



Instrukcja użytkowania

Olerup SSP[®]
bez polimerazy 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 błędu 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. Skraca 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 etydyny 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. Olerup 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 bez polimerazy *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 mieszankę 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.cardex.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 odczynników podczas reakcji PCR. Nie należy używać pasków z wieczkami PCR z pęknięciami, ponieważ może to spowodować parowanie odczynników podczas reakcji 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 próbki** 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 bez polimerazy Taq

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

Szczegółowe informacje na temat termocyklera znajdują się w instrukcji obsługi producenta. Termocykler powinien być skalibrowany 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 prążków 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. Probki 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 bez polimerazy *Taq* (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 etydydny z kropłomierzem, 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
19. Polimeraza *Taq* DNA Roche, GMP Grade. [Katalog # 03 734 927 001 (1000 U) lub # 03 734 935 001 (5000 U)].

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 polimerazę *Taq* (5 jednostek/μl), przechowywać w temperaturze -20 °C.
3. 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 żeły (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 kuchenie mikrofalowej aż do uzyskania jednorodnego roztworu 100 ml.
- Rozpuszczony roztwór żelu pozostawić do schłodzenia do temperatury 60°C, np. w ciepłarni.
- 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.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

- Wlać 750 ml 0,5x stężonego buforu TBE do aparatu do elektroforezy. 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 i Taq polimerazy (5 jednostek/μl) 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 płytce.
4. **Zestawy niskiej i wysokiej rozdzielczości**
 - Zworteksować Master Mix przed jego rozporcjowaniem.
 - Za pomocą jednokanałowej pipety dodać w temperaturze pokojowej Master Mix, Taq polimerazy (5 jednostek/μl) 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.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

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

Liczba dołków w na test	Objętość Master Mix (μl)	Objętość próbki DNA (μl)	Objętość dH ₂ O (μl)	Objętość Taq polimerazy (μl)	Liczba dołków na test	Objętość Master Mix (μl)	Objętość próbki DNA (μl)	Objętość dH ₂ O (μl)	Objętość Taq polimerazy (μl)
2	12	8	19,7	0,3	25	87	58	142,7	2,3
3	15	10	24,6	0,4	26	90	60	147,6	2,4
4	18	12	29,5	0,5	27	93	62	152,5	2,5
5	21	14	34,4	0,6	28	96	64	157,4	2,6
6	24	16	39,4	0,6	29	99	66	162,4	2,6
7	27	18	44,2	0,8	30	102	68	167,3	2,7
8	30	20	49,2	0,8	31	105	70	172,2	2,8
9	33	22	54,1	0,9	32	108	72	177,1	2,9
10	36	24	59	1,0	36	126	84	206,6	3,4
11	39	26	63,9	1,1	40	138	92	226,3	3,7
12	42	28	68,9	1,1	44	150	100	246	4,0
13	45	30	73,8	1,2	48	162	108	265,7	4,3
14	48	32	78,7	1,3	52	174	116	285,4	4,6
15	51	34	83,6	1,4	56	186	124	305	5,0
16	54	36	88,6	1,4	60	198	132	324,7	5,3
17	60	40	98,4	1,6	64	210	140	344,4	5,6
18	63	42	103,3	1,7	68	228	152	373,9	6,1
19	66	44	108,2	1,8	72	240	160	393,6	6,4
20	69	46	113,2	1,8	76	252	168	413,3	6,7
21	72	48	118,1	1,9	80	264	176	433	7,0
22	75	50	123	2,0	84	276	184	452,6	7,4
23	78	52	127,9	2,1	88	288	192	472,3	7,7
24	81	54	132,8	2,2	92	300	200	492	8,0
					96	312	208	511,7	8,3

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 ręcznej pipety jednokanałowej dodać w temperaturze pokojowej 8,3 μl Taq polimerazy (5 jednostek/μl) i 511,7 ml dH₂O do dostarczonej próbki 1,5 ml 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 probówki.
- Za pomocą pipety jednokanałowej dodać 8 μl mieszaniny Master Mix – Taq polimerazy – 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 – Taq polimerazy – dH₂O.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy 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.

5. 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.
6. 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.
7. Wprowadzić swój numer programu *Olerup SSP®*. Zdefiniować objętość reakcyjną na 10 µl.
8. Uruchomić program PCR. Program trwa około 1 godz. i 20 min.
9. 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, 2012 Normy ostateczne zatwierdzone przez zarząd ASHI: styczeń 2013, ostateczna wersja wytycznych październik 2012). Dołek kontroli negatywnej znajduje się we wszystkich zestawach od partii 01V (zestaw DQ niskiej rozdzielczości, od partii 06Y).

Patrz także: Interpretacja żelu, s. 14.

WYNIKI

Specyficzne dla danej partii Arkusze walidacji linii komórkowych i Świadectwa 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 w 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 bez polimerazy 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 cyklierów 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
Agilent (Stratagene)	GeneAmp 2700, 2720, 9600
	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
Bio-Rad	TProfessional
	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
Eppendorf	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 with 96-well block
	Mastercycler Gradient
MWG	Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus
	Primus 96
Thermo Scientific	TheQ Lifecycler
	Arktik
	Flexigene, TC-412, TC-4000
	Genius, Touchgene, TC-512, TC-5000
Thermo Scientific Hybaid	TC-PLUS, Prime, PrimeG, Prime Elite
	PCR Express, Px2, PxE
	MultiBlock System & MBS
	Omnigene, Omn-E
Gene Technologies	GS1, GS4, GSX
Takara	TP 3000

7. Wydajność tego zestawu przy użyciu Master Mix bez polimerazy Taq została zwalidowana tylko przy użyciu polimerazy DNA Taq Roche, GMP Grade (nr kat. # 03 734 927 001 lub #03 734 935 001). Wydajność testu przy użyciu innych enzymów nie jest znana i musi być ustalona i zwalidowana przez użytkownika.

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. Odnosić fakt obecności i nieobecności specyficznych produktów PCR.
 - 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. Odnosić 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.

Porównanie Metod

Badanie przeprowadzono w celu porównania zestawów do typowania HLA Olerup SSP® z polimerazą i bez polimerazy Taq dostarczonej w Master Mix PCR. Celem badania było wykazanie, że ręczne dodanie polimerazy nie ma wpływu na wyniki testu i że różne serie (partie) polimerazy Taq dają te same wyniki. Badanie 0419-LBL v02 Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

przeprowadzono w zakresie typowania HLA-A, -B (Klasa I) i –DRB (Klasa II) niskiej rozdzielczości 15 próbek DNA ze znanym genotypem HLA uzyskanych z International Histocompatibility Workshop Collection. Próbkę były przygotowane i kodowane przez personel inny niż ten, który przeprowadzał badanie; personel przeprowadzający badanie nie znał typów HLA próbek. Każda próbka była badana równolegle przy użyciu zestawu HLA-A-B-DR Combi Tray Olerup SSP® z Master Mix bez polimerazy Taq („Test”) i zestawu HLA-A-B-DR Combi Tray Olerup SSP® z Master Mix zawierającym polimerazę Taq („Kontrola”), zgodnie z instrukcją dołączoną do każdego produktu. Wszystkie testy zostały przeprowadzone w Laboratorium Olerup SPP AB w Sztokholmie w Szwecji, przy użyciu jednej partii zestawu i dwóch partii polimerazy Taq. W badaniu używano polimerazy DNA Taq Roche, GMP Grade. Badanie każdej próbki składało się z typowania niskiej rozdzielczości przy użyciu zestawu HLA-A-B-DR Combi Tray Olerup SSP® przeprowadzonego z: 1) Master Mix PCR zawierającym polimerazę Taq (test zatwierdzony przez FDA) (test kontrolny), 2) Master Mix PCR plus polimeraza DNA Taq Roche, GMP Grade, 5U/μl; Lot#1 (Lot testu#1), i 3) Master Mix PCR plus polimeraza DNA Taq Roche, GMP Grade, 5U/μl; Lot#2 (Lot testu#2). Po reakcji PCR, przeprowadzono detekcję przy użyciu elektroforezy żelowej. Wyniki podsumowano poniżej.

Porównanie	Zgodność			
	Wyniki typowania w zakresie Klasy I (# zgodna/całkowita)		Wyniki typowania w zakresie Klasy II (# zgodna/całkowita)	% Zgodności (95% przedział zaufania ^a)
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Test Lot#1/Lot kontrolny	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Test Lot#1/Konsensus ^b	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Test Lot#2/Lot kontrolny	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Test Lot#2/Konsensus	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Test Lot#1/Test Lot#2	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)

^a Metoda Score

^b Wyniki zgodne z International Histocompatibility Workshop Collection

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.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

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 grzejnym 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 Olerup SSP® (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.
Problem	Przyczyna	Działanie

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

	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 A260/A280 powinien wynosić 1,6 – 2,0 zmierzony za pomocą spektrofotometrii UV. 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

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

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 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

Problem	Przyczyna	Działanie
		kontroli wewnętrznej 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 w celu 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 bez polimerazy 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 Interpretacyjnej specyficznej dla danej partii.	Sprawdzić numer danej partii produktu oraz to, jaką tabelą Interpretacyjną/Arkusze m Roboczym się posłużono.
	Niewłaściwa kolejność nałożenia próbek na żel.	Sprawdzić ustawienie płytki z produktami PCR względem 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 Olerup SSP® Wipe Test.
	Zanieczyszczone DNA.	Zmierzyć jakość DNA. Należy postępować dokładnie zgodnie z protokołem izolacji DNA. Spróbować innych metod izolacji DNA.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

		Dokonać ponownego wyizolowania DNA.
Problem	Przyczyna	Działanie
		Zalecamy zautomatyzowaną ekstrakcję DNA za 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

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

		błędnie zinterpretowany jako amplifikacja.
Problem	Przyczyna	Działanie
	Niewłaściwa kolejność nałożenia próbek na żel.	Sprawdzić ustawienie płytki z produktami PCR względem ścieżek żelu.
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.

Instrukcja użytkowania
Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq

		Przeprowadzić elektroforezę przy niższym napięciu.
--	--	--

Problem	Przyczyna	Działanie
	Zastosowanie żelu agarozowego o nieprawidłowym stężeniu agarozy.	Należy się upewnić, że użyto zalecany 2% żel agarozowy.
	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 etydy. Sprawdzić ustawienia kamery.
	Zdjęcie żelu zbyt ciemne.	Użyć zalecanej ilości bromku etydy. 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.

0419-LBL v02 Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

ZNAKI HANDLOWE UŻYTE W TYM DOKUMENCIE/PRODUKCIE

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

INFORMACJA DLA KUPUJĄCEGO: Zestawy *Olerup SSP®* bez polimerazy *Taq* – Produkt ten jest zoptymalizowany do pracy z polimerazą *Taq* Roche, GMP Grade (nr kat. 03 734 927 001 lub 03 734 935 001) w Procesie Reakcji Łańcuchowej Polimerazy („PCR”), który może być objęty patentami Roche Molecular Systems, Inc. i F. Hoffman-La Roche Ltd. („Roche”). Laboratorium jest odpowiedzialne za kontakt z Roche Molecular Systems, Inc. w celu ustalenia czy potrzebna jest licencja w ramach tych patentów.

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 jakiegokolwiek formie bez pisemnej zgody *CareDx AB*, Franzégatan 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.

0419-LBL v02 Olerup SSP® zestaw do typowania HLA bez polimerazy Taq został przetłumaczony na język polski z anglojęzycznego dokumentu 0193-LBL v04 Olerup SSP® HLA typing kits without Taq polymerase.

Zmiany w wersji 0193-LBL v04 w porównaniu do wersji 0193-LBL v03:

1. Zmieniono dane kontaktowe.

Zmiany w wersji 0193-LBL v03 w porównaniu do wersji 0193-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.