywnej może być słaby lub nieobecny. Amplikony wygenerowane przez pary starterów specyficznych dla HLA są krótsze niż amplikony pary starterów wewnętrznej kontroli pozytywnej ale większe niż niewbudowane startery (patrz: Oczekiwane wartości).

ODCZYNNIKI

A. Identyfikacja

Zestawy do typowania *Olerup SSP®* zawierają wysuszone, wstępnie zoptymalizowane startery specyficzne dla danej sekwencji, służące do amplifikacji alleli HLA i ludzkiego genu hormonu wzrostu, Master Mix PCR z polimerazą *Taq* („Master Mix”), adhezyjne filmy uszczelniające płytkę PCR i ulotkę z podstawową instrukcją użytkowania.

Roztwory starterów są wstępnie rozporcjowane i wysuszone w oddzielnych 0,2 ml dołkach cienkościennych płytek PCR. Każdy dołek płytki zawiera wysuszony roztwór starterów, składający się z mieszanki specyficznych starterów, tzn. starterów specyficznych dla danego allela lub grupy alleli HLA, a także pary starterów wewnętrznej kontroli pozytywnej, które pasują do nie-allelicznej sekwencji i są gotowe do zmieszania z próbką DNA, Master Mix i H₂O.

Startery są przeznaczone do optymalnej amplifikacji PCR przy użyciu Master Mix oraz rekomendowanego programu cykli PCR (patrz: Programowanie termocyklera).

Specyficzne dla danej partii Tabele specyficzności i interpretacji lub Arkusz roboczy dla specyficznych alleli HLA amplifikowanych przez każdą mieszanke starterów można pobrać z witryny <https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/>.

B. Ostrzeżenia i środki zapobiegawcze

1. Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
2. Niniejszy produkt nie może stanowić jedynej podstawy do podejmowania decyzji klinicznej.
3. Ostrzeżenie dotyczące zagrożenia biologicznego: Wszystkie produkty krwiopochodne należy traktować jako potencjalne źródło zakażenia. Żadna metoda testująca nie zapewnia całkowitego zniesienia ryzyka transmisji czynników zakaźnych pochodzących z ludzkiej krwi.
4. Ostrzeżenie dotyczące zagrożenia biologicznego: Bromek etydyny stosowany do barwienia DNA w żelu agarozowym jest czynnikiem rakotwórczym. W związku z tym należy używać odpowiedniego sprzętu ochrony osobistej.
5. Uwaga: Należy używać okularów ochronnych, zabezpieczających przed światłem UV i nie patrzeć bezpośrednio na źródło światła UV podczas obserwowania i fotografowania żeli.
6. Pipety i inny sprzęt używany do pracy z próbkami **po** PCR **nie** powinny być używane do pracy z próbkami **przed** PCR.
7. Szczegółowe informacje znajdują się w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznych (<http://www.labproducts.careDx.com>).

C. Instrukcja użytkowania

Patrz: Wskazówki dotyczące użytkowania.

D. Instrukcja przechowywania

Komponenty zestawu należy przechowywać w ciemności, w temperaturze wskazanej na etykietach opakowań.

Należy używać przed datą wygaśnięcia ważności, wydrukowaną na etykietach opakowań.

E. Oczyszczanie i właściwy sposób użytkowania

Patrz: Wskazówki dotyczące użytkowania.

F. Oznaki niestabilności

1. Nie należy używać płytek z pęknięciami w dołkach lub uszkodzeniami na ich górnej krawędzi, ponieważ może to spowodować parowanie reakcji podczas PCR. Nie należy używać pasków z wieczkami PCR z pęknięciami, ponieważ może to spowodować parowanie podczas amplifikacji PCR.
2. Osady w dołkach powinny mieć kolor czerwony. Zabarwienie osadu na żółto może wskazywać na degradację.
3. Master Mix powinien mieć kolor czerwony do fioletowego. Zabarwienie mieszanki na żółto lub pomarańczowo może wskazywać na degradację.

WYMAGANIA SPRZĘTOWE**A. Urządzenia**

Należy stosować termocykler o następującej, minimalnej specyfikacji:

- podgrzewana pokrywa o temperaturze 104 °C dla pracy bez użycia oleju;
- blok na próbki (z aluminium, srebra lub połączanego srebra) do stosowania albo z 96-dołkowymi płytkami do PCR albo cienkościennymi probówkami o pojemności 0,2 ml;
- Zestawy Olerup SSP zostały sprawdzone na cyklerach wymienionych poniżej.

Zalecane współczynniki ramp:

- GeneAmp 9700: Termocykler GeneAmp 9700 ustawiony na tryb 9600. Odpowiada to **współczynnikowi ramp** w zakresie od 1,6 °C/s (górna wartość) do 0,8 °C/s (dolna wartość).
- ProFlex 1xblok 96-dołkowy: Termocykler ProFlex PCR ze współczynnikiem ramp bloku 3,0 °C/s (każdy etap 3,0 °C/s). **Współczynnik ramp bloku** 3,0 °C/s odpowiada współczynnikowi ramp próbki w zakresie od 1,52 °C/s (górna wartość) do 1,36 °C/s (dolna wartość).
- ProFlex 2xblok 96-dołkowy: Termocykler ProFlex PCR ze współczynnikiem ramp bloku 3,0 °C/s (każdy etap 3,0 °C/s). **Współczynnik rampy bloku** 3,0 °C/s odpowiada współczynnikowi ramp próbki w zakresie od 1,9 °C/s (górna wartość) do 1,6 °C/s (dolna wartość).

Uwaga: Wyższe współczynniki ramp niż odpowiadające opisanym powyżej mogą mieć wpływ na wyniki typowania. Należy również zauważyć, że wpływ na typowanie może różnić się między różnymi niesprawdzonymi cyklerami w zależności od ustawień.

- zakres temperatury od 4,0 °C do 99,9 °C
- dokładność temperaturowa $\pm 0,25$ °C w zakresie od 35 °C do 99,9 °C
- jednorodność temperatury bloku na próbki $\leq 0,75$ °C w zakresie od 55 °C do 95 °C
- kalibracja temperatury ustalana na podstawie wzorca odniesienia (tzw. NIST)

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA wraz z polimerazą Taq

Należy zaprogramować termocykler stosując parametry cykli PCR w Rozdziale B, poniżej.

Szczegółowe informacje na temat termocyklera znajdują się w instrukcji obsługi producenta. Termocyklery powinny być skalibrowane zgodnie z zasadami akredytacyjnymi ASHI (Amerykańskie Stowarzyszenie Zgodności Tkankowej i Immunogenetyki) i EFI (Europejska Federacja Zgodności Tkankowej).

Przed przejściem do sekcji Wskazówki użytkowania, należy zaprogramować termocykler według parametrów przedstawionych poniżej.

B. Parametry cykli PCR

- | | | | | |
|----|----------------------|-------|---------|-------------------------------------|
| 1. | 1 cykl | 94 °C | 2 min. | denaturacja |
| 2. | 10 cykli | 94 °C | 10 sek. | denaturacja |
| | | 65 °C | 60 sek. | przyłączanie starterów i wydłużanie |
| 3. | 20 cykli | 94 °C | 10 sek. | denaturacja |
| | | 61 °C | 50 sek. | przyłączanie starterów |
| | | 72 °C | 30 sek. | wydłużanie |
| 4. | Koniec - zatrzymanie | RT | | jeśli krócej niż 8 godzin |
| | | 4 °C | | jeśli dłużej niż 8 godzin |

Całkowita pojemność reakcji w każdym dołku, 10 µl.

Te same parametry cykli PCR stosowane są dla wszystkich zestawów *Olerup* SSP®.

POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Do typowania SSP potrzebne jest wyizolowane, wysoce oczyszczone DNA. Próbki DNA używane do typowania PCR-SSP HLA powinny być zawieszone w dH₂O. Zalecamy, aby współczynnik $A_{260/280}$ zmierzony za pomocą spektrofotometrii UV wynosił 1,6 - 2,0 w celu uzyskania optymalnej widoczności paska podczas elektroforezy.

Zaleca się zautomatyzowaną ekstrakcję DNA przy użyciu systemu do izolacji DNA z krwi QIAGEN EZ1 DSP. Jako materiał wyjściowy należy zastosować krew pobraną na ACD.

Alternatywnie, DNA może być ekstrahowane przy użyciu innej, preferowanej przez użytkownika metody pozwalającej na uzyskanie czystego DNA. W przypadku stosowania metod alternatywnych, stężenie DNA powinno wynosić 30 ng/μl. **Nie należy używać do tych metod krwi heparynizowanej.**

Zalecane stężenie DNA przy użyciu:

metody EZ1 do ekstrahowania DNA, 15 ng/μl.

innych metod do ekstrahowania DNA, 30 ng/μl.

Stężenie DNA przekraczające 50 ng/μl zwiększa ryzyko wystąpienia niespecyficznych amplifikacji oraz pojawienia się słabych dodatkowych prążków, szczególnie w przypadku typowania SSP HLA klasy I o wysokiej rozdzielczości. W razie konieczności, wyizolowane DNA należy rozcieńczyć w dH₂O.

Próbki DNA nie powinny być zawieszane w roztworach zawierających czynniki chelatujące, takie jak EDTA, o stężeniu powyżej 0,5 mM.

Próbki DNA mogą być używane natychmiast po izolacji lub przechowywane w temperaturze +4 °C przez okres maksymalnie 2 tygodni bez niekorzystnego wpływu na wyniki. Próbki DNA można przechowywać w temperaturze -20 °C lub niższej przez okres 9 miesięcy. Czystość i stężenie wyizolowanych próbek DNA, które były przechowywane przez dłuższy czas, powinny być badane w celu ustalenia czy nadają się one do typowania HLA.

Próbki DNA należy przewozić w temperaturze +4 °C lub niższej w celu zachowania ich dobrego stanu podczas transportu.

PROCEDURA

A. Dostarczone materiały

1. Płytki ze starterami *Olerup SSP®*.
2. Master Mix (odpowiednia pojemność dla płytek zestawu). Ten sam Master Mix jest używany do wszystkich zestawów *Olerup SSP®*.
3. Adhezyjne filmy uszczelniające płytkę PCR (odpowiednia liczba dla płytek zestawu).
4. Ulotka z podstawową instrukcją użytkowania.

B. Materiały wymagane, ale nie dostarczone

1. Zestaw/sprzęt do izolacji DNA
2. Spektrofotometr UV
3. Pipety. Zaleca się stosowanie jednokanałowej elektronicznej pipety umożliwiającej porcjowanie po 10 µl, w celu dodania DNA-Master Mix-dH₂O do dołków płytki.
4. Jednorazowe końcówki do pipet
5. Probówki polipropylenowe
6. Mikser Vortex
7. Mikrowirówka
8. Statyw na płytkę PCR
9. Termocykler z podgrzewaną pokrywą do PCR, blokiem 96-dołkowym, gradientem temperaturowym wzdłuż bloku grzejnego ≤ 0,75 °C oraz płytką/zasobnikiem na cienkościenne probówki o pojemności 0,2 ml.
10. Kuchenka mikrofalowa lub płyta grzejna do podgrzewania roztworu agarozy
11. Agarozą do elektroforezy, np. FMC Seakem LE
12. Bufor 0,5 x TBE; 1 x bufor TBE składa się z 89 mM Tris-boranu i 2 mM dwusodanu EDTA, pH 8,0
13. Bromek etydyny z kroplomierzem, nr produktu 103.301-10
14. Pipeta do nakładania próbek na żel. Zaleca się stosowanie 8-kanałowej pipety do nakładania próbek na żel o regulowanym zakresie objętości 5-25 µl
15. Marker DNA o zakresie 50 – 1 000 par zasad (pz), np. marker DNA 100 pz, produkt o numerze 103.202-100 lub marker DNA dla krótkich żeli nr 103.203-100
16. Aparat do elektroforezy z zasilaczem
17. Transiluminator UV
18. System dokumentacji fotograficznej lub obrazowej

C. Procedura krok po kroku

Patrz: Wskazówki dotyczące użytkowania.

WSKAZÓWKI DOTYCZĄCE UŻYTKOWANIA

A. Przygotowanie próbki

1. Oczyszczyć genomowe DNA z leukocytów metodą do wyboru, patrz: Pobieranie Próbek i ich Przygotowanie, powyżej.
2. Jeśli chodzi o szczegółowe informacje na temat przygotowania próbki i jej przechowywania, patrz: Pobieranie Próbek i ich Przygotowanie, powyżej.
3. Przeprowadzić reakcję PCR na oczyszczonej próbce DNA przy użyciu płytki do typowania **Olerup SSP®** lub przechowywać próbkę DNA do momentu przeprowadzenia PCR.

B. Przygotowanie odczynników/sprzętu

1. Zaprogramować termocykler zgodnie z programem PCR **Olerup SSP®**, patrz: Wymagania Sprzętowe – Parametry Cykli Reakcji PCR, powyżej.
2. Przygotować żel do elektroforezy, patrz: Rozdział C – **Przygotowanie żelu do elektroforezy**, poniżej.

C. Przygotowanie żelu do elektroforezy

Dla aparatu do elektroforezy **Olerup SSP®** Gel System 96 (Numer produktu 103.101-01)

1. Konfiguracja
 - Wypoziomować zbiornik do wylewania żelu na 1 żel (Numer produktu 103.101-31) lub zbiornik na 3 żele (Numer produktu 103.101-33) przy użyciu poziomicy i trzech nóżek o regulowanej wysokości.
 - Umieścić saneczki w zbiorniku do wylewania żelu.
2. Przygotowanie żelu agarozowego 2% (w/v)

Należy użyć wysokiej jakości agarozy do elektroforezy, umożliwiającej rozdział od 50 do 2000 par zasad fragmentów DNA.

 - Do 5 ml 10x stężonego buforu TBE (TrisBoranEDTA) dodać 150 ml wody destylowanej i 2 g agarozy w 500 ml szklanej kolbie.
 - Rozpuścić agarozę przez gotowanie w kuchence mikrofalowej aż do uzyskania jednorodnego roztworu 100 ml.
 - Rozpuszczony roztwór żelu pozostawić do schłodzenia do temperatury 60°C, np. w cieplarni.
 - Przed wylaniem zabarwić żel bromkiem etydyny (10 mg/ml), 5 µl na 100 ml roztworu żelu. Dla maksymalnej łatwości obsługi używać bromku etydyny z zakraplaczem (Numer produktu 103.301-10). **Uwaga: Bromek etydyny jest czynnikiem rakotwórczym. W związku z tym należy używać odpowiedniego sprzętu ochrony osobistej.**
 - Wylać 100 ml roztworu żelu na saneczki umieszczone w zbiorniku do wylewania żelu. Umieścić 6 grzebieni żelowych (Numer produktu 103.101-21) w rowkach saneczek.
 - Pozostawić żel na 15 min w celu spolimeryzowania.
 - Wlać 750 ml 0,5x stężonego buforu TBE do zbiornika na żel. Zanurzyć saneczki z żelem w aparacie do elektroforezy i ostrożnie usunąć 6 grzebieni przez ich podniesienie.

Korzystając z alternatywnych systemów elektroforezy, należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta. Jeśli mają one być używane z zestawami do typowania HLA **Olerup SSP®**, to systemy te muszą mieć zdolność do rozdzielenia produktów PCR w zakresie wielkości par zasad od 50 do 1100.

D. Procedura krok po kroku

1. Wyjąć z miejsc przechowywania we wskazanej temperaturze/wskazanych temperaturach: odpowiednią liczbę próbek DNA, płytkę/płytki ze starterami oraz objętość Master Mix potrzebną do pracy na wybranych próbkach DNA/płytkach ze starterami. Rozmrozić w temperaturze pokojowej (20-25 °C).

Ten sam Master Mix jest używany we wszystkich zestawach **Olerup SSP®**.

2. Wymieszać krótko próbki DNA przez worteksowanie.
3. Umieścić płytki ze starterami na statywie na płytki.
4. **Zestawy niskiej i wysokiej rozdzielczości**
 - Zworteksować Master Mix przed jego rozporcjowaniem.
 - Za pomocą ręcznej jednokanałowej pipety dodać w temperaturze pokojowej Master Mix i dH₂O do probówki 0,5 ml lub 1,5 ml. (Potrzebna objętość może być zweryfikowana na podstawie informacji w Tabeli 1).
 - Zamknąć probówkę i worteksować przez 5 sek. Zwirować probówkę w miniwirówce w celu zebrania całego płynu ze ścianek na dno probówki.
 - Za pomocą jednokanałowej pipety dodać w temperaturze pokojowej 8 µl mieszanki Master Mix – dH₂O i 2 µl dH₂O do dołka z negatywną kontrolą, tzn. dołka z parą starterów negatywnej kontroli płytki ze starterami.
 - Za pomocą jednokanałowej pipety dodać w temperaturze pokojowej próbkę DNA do pozostałej mieszanki Master Mix - dH₂O. (Potrzebna objętość może być zweryfikowana na podstawie informacji w Tabeli 1).
 - Zamknąć probówkę i worteksować przez 5 sek. Zwirować probówkę w miniwirówce w celu zebrania całego płynu ze ścianek na dno probówki.
 - Za pomocą elektronicznej pipety jednokanałowej rozdzielić po 10 µl mieszaniny reakcyjnej z próbką DNA do każdego dołka płytki, z wyjątkiem dołka negatywnej kontroli.

Tabela 1: Objętości składników potrzebnych na jeden test dla różnej liczby dołków przy użyciu Master Mix.

Liczba dołków na test	Objętość Master Mix (μl)	Objętość próbki DNA (μl)	Objętość dH ₂ O (μl)	Liczba dołków na test	Objętość Master Mix (μl)	Objętość próbki DNA (μl)	Objętość dH ₂ 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

Wymienione powyżej zalecane objętości zawierają objętości niezbędne do skompensowania różnic pipetowania oraz strat płynu na wewnętrznych ściankach probówek.

5. Zestawy Combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ i DQA-DQB-DR Enhanced oraz HLA-C wysokiej rozdzielczości dla zestawu do alleli o wysokiej częstotliwości

- Zworteksować Master Mix.
- Przy użyciu pipety jednokanałowej dodać w temperaturze pokojowej 520 μl dH₂O do dostarczonej 1,5 ml próbki zawierającej 312 μl Master Mix.
- Zamknąć probówkę i worteksować przez 5 sek. Zwirować probówkę w miniwirówce w celu zebrania całego płynu ze ścianek na dno próbki.
- Za pomocą pipety jednokanałowej dodać 8 μl mieszaniny Master Mix – dH₂O i 2 μl dH₂O do dołka nr 96 z negatywną kontrolą, tzn. dołka z parą starterów negatywnej kontroli.
- Za pomocą pipety jednokanałowej dodać w temperaturze pokojowej 206 μl próbki DNA do pozostałej mieszanki Master Mix – dH₂O.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA wraz z polimerazą Taq

- Zamknąć probówkę i worteksować przez 5 sek. Zwirować probówkę w miniwirówce w celu zebrania całego płynu ze ścianek na dno probówki.
- Za pomocą elektronicznej pipety jednokanałowej rozdzielić po 10 µl mieszaniny reakcyjnej z próbką do każdego dołka płytki, z wyjątkiem dołka negatywnej kontroli nr 96.

Ważne:

Należy się upewnić, że próbka została nałożona bezpośrednio nad osadem starterów (wysuszonymi na dnie każdego dołka płytki), w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego między dołkami. Należy dotknąć końcówką pipety wewnętrznej ścianki dołka i wypuścić próbkę na dno dołka. Sprawdzić, czy wszystkie próbki spłynęły na dno każdego dołka. Jeśli nie, należy delikatnie postukać płytką o blat stołu, aby wszystkie próbki osiadły na dnie dołka przed rozpoczęciem reakcji PCR.

6. Przykryć płytkę/płytki ze starterami dostarczonymi adhezyjnymi filmami uszczelniającymi PCR. Sprawdzić, czy wszystkie dołki reakcyjne są całkowicie przykryte, aby zapobiec wyparowaniu podczas amplifikacji PCR. Matę kompresyjną *Olerup SSP®* (Numer produktu 103.505-06) można położyć na wierzchu uszczelniających filmów adhezyjnych, aby w ten sposób zapobiec parowaniu podczas reakcji PCR w termocyklerze.
7. Umieścić płytkę/płytki w termocyklerze z odpowiednim adapterem probówka-płytki. Nie dopuszczać do więcej niż 5 minut opóźnienia między nastawieniem reakcji PCR a rozpoczęciem reakcji PCR.
8. Wprowadzić swój numer programu *Olerup SSP®*. Zdefiniować objętość reakcyjną na 10 µl.
9. Uruchomić program PCR. Program trwa około 1 godz. i 20 min.
10. Wyjąć płytkę/płytki ze starterami z termocyklera. Sprawdzić płytkę PCR, aby upewnić się, że w każdym dołku znajduje się mniej więcej taka sama ilość płynu. Poddać próbki elektroforezie, patrz: Rozdział E – Elektroforeza żelowa, poniżej. Zinterpretować wyniki typowania za pomocą **właściwej dla danej partii Tabeli Specyficzności i Interpretacji lub Arkusza Roboczego**, patrz: Wartości Oczekiwane, poniżej.

E. Elektroforeza żelowa

1. Po zakończeniu reakcji PCR ustawić płytkę ze starterami we właściwej pozycji w stosunku do zbiornika na żel. Porządek dołków ma być od lewej do prawej i od góry do dołu.
2. Delikatnie zdjąć pasek z wieczkami, uważając, żeby nie doprowadzić do rozchlapania produktów PCR.
3. Nanieść w kolejności produkty PCR na 2% żel agarozowy. (Dodanie buforu obciążającego nie jest konieczne). Do nakładania próbek na żel zaleca się stosowanie pipety 8-kanalowej.
4. Nanieść marker wielkości DNA (marker wielkości DNA 100 pz, numer produktu 103.202-100 lub marker wielkości DNA dla krótkich żeli 103.203-100) do jednej studzienki na rząd.
5. Przykryć aparat do elektroforezy pokrywą.
6. Przeprowadzić elektroforezę w 0,5 x stężonym buforze TBE, bez recyrkulacji buforu, przez 15-20 min przy 8-10 V/cm.
7. Przenieść saneczki z żelem do transiluminatora UV.
8. Sfotografować żel z saneczkami i bez saneczek.
9. Oznaczyć fotografię zgodnie z zasadami obowiązującymi w laboratorium.

KONTROLA JAKOŚCI

Wytyczne ASHI odnośnie badania HLA mówią o tym, że za każdym razem podczas nastawiania reakcji PCR należy dodać dołek kontroli negatywnej (kontrola zanieczyszczenia). (Normy dla laboratoriów akredytowanych, Amerykańskie Towarzystwo Zgodności Tkankowej i Immunogenetyki, Normy ostateczne zatwierdzone przez zarząd ASHI: 31 sierpnia 2007, ostateczna wersja wytycznych styczeń 2008). Dołek kontroli negatywnej znajduje się we wszystkich zestawach od partii 01V (zestaw DQ niskiej rozdzielczości, od partii 06Y).

Patrz także: Interpretacja żelowa, s. 14.

WYNIKI

Specyficzne dla danej partii Arkusze walidacji linii komórkowych i Świadcstwa przeprowadzonych badań są dostępne w Internecie w witrynie <https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/>.

OGRANICZENIA PROCEDURY

1. Proces PCR-SSP wymaga wysoce kontrolowanych warunków testowych w celu zapewnienia odpowiedniej amplifikacji różnicującej. Należy ściśle przestrzegać procedury opisanej w instrukcji użytkowania.
2. Wyizolowana próbka DNA jest matrycą dla specyficznej amplifikacji reakcji PCR. Oczyszczone DNA powinno mieć współczynnik $A_{260/280}$ wynoszący 1,6 - 2,0, aby uzyskać optymalną widoczność prążka podczas elektroforezy.
3. Wszystkie przyrządy, na przykład termocykler i pipety, muszą być skalibrowane zgodnie z zaleceniami producenta.
4. Informacje dotyczące danej partii podano w broszurze produktu: Informacje Specyficzne dla danej partii i Arkusz Roboczy specyficzny dla danej partii.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA wraz z polimerazą Taq

5. Niżej wymienione substancje zostały przetestowane pod kątem ich wpływu na wydajność testu. Substancje te, testowane przy użyciu trzech (3) metod ekstrakcji i w wymienionych stężeniach, nie wykazały wpływu na wydajność testu.

Metoda ekstrakcji (izolacji)	Substancja interferująca	Stężenie substancji interferującej*
System izolacji DNA z krwi EZ1 DSP	Bilirubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Trójgliceryd	30 g/L
	Białko	110 g/L
Zestaw do izolacji DNA z krwi QIAamp DSP	Bilirubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Trójgliceryd	18,2 g/L
	Białko	77 - 96 g/L
Metoda Gentra PureGene	Bilirubina	200 mg/L
	Hemoglobina	200 g/L
	Trójgliceryd	18,2 g/L
	Białko	119 -146 g/L

6. Płytki PCR są fizycznie kompatybilne z większością termocyklerów dostępnych na rynku. Patrz: Tabela kompatybilności termocyklerów, poniżej.
Uwaga: Dane w tabeli należy traktować tylko jako wskazówki. W przypadku zatwierdzonych cykliów proszę zapoznać się z rozdziałem: Wymagania dotyczące instrumentu – instrument.

Tabela kompatybilności	
Producent	Termocyklery
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

OCZEKIWANE WARTOŚCI

A. Analiza danych

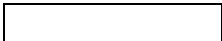
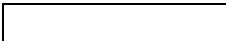
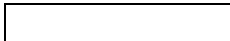
Obejrzyć dokładnie zdjęcie i określić ścieżki pozytywne.

1. Szybciej migrujący, krótszy prążek będzie widoczny na żelu, jeśli specyficzne allele HLA zostały zamplifikowane. Oznacza to pozytywny wynik testu.
 - a. Odnotować fakt obecności i nieobecności specyficznych produktów PCR.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA wraz z polimerazą Taq

- b. Przydatne w interpretacji wyników jest monitorowanie relatywnych długości specyficznych produktów PCR jakie podano w broszurze produktu specyficznej dla danej partii. Kilka reakcji ma dwie lub więcej możliwych długości specyficznych produktów PCR. Dołki te zawierają wiele par starterów generujących produkty PCR o różnych długościach, w zależności od allelu/alleli HLA próbki DNA.
 - c. Dopasować wzór ścieżek żelowych do specyficznych produktów PCR zgodnie z informacją w tabeli Specyficzności i Interpretacji specyficznej dla danej partii w celu uzyskania typowania HLA próbki DNA.
2. Prążek wewnętrznej kontroli pozytywnej, dłuższy i wolniej migrujący, jest kontrolą udanej amplifikacji. W związku z tym powinien być widoczny we wszystkich ścieżkach żelu, z wyjątkiem ścieżki z kontrolą negatywną. Prążek wewnętrznej kontroli pozytywnej może być słaby lub całkowicie nieobecny w ścieżkach pozytywnych.
 - a. Odnotować obecność i relatywne długości prążków wewnętrznej kontroli pozytywnej. Różnej wielkości prążki kontrolne pomogą w prawidłowej orientacji typowania, a także identyfikacji zestawu.
 - b. Brak prążka wewnętrznej kontroli pozytywnej i brak specyficznego produktu PCR wskazuje na to, że reakcja PCR nie powiodła się.
 - i. Jeśli allele HLA mogą być określone w przypadku nieudanej reakcji PCR, a nieudana reakcja PCR nie ma wpływu na oznaczenie alleli, wówczas testu nie trzeba powtarzać.
 - ii. Jeśli jednak nieudana reakcja PCR mogła mieć wpływ na oznaczenie alleli, wówczas typowanie należy powtórzyć.
3. Obecność specyficznego produktu PCR lub prążka wewnętrznej kontroli pozytywnej w ścieżce/ścieżkach kontroli negatywnej wskazuje na zanieczyszczenie produktem/produktami PCR i tym samym unieważnia wszystkie wyniki testu. Startery niespecyficzne łączące się ze sobą w oligomery o długości od 40 do 60 par zasad mogą być widoczne na ścieżce/ścieżkach kontroli negatywnej. Nie jest to wskaźnikiem zanieczyszczenia.

B. Interpretacja żelowa

	Reakcja pozytywna	Reakcja negatywna	Reakcja PCR nie powiodła się
Studzienka			
Prążek wewnętrznej kontroli pozytywnej			
Prążek specyficzny			
Prążek starterów			

1. Marker wielkości DNA (marker wielkości DNA 100 pz, numer produktu 103.202-100 lub marker wielkości DNA dla krótkich żeli 103.203-100) w jednej studzience na rząd, lub zgodnie wytycznymi akredytacyjnymi dla miejscowego laboratorium.
2. Choć mogą pojawić się prążki dłuższe niż prążek wewnętrznej kontroli pozytywnej, to nie powinny być one brane pod uwagę w interpretacji wyników typowania.
3. Nie zużyte startery utworzą rozproszony prążek krótszy niż 50 bp.
4. Można także zaobserwować niespecyficzne łączenie się starterów ze sobą. Tego typu artefakty mogą być obserwowane na żelu jako dłuższe niż prążek starterów, ale krótsze niż prążki specyficzne.

CHARAKTERYSTYKA SPECYFICZNEJ WYDAJNOŚCI

Kontrola jakości zestawu danej partii

Każdy roztwór starterów jest badany w stosunku do panelu 48 próbek DNA z dobrze scharakteryzowanych linii komórkowych IHWC, patrz: Arkusz Walidacyjny Linii Komórkowych specyficzny dla danej partii w broszurze produktu, Informacja specyficzna dla danej partii.

Porównane Metody - badanie 1

Było to wieloośrodkowe badanie oceniające zgodność zestawu do typowania HLA Olerup SSP® DR niskiej rozdzielczości i zestawu do typowania DNA HLA One Lambda Micro SSPTM przeprowadzone w trzech laboratoriach klinicznych w Stanach Zjednoczonych.

Przeanalizowane wyniki typowania zestawu do typowania HLA Olerup SSP® DR o niskiej rozdzielczości i zestawu do typowania DNA HLA One Lambda Micro SSPTM wykazały 98,4% (123/125; 95% CI: 94,3 – 99,8) zgodność, podczas gdy dwa niejednoznaczne wyniki Olerup zostały uznane za niezgodne. Zgodność wyniosła 100% (123/123; 95% CI: 97,1 – 100), kiedy w analizie nie uwzględniono dwóch niejednoznacznych wyników Olerup, co odzwierciedla normalną praktykę kliniczną.

Porównanie Metody - badanie 2

Badanie to miało na celu wykazanie zgodności wyników typowania allelu HLA (A, B, C, DQ) o niskiej rozdzielczości uzyskanych z badawczych zestawów do typowania HLA Olerup SSP® oraz zestawów referencyjnych One Lambda LABType SSO. Próbkę krwi pełnej ACD pobrano od 95 osób z 3 ośrodków klinicznych w Stanach Zjednoczonych. Przeprowadzono ekstrakcję DNA i uzyskane w ten sposób oczyszczone DNA przetestowano przy użyciu badawczej metody Olerup SSP® oraz referencyjnej metody One Lambda LabType SSO HLA.

Ogólna zgodność dla alleli Klasy I wyniosła 99,6% (278/279; 95% CI: 98,0 – 100). Dla alleli Klasy II uzyskano zgodność 100% (94/94; 95% CI: 96,2 – 100).

Tabela 1

Ogólna zgodność wyników Olerup SSP® i
OneLambda SSO dla alleli Klasy I i Klasy
II.

Lokus HLA	Razem	
	n/N	% zgodności (95% CI)
A	95 / 95	100 (96,2 – 100)
B	90 / 90	100 (96,0 – 100)
C	93 / 94	98,9 (94,2 – 100)
Wszystkie Loci Klasy I	278 / 279	99,6 (98,0 – 100)
Loci Klasy II (DQ)	94 / 94	100 (96,2 – 100)

Badanie powtarzalności wyników uzyskanych przy użyciu zestawu.

W badaniu porównano wyniki typowania HLA Olerup SSP® między trzema laboratoriami testującymi HLA za pomocą panelu 10 dobrze scharakteryzowanych próbek DNA, których zgodne wyniki zostały zawarte w

banku DNA HLA UCLA dla HLA Klasy I (A, B i C), powszechnych alleli Klasy II (DRB1 *, DRB3 */DRB4 */DRB5 * i DQB1 *) oraz rzadziej badanych alleli Klasy II (DQA1 *, DPA1 * i DPB1 *).

Tabela 2: Podsumowanie wyników badania powtarzalności zestawu Olerup SSP® HLA

Typ allelu HLA	% dokładności typowania n/N 95% przedział zaufania (LL, UL)	
	Wynik niejednoznaczny, uznawany za niezgodny	Wynik niejednoznaczny, uznawany za nieokreślony i wyłączony z analizy
<i>Klasa I niskiej rozdzielczości (A i B połączone)</i>	98,3 (59/60) 91,1, 100	100 (59/59) 93,9, 100
<i>Klasa I wysokiej rozdzielczości (A, B i C połączone)</i>	94,7 (142/150) 89,8, 97,7	98,6 (142/144) 95,1, 99,8
<i>Klasa II niskiej rozdzielczości (DRB1 * i DRB3 */DRB4 */DRB5 *)</i>	100 (60/60) 94,0, 100	100 (60/60) 94,0, 100
<i>Klasa II wysokiej rozdzielczości - powszechne allele (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* i DQB1*)</i>	98,3 (118/120) 94,1, 99,8	100 (118/118) 96,9, 100
<i>Klasa II wysokiej rozdzielczości Rzadziej badane allele (DQA1 *, DPA1 * i DPB1 *)</i>	83,3 (75/90) 74,0, 90,4	86,2 (75/87) 77,2, 92,7

W badaniu wykorzystano panel dziesięciu (10) próbek DNA z dobrze scharakteryzowanymi wynikami typowania HLA.

Niższe zgodności obserwowane w przypadku rzadziej badanych alleli wysokiej rozdzielczości Klasy II odzwierciedlają większą niepewność w „wynikach zgodnych” próbek DNA UCLA z uwzględnieniem niepełnej informacji o

sekwencji dostępnej dla alleli DQA1*, DPA1* i DPB1*. Dla 9 z 11 niezgodnych wyników zaobserwowanych podczas badania powtarzalności wyników (DQA1*0505 uzyskany przy użyciu Olerup SSP® w porównaniu z DQA1* 0501 deklarowanym jako „typowanie zgodne”) wszystkie trzy ośrodki testujące otrzymały ten sam wynik wskazujący na powtarzalność wyników zestawu Olerup DQA1*.

BIBLIOGRAFIA

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. Listę aktualnych alleli HLA można znaleźć na:
 - a. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla> lub
 - b. <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Problem	Przyczyna	Działanie
Brak amplifikacji (zarówno amplifikacji fragmentów wewnętrznej kontroli, jak i amplifikacji specyficznych produktów).	Za mała ilość DNA.	Zmierzyć stężenie DNA i sprawdzić, czy dodana do reakcji ilość DNA jest prawidłowa. Zanieczyszczenie RNA może spowodować przeszacowanie stężenia DNA przez pomiar spektrofotometryczny. Powtórzyć starannie ekstrakcję DNA ze świeżo przygotowanymi roztworami. Zaleca się zautomatyzowaną ekstrakcję DNA przy użyciu systemu do izolacji DNA z krwi QIAGEN EZ1 DSP.
	DNA zawiera inhibitory PCR, na przykład białka, etanol (z etapów precypitacyjnych), zanieczyszczenia złożem z fazy stałej podczas ekstrakcji DNA.	Zmierzyć jakość DNA. Zalecamy, aby współczynnik A260/A280 wynosił 1,6 – 2,0 zmierzony za pomocą spektrofotometrii UV. Należy postępować dokładnie zgodnie z protokołem izolacji DNA. Dokonać ponownego wyizolowania DNA. Zaleca się zautomatyzowaną ekstrakcję DNA przy użyciu systemu do izolacji DNA z krwi QIAGEN EZ1 DSP.
	DNA zostało wyizolowane z krwi heparynizowanej.	Należy użyć krwi nieheparynizowanej lub zastosować się do protokołów ekstrakcji DNA z krwi heparynizowanej.
	DNA jest rozpuszczane w buforze zawierającym EDTA.	Powtórzyć ekstrakcję DNA i zawiesić DNA w dH ₂ O.

Problem	Przyczyna	Działanie
Cd.: Brak amplifikacji (zarówno amplifikacji fragmentów wewnętrznej kontroli, jak i amplifikacji specyficznych produktów).	Przypadkowe dostanie się środka dezynfekcyjnego do testu.	Należy sprawdzić, w którym miejscu mógł zostać wprowadzony środek dezynfekcyjny.
	Zestawy nie są przechowywane w odpowiedniej temperaturze.	Przechowywać zestawy w temperaturze -20 °C.
	Termocykler nie działa prawidłowo.	Wykalibrować termocykler i sprawdzić program PCR. Termocykler używany rutynowo do typowania PCR-SSP powinien być kalibrowany co 6-12 miesięcy.
	Nieodpowiedni kontakt między blokiem grzejącym termocyklera a płytką do typowania SSP.	Użyć prawidłowej płytki dla 0,2 ml z cienkościnnymi dołkami, sprawdzić dane w instrukcji obsługi termocyklera.
Losowe niepowodzenie amplifikacji (drop-outs).	Folie uszczelniające PCR/wieczka probówek PCR, które nie są szczelnie zamknięte, przyczyniają się do parowania i w konsekwencji do niepowodzenia amplifikacji.	Upewnić się, że wszystkie filmy uszczelniające PCR/wieczka probówek są szczelnie zamknięte. Matę kompresyjną <i>Olerup SSP®</i> (Nr produktu 103.505-06) można położyć na wierzchu filmów uszczelniających PCR, aby zapobiec parowaniu podczas reakcji w termocyklerze.
	Błędy w nałożeniu próbek na żel.	Sprawdzić, czy prawidłowa liczba dołków została załadowana i czy każdy dołek zawiera w przybliżeniu taką samą ilość mieszaniny PCR.
	Użycie niewykalibrowanych pipet.	Wykalibrować rutynowo wszystkie pipety zgodnie z zaleceniami dostawcy.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA wraz z polimerazą Taq

Problem	Przyczyna	Działanie
	Błędy pipetowania.	Należy pipetować bardziej starannie i ostrożnie.
	Master Mix i próbka DNA nie zostały prawidłowo wymieszane przed użyciem.	Przed użyciem wymieszać je krótko przez worteksowanie. Zalecamy worteksować po każdym rzędzie.
	Do dołków została dodana nierówna objętość mieszaniny DNA - Master Mix.	Należy pipetować bardziej starannie i ostrożnie.
Słabe fragmenty wewnętrznej kontroli	Zanieczyszczony DNA.	Zmierzyć jakość DNA. Współczynnik $A_{260/280}$ zmierzony za pomocą spektrofotometrii UV powinien wynosić 1,6 - 2,0. Zanieczyszczenie RNA może spowodować przeszacowanie stężenia DNA przez spektrofotometr. Zdegradowane DNA jest widoczne jako smugi w ścieżkach żelu. Powtórzyć starannie ekstrakcję DNA ze świeżo przygotowanymi roztworami. Zaleca się zautomatyzowaną ekstrakcję DNA przy użyciu systemu do izolacji DNA z krwi QIAGEN EZ1 DSP.
	Za mała ilość DNA.	Zmierzyć stężenie DNA i dostosować do 30 ng/μl lub do 15 ng/μl dla DNA wyizolowanego przez system QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Zanieczyszczenie RNA może spowodować przeszacowanie stężenia DNA podczas pomiaru

Problem	Przyczyna	Działanie
		spektrofotometrycznego. Zdegradowane DNA jest widoczne jako smugi w ścieżkach żelu. Powtórzyć starannie ekstrakcję DNA ze świeżo przygotowanymi roztworami. Zalecamy zautomatyzowaną ekstrakcję DNA za pomocą systemu do izolacji DNA z krwi QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
Cd.: Słabe fragmenty wewnętrznej kontroli	Zbyt wysoka temperatura przyłączania starterów, termocykler nie jest wykalibrowany.	Wykalibrować termocykler i sprawdzić program PCR. Termocykler używany rutynowo do typowania PCR-SSP powinien być kalibrowany co 6-12 miesięcy.
	Master Mix PCR był przechowywany w temperaturze + 4 °C przez okres dłuższy niż 2 tygodnie.	Przechowywać Master Mix PCR w sposób zgodny z zaleceniami.
Amplifikacja niespecyficzna (drabinki lub smugi)	Użycie nadmiaru próbki DNA.	Zmierzyć stężenie DNA i rozcieńczyć do 30 ng/μl lub do 15 ng/μl dla DNA wyizolowanego przez system QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Niektóre startery wykazują większą tendencję do niespecyficznego amplifikacji, patrz: przypis na Tabeli Specyficzności specyficznej dla danej partii.
	Zanieczyszczone DNA.	Wszystkie fragmenty większe niż fragment kontroli wewnętrznej

Problem	Przyczyna	Działanie
		należy pominąć podczas interpretacji uzyskanych wyników. Sprawdzić jakość DNA. Powtórzyć ekstrakcję DNA. Zaleca się zautomatyzowaną ekstrakcję DNA przy użyciu systemu do izolacji DNA z krwi QIAGEN EZ1 DSP. Niektóre startery wykazują większą tendencję do niespecyficznego amplifikacji, patrz: przypis na Tabeli Specyficzności specyficznej dla danej partii.
Słabnięcie prążków na żelu w miarę upływu czasu	Stary roztwór bromku etydy do barwienia żelu agarozowego.	Przygotować świeży roztwór bromku etydy do uzyskania lepszego barwienia żelu agarozowego i lepszego sygnału. „Chmurka” niezwiązanych starterów jest widoczna na żelu, jeśli zabarwienie żelu agarozowego jest prawidłowe.
	Jedna z lamp UV jest uszkodzona.	Sprawdzić urządzenie do oświetlania UV. „Chmurka” niezwiązanych starterów jest widoczna na żelu, jeśli światło UV jest prawidłowe.
	Użyto za mało próbki DNA.	Zmierzyć stężenie DNA i dostosować do 30 ng/μl lub do 15 ng/μl dla DNA wyizolowanego przez system QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA wraz z polimerazą Taq

Problem	Przyczyna	Działanie
	Zbyt wysoka temperatura przyłączania starterów, termocykler nie jest wykalibrowany.	Wykalibrować termocykler i sprawdzić program PCR. Termocykler używany rutynowo do typowania PCR-SSP powinien być kalibrowany co 6-12 miesięcy.
Nieoczekiwane wzory amplifikacji	Użyto niewłaściwej Tabeli interpretacji/arkusza specyficznych dla danej partii.	Sprawdzić numer wykorzystanej partii produktu oraz Tabeli interpretacji/arkusza.
	Niewłaściwa kolejność nałożenia żelu.	Sprawdzić ustawienie mieszanin i ścieżek żelu.
	Wzór amplifikacyjny zawiera wyniki fałszywie dodatnie.	Patrz poniżej.
	Wzór amplifikacyjny zawiera wyniki fałszywie ujemne.	Patrz poniżej.
Amplifikacje fałszywie dodatnie	Zanieczyszczenie DNA.	Używać rękawiczek, końcówek do pipet z filtrem oraz oddzielnych pomieszczeń do przygotowania reakcji PCR i pracy z próbkami po reakcji PCR. Upewnić się, że na każdym etapie wszystkie próbki są dokładnie pipetowane. Sprawdzić poziom zanieczyszczenia przy użyciu zestawu <i>Olerup SSP® Wipe Test</i> .
	Zanieczyszczone DNA.	Zmierzyć jakość DNA. Należy postępować dokładnie zgodnie z protokołem izolacji DNA. Spróbować innych metod izolacji DNA. Dokonać ponownego wyizolowania DNA. Zalecamy zautomatyzowaną ekstrakcję DNA za

Problem	Przyczyna	Działanie
		pomocą systemu do izolacji DNA z krwi QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Użycie nadmiaru DNA.	Zmierzyć stężenie DNA i rozcieńczyć do 30 ng/μl lub do 15 ng/μl dla DNA wyizolowanego przez system QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Zbyt niska temperatura przyłączania starterów.	Wykalibrować termocykler i sprawdzić program PCR. Termocykler używany rutynowo do typowania PCR-SSP powinien być kalibrowany co 6 -12 miesięcy.
	Zbyt duże opóźnienie między nastawieniem reakcji PCR a rozpoczęciem amplifikacji.	Opóźnienie przed amplifikacją nie powinno być większe niż 5 min.
	Opóźnienie między umieszczeniem płytek do typowania w termocyklerze a rozpoczęciem cyklingu.	Użyć wstępnie ogrzanego termocyklera.
Cd.: Amplifikacje fałszywie dodatnie	Użyto nadmiaru bromku etydyny.	Użyć zalecanej ilości bromku etydyny.
	Niewłaściwa interpretacja artefaktu jako specyficznego prążka.	Sprawdzić rozmiar prążka przy użyciu odpowiedniej Tabeli Interpretacyjnej i Tabeli Specyficzności wraz z przypisami.
	Wzór amplifikacyjny zawiera wyniki fałszywie dodatnie.	Sprawdzić, czy wszystkie specyficzne amplifikacje mają prawidłowy rozmiar oraz czy artefakt (przeniesienie, dimer starterów) nie został błędnie zinterpretowany jako amplifikacja.
	Niewłaściwa kolejność nałożenia próbek na żel.	Sprawdzić ustawienie płytki z produktami PCR względem ścieżek żelu.

Problem	Przyczyna	Działanie
Amplifikacje fałszywie ujemne	Termocykler nie jest właściwie skalibrowany.	Wykalibrować termocykler i sprawdzić program PCR. Termocykler używany rutynowo do typowania PCR-SSP powinien być kalibrowany co 6-12 miesięcy. Jeśli rekalkibracja nie przyniosła rezultatu, przeprowadzić ponownie test typowania przy użyciu próbki referencyjnej o takiej samej specyficzności. Jeśli wynik negatywny potwierdzi się, należy skontaktować się z działem obsługi klienta.
	Niewłaściwa kolejność nałożenia próbek na żel.	Sprawdzić ustawienie płytki z produktami PCR względem ścieżek żelu.
Ogólne problemy z żelem (rozmyte żele i/lub ścieżki ze smugami).	Zdegradowana próbka DNA.	Uwidacznia się jako smuga w ścieżkach żelu. Wyizolować DNA ze świeżej próbki.
	Wyraźne smugi w losowych dołkach.	Nierównomierne zawieszenie DNA. Upewnić się, czy próbka DNA została rozpuszczona przed pobraniem porcji. Zworteksować rozpuszczoną próbkę DNA.
	Produkt PCR wypłynął z dołka.	Przyłożyć ostrożnie końcówkę pipety do dołka w żelu i powoli dozować próbkę.
	Bufor elektroforetyczny mógł być za ciepły.	Przygotować nowy bufor TBE. Przeprowadzić elektroforezę przy niższym napięciu.
	Zastosowanie żelu agarozowego o	Należy się upewnić, że użyto zalecany 2% żel

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA wraz z polimerazą Taq

	nieprawidłowym stężeniu agarozy.	agarozy.
	Agaroza niekompletnie rozpuszczona.	Krótko ponownie podgrzewać agarozę do jej rozpuszczenia.
	Niewłaściwe stężenie TBE.	Użyć zalecanego stężenia 0,5 x TBE.
	Użyto zbyt świeżo wylanych żeli.	Należy używać żeli nie wcześniej niż 15 min po ich wylaniu.
	Zbyt stare żele.	Nie należy wylewać żeli z nazbyt dużym wyprzedzeniem czasowym.
	Użyty grzebień żelowy ma zbyt grube szczeliny.	Używać cienkich grzebieni (4 x 1 mm).
	Saneczki nie są przepuszczalne dla światła UV.	Przed oglądaniem usunąć żel z saneczek.
	Zdjęcie żelu zbyt jasne.	Użyto zbyt dużo bromku etydyny. Sprawdzić ustawienia kamery.
	Zdjęcie żelu zbyt ciemne.	Użyć zalecanej ilości bromku etydyny. Sprawdzić ustawienia kamery.
Ogólne problemy z amplifikacją fałszywie dodatnią lub problemy podobnej natury związane z przebiegiem procesu amplifikacji	Zbyt wysokie ustawienie współczynnika ramp.	Zestawy Olerup SSP są zwalidowane przy użyciu termocyklera GeneAmp 9700 ustawionego w trybie 9600 i ProFlex ze współczynnikiem ramp 3 °C/s. Wyższe współczynniki ramp niż równoważne do tych podanych powyżej mogą mieć wpływ na wyniki typowania.

ZNAKI HANDLOWE UŻYTE W TYM DOKUMENCIE/PRODUKCIE

Olerup SSP® jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CareDx AB.
Qiagen™ jest znakiem towarowym firmy QIAGEN.

GWARANCJA

CareDx AB gwarantuje nabywcy, że jego produkty pozbawione są wad materiałowych i wykonawczych, pod warunkiem ich normalnego użytkowania i stosowania. CareDx AB zobowiązuje się do wymiany, bez żadnych opłat, każdego produktu, który nie spełnia standardów jakości określonych w arkuszu specyfikacji produktu.

Niniejsza gwarancja dotyczy wyłącznie produktów, z którymi obchodzono się i które przechowywano zgodnie z zaleceniami CareDx AB, i nie dotyczy produktów, które zostały zmodyfikowane lub były niewłaściwie używane czy też stosowane niezgodnie ze swoim przeznaczeniem.

Wszelkie reklamacje w ramach niniejszej gwarancji należy kierować bezpośrednio do CareDx AB na piśmie wraz z kopią faktury. Niniejsza gwarancja zastępuje wszelkie inne gwarancje, wyrażone lub domniemane, w tym gwarancje przydatności handlowej i przydatności do określonego celu. W żadnym wypadku CareDx AB nie ponosi odpowiedzialności za szkody przypadkowe lub wtórne.

Niniejszy produkt nie może być przeformułowany, przepakowywany ani odsprzedawany w jakiejkolwiek formie bez pisemnej zgody CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Sztokholm, Szwecja.

Ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się tak, jak z próbkami zakaźnymi. Podczas pracy z nimi należy zawsze używać rękawiczek ochronnych oraz innego rodzaju adekwatnego zabezpieczenia.

OKRES GWARANCJI

CareDx AB gwarantuje, że startery na płytkach do typowania Olerup SSP® mają specyficzność podaną w Tabelach Interpretacji i Specyficzności specyficznych dla danej partii zamieszczonych w broszurze produktu.

ADRESY:

Producent:

CareDx AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Szwecja

Tel.: +46-8-508 939 00

Faks: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Strona internetowa: <http://www.labproducts.caredx.com>

Dystrybucja:

CareDx AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Szwecja

Tel.: +46-8-508 939 00

Faks: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Strona internetowa: <http://www.labproducts.caredx.com>

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

Tel.: 1-877-653-7871

Faks: 610-344-7989

E-mail: orders-us@caredx.com

Strona internetowa: <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

Strona internetowa: <http://www.labproducts.caredx.com/>

Aby uzyskać informacje na temat dystrybutorów CareDx na całym świecie, należy skontaktować się z CareDx AB.

0412-LBL v02 Zestaw do typowania HLA Olerup SSP® wraz z polimerazą Taq został przetłumaczony na język polski z anglojęzycznego dokumentu 0192-LBL v04 IFU Olerup SSP® HLA typing kit w Taq.

Zmiany w wersji 0192-LBL v04 w porównaniu do wersji 0192-LBL v03:

1. Zmieniono dane kontaktowe.

Zmiany w wersji 0192-LBL V03 w porównaniu do wersji 0192-LBL V02:

1. Data dodania zmiany.
2. Dokumenty objaśniające informacje podane w broszurze produktu specyficznej dla danej partii.
3. CareDx Pty Ltd dodano jako dystrybutora.