



# Lietošanas instrukcija

## Olerup SSP<sup>®</sup> bez Taq polimerāzes

© 2023 CareDx, Inc. Visas pakalpojumu zīmes vai preču zīmes pieder vai ir licencētas CareDx, Inc. vai tā saistītajiem uzņēmumiem. Visas tiesības aizsargātas.

1591-LBL v02 Olerup SSP<sup>®</sup> HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes

*In vitro* diagnostikai

Pārskatīta 2023. gada septembris



1. lpp. no 28

## In vitro diagnostikai

### PAREDZĒTAIS LIETOJUMS

Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti ir kvalitatīvi *in vitro* diagnostikas testi HLA I klases un HLA II klases alēļu DNS tipizēšanai. Produktus izmanto apmācīti profesionāļi medicīnas iestādēs, lai noteiktu HLA fenotipu. Pārbaudāmais izejmateriāls ir DNS.

### KOPSAVILKUMS UN SKAIDROJUMS

Cilvēka leukocītu antigēnus (*Human leukocyte antigens* — HLA) agrāk noteica ar limfocitotoksicitātes testu. Tomēr šis tests ir aizstāts ar DNS tipizēšanas metodēm, kuru pamatā ir polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR), jo tā kļūdu biežums un alēļu līmeņa izšķirtspējas trūkums. Lielākajā daļā metožu, kuru pamatā ir PĶR, PĶR process tiek izmantots tikai kā nepieciešamās mērķa DNS amplifikācijas solis, un ir nepieciešams pēc-amplifikācijas solis, lai atšķirtu dažādas alēles. Turpretim PĶR-SSP metodoloģijā (secībai specifisks praimeris (*sequence-specific primer* — SSP)) dažādo alēļu atšķiršana notiek PĶR procesa laikā. Tas saīsina un vienkāršo pēc-pastiprināšanas soli līdz vienkāršai gela elektroforēzes noteikšanas solim. SSP testa rezultāti ir pozitīvi vai negatīvi, kas novērš nepieciešamību pēc sarežģītas rezultātu interpretācijas. Turklāt PĶR-SSP tipizēšanas izšķirtspēja ir augstāka nekā citām uz PĶR balstītām tipizēšanas metodēm, jo katrs praimera pāris nosaka divus secības motīvus, kas atrodas *cis*, t. i., tajā pašā hromosomā. Turklāt SSP reaģentu sintētiskā rakstura dēļ ir uzlabota stabilitāte un samazinātas daudzu partiju atšķirības.

### PROCEDŪRAS PRINCIPS

PĶR-SSP metodoloģijas pamatā ir princips, ka pilnīgi vai gandrīz pilnīgi piesaistījušies oligonukleotīdu praimeru bez nepārotiem 3 galiem tiek efektīvāk izmantoti PĶR reakcijā nekā nepāroti praimeru ar termostabilām DNS polimerāzēm bez korektūras īpašībām. Praimeru pāri ir paredzēti, lai tos pārotu ar atsevišķām alēlēm vai alēļu grupu(-ām), atkarībā no nepieciešamās tipizēšanas izšķirtspējas pakāpes. Stingri kontrolētos PĶR apstākļos piesaistīti vai gandrīz pilnīgi piesaistīti praimeru pāri ļauj notikt amplifikācijai, t. i., rodas pozitīvs rezultāts, turpretim nepiesaistīti praimeru pāri neļauj notikt amplifikācijai, t. i., rodas negatīvs rezultāts.

Pēc PĶR procesa pastiprinātie DNS fragmenti tiek atdalīti pēc izmēra, piem., ar agarozes gela elektroforēzi, vizualizēti, krāsojot ar etīdija bromīdu un pakļaujot ultravioleto gaismu, dokumentēti ar fotogrāfiju un interpretēti. PĶR-SSP rezultātu interpretācija balstās uz specifiska(-u) PĶR produkta(-u) esamību vai neesamību. Konkrētā(-o) PĶR produkta(-u) relatīvie izmēri var būt noderīgi rezultātu interpretācijā. PĶR-SSP metodoloģiju HLA sākotnēji aprakstīja O. Olerups 1991. un 1992. gadā<sup>1,2</sup>.

Tā kā PĶR procesu var nelabvēlīgi ietekmēt dažādi faktori (piemēram, pipetēšanas kļūdas, pārāk zema DNS koncentrācija, slikta DNS kvalitāte, PCR inhibitoru klātbūtne, amplifikatora neprecizitāte), katrā PĶR reakcijā tiek iekļauts iekšējais pozitīvās kontroles praimeru pāris<sup>2</sup>. Iekšējais pozitīvās kontroles praimeru pāris atbilst cilvēka augšanas hormona gēna konservētajiem reģioniem, kas atrodas visos cilvēka DNS paraugos. Konkrēta HLA alēles(-u) PĶR produkta klātbūtnē iekšējās pozitīvās kontroles joslas produkts var būt vājš vai nebūt. Konkrēto HLA praimeru pāru ģenerētie

amplikoni ir īsāki nekā iekšējā pozitīvās kontroles praimeru pāra amplikoni, bet lielāki par neinkorporētajiem praimeriem (skatiet sadaļu “Paredzamās vērtības”).

## REAĢENTI

### A. Identifikācija

Olerup SSP® tipizēšanas komplekti satur žāvētus, iepriekš optimizētus, secībai specifiskus praimerus HLA alēļu un cilvēka augšanas hormona gēna PĶR amplifikācijai, PĶR Master Mix bez Taq polimerāzes (“Master Mix”) un adhezīvus PĶR blīvījumus.

Praimeru šķīdumus iepriekš sadala alikvotos un žāvē 0,2 ml iedobēs sagrieztu, plānsienu PĶR paplātēm. Katrā paplātes iedobē ir žāvēts praimeru šķīdums, kas sastāv no noteikta praimera maisījuma, t. i., alēlei un grupai specifiski HLA praimeru, kā arī iekšējais pozitīvās kontroles praimeru pāris, kas atbilst nealēliskām sekvencēm un ir gatavi DNS parauga, Master Mix un H<sub>2</sub>O pievienošanai.

Praimeri ir paredzēti optimālai PĶR pastiprināšanai, izmantojot Master Mix un ieteicamo DNS cikla programmu (skatiet sadaļu “Amplifikatora programmēšana”).

Partijai raksturīgajās specifikācijās un interpretācijas tabulas vai darblapas konkrētajām HLA alēlēm, ko pastiprina katrs praimera maisījums, var izgūt tīmekļa vietnē [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### B. Brīdinājumi un piesardzība lietošanā

1. *In vitro* diagnostikai.
2. Šo produktu nevar lietot kā vienīgo pamatu klīniska lēmuma pieņemšanai.
3. **Bioloģiskas bīstamības brīdinājums.** Visi asins produkti jāuzskata par potenciāli infekcioziem. Neviena zināma(-as) testēšanas metode(-as) nevar sniegt garantiju, ka produkti, kas iegūti no cilvēka asinīm, nepārnēsās infekcijas izraisītājus.
4. **Bioloģiskas bīstamības brīdinājums.** Etīdija bromīds, ko izmanto DNS krāsošanai agarozes gela elektroforēzē, ir kancerogēns. Rīkojieties ar atbilstošiem individuālajiem aizsardzības līdzekļiem.
5. **Uzmanību!** Valkājiet UV bloķējošu acu aizsargu un, skatoties vai fotografējot gelus, neskatieties tieši uz UV gaismas avotu.
6. Pipetes un citu aprīkojumu, ko izmanto manipulācijām **pēc** PĶR, **nedrīkst** izmantot manipulācijām **pirms** PĶR.
7. Detalizētu informāciju skatiet drošības datu lapā ([www.caredx.com](http://www.caredx.com)).

### C. Lietošanas instrukcija

Skatiet lietošanas instrukciju.

### D. Uzglabāšanas instrukcijas

Uzglabājiet komplekta sastāvdaļas tumsā un temperatūrā, kas norādīta uz iepakojuma etiķetēm.

Izlietojiet pirms derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz iepakojuma etiķetes.

**E. Attīrīšana vai ārstēšana, kas nepieciešama lietošanai**

Skatiet lietošanas instrukciju.

**F. Nestabilitātes indikācijas**

1. Neizmantojiet praimeru paplātes ar plaisām iedobēs vai iedobes augšējās malas bojājumiem, jo tas var izraisīt iztvaikošanu PĶR pastiprināšanas laikā. Neizmantojiet PĶR vāciņu sloksnes ar plaisām, jo tas var izraisīt iztvaikošanu PĶR pastiprināšanas laikā.
2. Granulām iedobēs jābūt sarkanā krāsā. Granulu dzeltenā krāsa var liecināt par degradāciju.
3. Master Mix krāsai jābūt no sarkanas līdz violetai krāsai. Dzeltenas līdz oranžas krāsas maiņa var liecināt par degradāciju.

**PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ INSTRUMENTIEM****A. Instruments**

Jāizmanto amplifikators ar turpmāk minētajām minimālajām specifikācijām.

- apsildāms vāks ar 104 °C temperatūru darbam bez eļļas
- paraugu bloks (alumīnijs, sudrabs vai apzeltīts sudrabs) lietošanai ar 96 iedobju PĶR plati vai 0,2 ml plānsienu reakcijas mēģenēm
- Olerup SSP komplekti ir apstiprināti šādiem amplifikatoriem.  
Ieteicamais rampas ātrums:
  - GeneAmp 9700. GeneAmp 9700 amplifikators iestatīts uz 9600 režīmu. Tas atbilst **parauga rampas ātrumam** 1,6 °C/s uz augšu un 0,8 °C/s uz leju.
  - ProFlex 1x96 iedobju bloks. ProFlex PĶR amplifikators ar bloka rampas ātrumu 3,0 °C/s (katrs solis 3,0 °C/s). **Bloka rampas ātrums** 3,0 °C/s atbilst parauga rampas ātrumam 1,52 °C/s uz augšu un 1,36 °C/s uz leju.
  - ProFlex 2x96 iedobju bloks. ProFlex PĶR amplifikators ar bloka rampas ātrumu 3,0 °C/s (katrs solis 3,0 °C/s). **Bloka rampas ātrums** 3,0 °C/s atbilst parauga rampas ātrumam 1,9 °C/s uz augšu un 1,6 °C/s uz leju.

***Piezīme. Lielāks rampas ātrums nekā iepriekš aprakstītie var ietekmēt tipizēšanas rezultātus. Lūdzu, ņemiet vērā arī to, ka ietekme uz tipizēšanu dažādiem neapstiprinātiem amplifikatoriem var atšķirties atkarībā no iestatījumiem.***

- temperatūras diapazons no 4,0 °C līdz 99,9 °C
- temperatūras precizitāte  $\pm 0,25$  °C diapazonā no 35 °C līdz 99,9 °C
- paraugu bloka temperatūras vienmērība  $\leq 0,75$  °C diapazonā no 55 °C līdz 95 °C
- temperatūras kalibrēšana, kas izsekojama līdz atsauces standartam (t. i., NIST)

Programmējiet amplifikatoru, izmantojot PĶR cikla parametrus tālāk B sadaļā.

Konkrētu informāciju par amplifikatoru skatiet ražotāja lietotāja rokasgrāmatā. Amplifikatori jākalibrē saskaņā ar Amerikas Histokompatibilitātes un imunoģenētikas biedrība (*American Society of Histocompatibility and Immunogenetics* — ASHI) vai Eiropas imunoģenētikas federācija (*European Federation of Immunogenetics* — EFI) akreditācijas noteikumiem.

Pirms tālāk aprakstītās lietošanas instrukcijas ieprogrammējiet amplifikatoru.

**B. PĶR cikla parametri**

1.	1 cikls	94 °C	2 min	denaturācija
2.	10 cikli	94 °C	10 sek.	denaturācija
		65 °C	60 sek.	atkausēšana un paplašinājums
3.	20 cikli	94 °C	10 sek.	denaturācija
		61 °C	50 sek.	atkausēšana
		72 °C	30 sek.	paplašinājums
4.	Beigas — turiet	RT		ja mazāk par 8 stundām
	4 °C			ja ilgāk par 8 stundām

Kopējais reakcijas tilpums katrā iedobē, 10 µl.

Visiem Olerup SSP® komplektiem tiek izmantoti tie paši PĶR cikla parametri.

**PARAUGU ŅEMŠANA UN SAGATAVOŠANA**

SSP tipizēšanai ir nepieciešama ekstrahēta, ļoti tīrs DNS. DNS paraugi, kas tiks izmantoti PCR-SSP HLA tipizēšanai, atkārtoti suspendēti dH<sub>2</sub>O. A<sub>260/280</sub> attiecībai jābūt 1,6–2,0 ar UV spektrofotometriju, lai elektroforēzes laikā būtu optimāla joslas vizualizācija.

Iesakām automatizētu DNS ekstrakciju ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu. Kā izejmateriāls jāizmanto ACD asinis.

Alternatīvi, DNS var ekstrahēt ar jebkuru vēlamu metodi, iegūstot tīru DNS. Izmantojot alternatīvas metodes, DNS koncentrācija jāpielāgo līdz pat 30 ng/µl. **Ar šīm metodēm neizmantojiet heparinizētas asinis.**

Ieteicamā DNS koncentrācija, izmantojot:  
EZ1 ekstrahēta DNS, 15 ng/µl.  
DNS ekstrahēta ar citām metodēm, 30 ng/µl.

Koncentrācija, kas pārsniedz 50 ng/µl, palielinās nespecifisku pastiprinājumu un vāju papildu joslu risku, īpaši HLA I klases augstas izšķirtspējas SSP tipizēšanai. Ja nepieciešams, ekstrahēto DNS atšķaida dH<sub>2</sub>O.

**DNS paraugus nedrīkst atkārtoti suspendēt šķīdumos, kas satur helātus veidojošos līdzekļus, piemēram, EDTA, kuru koncentrācija pārsniedz 0,5 mM.**

DNS paraugus var izmantot tūlīt pēc ekstrahēšanas vai uzglabāt +4 °C temperatūrā līdz 2 nedēļām bez nelabvēlīgas ietekmes uz rezultātiem. DNS paraugus var uzglabāt -20 °C vai aukstākā temperatūrā 9 mēnešus. Pirms HLA tipizēšanas jāpārbauda ekstrahēto DNS paraugu tīrība un koncentrācija, kas ir ilgstoši uzglabāti.

DNS paraugi jānosūta +4 °C temperatūrā vai aukstāk, lai saglabātu to integritāti transportēšanas laikā.

**PROCEDŪRA****A. Iepakojumā esošie materiāli**

1. Olerup SSP® praimeru paplātes.
2. Master Mix bez Taq polimerāzes (piemērots tilpums komplekta paplātēm). Tas pats Master Mix tiek izmantots visiem Olerup SSP® komplektiem.
3. Līmējošie PĶR blīvējumi (piemērots numurs komplekta paplātēm).

**B. Nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti**

1. DNS izolācijas komplekts/aprīkojums
2. UV spektrofotometrs
3. Pipetēšanas ierīces. Mēs iesakām izmantot elektronisku vienkanāla dozatoru, kas spēj izdalīt 10 µl alikvotas Master Mix-dH<sub>2</sub>O maisījuma pievienošanai paplātes iedobēm.
4. Vienreizējās lietošanas pipetes uzgaļi
5. Polipropilēna mēģenes
6. Virpuļmikseri
7. Mikrocentrifūga
8. PĶR paplātes plaukts
9. Amplifikators ar apsildāmu vāku, kas paredzēts PĶR ar 96 iedobju formātu, temperatūras gradients sildīšanas blokā ≤ 0,75 °C un paplāte/fiksators 0,2 ml plānsienu reakcijas iedobēm
10. Mikroviļņu krāsns vai sildvirsmas agarozes šķīdumu sildīšanai
11. Elektroforēzes klases agaroze, piemēram, FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE buferšķīdums; 1 x TBE buferšķīdums ir 89 mM Tris-borāts, 2 mM dinātrija EDTA, pH 8,0
13. Etīdija bromīda pilinātāja pudele Produkta Nr. 103.301-10 vai GelRed pilinātāja pudele Produkta Nr. 103.302-05
14. Gela iepildīšanas pipetēšanas ierīce. Mēs iesakām 8 kanālu pipeti gela iepildīšanai, 5–25 µl regulējamu tilpumu
15. DNS izmēra marķieris, kas aptver diapazonu no 50 līdz 1000 bp, piemēram 100 bāzes pāru kāpnes, DNS izmēra marķiera produkts Nr. 103.202--100 vai DNS izmēra marķieris īsām gela sērijām 103.203–100
16. Elektroforēzes aparāts/barošanas avots
17. UV transiluminators
18. Foto vai attēlu dokumentācijas sistēma
19. Roche Taq DNS polimerāze, GMP pakāpe. [Kataloga Nr. 03 734 927 001 (1000 U) vai Nr. 03 734 935 001 (5000 U)].

**C. Soli pa solim procedūra**

Skatiet lietošanas instrukciju.

## LIETOŠANAS INSTRUKCIJA

### A. Parauga sagatavošana

1. Attīriet genoma DNS no leukocītu parauga pēc izvēles metodes, skatiet iepriekš sadaļu "Paraugu ņemšana un sagatavošana".
2. Konkrētu informāciju par paraugu sagatavošanu un uzglabāšanu skatiet iepriekš sadaļā "Paraugu ņemšana un sagatavošana".
3. Veiciet PĶR amplifikāciju attīrītam DNS paraugam, izmantojot Olerup SSP® tipizēšanas paplāti, vai uzglabāriet DNS paraugu, līdz tas ir gatavs tipizēšanai.

### B. Reaģentu/iekārtu sagatavošana

1. Programmējiet amplifikatoru, lai palaistu Olerup SSP® PĶR programmu, skatiet iepriekš sadaļu "Prasības attiecībā uz instrumentiem — PĶR cikla parametri".
2. Ir pieejama Taq polimerāze (5 vienības/μl), jāuzglabā -20 °C.
3. Sagatavojiet elektroforēzes gelu, skatīt tālāk esošo C sadaļu — **Gela elektroforēzes sagatavošana.**

### C. Gela elektroforēzes sagatavošana

Olerup SSP® gela sistēma 96 (produkts Nr. 103.101-01)

1. Iestatīšanas
  - Izlīdziniet liešanas kameru 1 gelam (produkta Nr. 103.101-31) vai liešanas kameru 3 gēliem (produkta Nr. 103.101-33), izmantojot izlīdzināšanas burbuli un trīs augstumā regulējamās kājas.
  - Novietojiet gela paplāti(-es) liešanas kamerā.
2. 2 % (svars/tilpums) agarozes gela preparāts

Izmantojiet augstas kvalitātes elektroforēzes klases agarozī, kas spēj izšķīrt 50–2000 bāzu pāru DNS fragmentus.

  - 5 ml 10 x TBE (Tris Borate EDTA) buferšķīduma pievieno 150 ml destilēta ūdens un 2 g agarozes 500 ml stikla pudelē.
  - Izšķīdina agarozī, vārot mikroviļņu krāsnī, līdz veidojas viendabīgs 100 ml šķīdums.
  - Ļaujiet izšķīdinātajam želejas šķīdumam atdzist līdz 60 °C, piem., apkures skapī.
  - Pirms liešanas iekrāsojiet želeju ar etīdija bromīdu (10 mg/ml), 5 μl uz 100 ml gela šķīduma. Lai maksimāli atvieglotu lietošanu, izmantojiet mūsu etīdija bromīda pilinātāju pudeles (produkts Nr. 103.301-10). **Piezīme. Etīdija bromīds ir kancerogēns. Rīkojieties ar atbilstošiem individuālajiem aizsardzības līdzekļiem.**
  - Ielej 100 ml gela šķīduma gela paplātē liešanas kamerā. Ievietojiet 6 gela ķemmes (produkts Nr. 103.101-21) gela paplātes spraugās.
  - Ļaujiet gelam sacietēt 15 minūtes.
  - Gela tvertnē ielej 750 ml 0,5 x TBE buferšķīduma. Iegremdējiet gela paliktni gela kastē un uzmanīgi noņemiet 6 gela ķemmes, paceļot tās uz augšu.

Izmantojot alternatīvas elektroforēzes sistēmas, ievērojiet ražotāja lietošanas instrukcijas. Lai varētu izmantot kopā ar Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplektiem,



šīm sistēmām jāspēj izšķirt PĶR produktus, kuru izmērs ir no 50 līdz 1100 bāzes pāriem.

#### D. Pakāpeniska procedūra

1. Izņemiet no norādītās(-ajām) uzglabāšanas temperatūras(-ām): atbilstošo DNS paraugu skaitu, praimera paplāti(-es), Master Mix un Taq polimerāzes tilpumu (5 vienības/ $\mu$ l), kas nepieciešams atlasītajam(-ajiem) DNS paraugam(-iem)/praimera paplātei(-ēm). Atkausē istabas temperatūrā (no 20 līdz 25 °C)

Tas pats Master Mix tiek izmantots visiem Olerup SSP® komplektiem.

2. DNS paraugu(-s) īsi samaisiet, virpuļojiet.
3. Praimera paplāti(-es) ievieto PĶR paplātes statīvā.
4. **Zemas un augstas izšķirtspējas komplekti**
  - Pirms alikvotu ņemšanas samaisiet galveno maisījumu, izmantojot virpuļmikseri.
  - Izmantojot manuālu vienkanāla pipeti, pievienojiet istabas temperatūrā Master Mix, Taq polimerāzi (5 vienības/ $\mu$ l) un dH<sub>2</sub>O 0,5 ml vai 1,5 ml mēģenē. (Atbilstošos daudzumus skatiet 1. tabulā.)
  - Aizveriet mēģenes vāciņu un maisiet 5 sekundes ar virpuļmikseri. Pulsējiet mēģeni mikrocentrifūgā, lai no caurules malām izvadītu visu šķidrumu.
  - Izmantojot manuālu vienkanāla pipeti, pievienojiet 8  $\mu$ l Master Mix — dH<sub>2</sub>O maisījuma un 2  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O praimera paplātes negatīvās kontroles iedobē, t. i., iedobē ar negatīvās kontroles praimeru pāriem.
  - Izmantojot manuālu vienkanāla pipeti, istabas temperatūrā pievienojiet DNS parauga atlikušajam Master Mix — dH<sub>2</sub>O maisījumam. (Atbilstošos daudzumus skatiet 1. tabulā.)
  - Aizveriet mēģenes vāciņu un maisiet 5 sekundes ar virpuļmikseri. Pulsējiet mēģeni mikrocentrifūgā, lai no caurules malām izvadītu visu šķidrumu.
  - Izmantojot elektronisku vienkanāla dozatoru, iedala 10  $\mu$ l parauga reakcijas maisījuma katrā praimera paplātes iedobē, izņemot negatīvās kontroles iedobi.

**1. tabula. Testam nepieciešamie komponentu apjomi dažādam iedobju skaitam, izmantojot Master Mix bez Taq polimerāzes.**

Iedobju skaits vienā testā	Galvenā maisījuma tilpums (µl)	DNS parauga tilpums (µl)	dH <sub>2</sub> O tilpums (µl)	Taq polimerāzes tilpums (µl)
2	12	8	19,7	0,3
3	15	10	24,6	0,4
4	18	12	29,5	0,5
5	21	14	34,4	0,6
6	24	16	39,4	0,6
7	27	18	44,2	0,8
8	30	20	49,2	0,8
9	33	22	54,1	0,9
10	36	24	59	1,0
11	39	26	63,9	1,1
12	42	28	68,9	1,1
13	45	30	73,8	1,2
14	48	32	78,7	1,3
15	51	34	83,6	1,4
16	54	36	88,6	1,4
17	60	40	98,4	1,6
18	63	42	103,3	1,7
19	66	44	108,2	1,8
20	69	46	113,2	1,8
21	72	48	118,1	1,9
22	75	50	123	2,0
23	78	52	127,9	2,1
24	81	54	132,8	2,2

Iedobju skaits vienā testā	Galvenā maisījuma tilpums (µl)	DNS parauga tilpums (µl)	dH <sub>2</sub> O tilpums (µl)	Taq polimerāzes tilpums (µl)
25	87	58	142,7	2,3
26	90	60	147,6	2,4
27	93	62	152,5	2,5
28	96	64	157,4	2,6
29	99	66	162,4	2,6
30	102	68	167,3	2,7
31	105	70	172,2	2,8
32	108	72	177,1	2,9
36	126	84	206,6	3,4
40	138	92	226,3	3,7
44	150	100	246	4,0
48	162	108	265,7	4,3
52	174	116	285,4	4,6
56	186	124	305	5,0
60	198	132	324,7	5,3
64	210	140	344,4	5,6
68	228	152	373,9	6,1
72	240	160	393,6	6,4
76	252	168	413,3	6,7
80	264	176	433	7,0
84	276	184	452,6	7,4
88	288	192	472,3	7,7
92	300	200	492	8,0
96	312	208	511,7	8,3

Iepriekš uzskaitītie ieteicamie tilpumi ietver tilpumu, lai kompensētu pipetes svārstības un šķidrums zudumus uz mēģeņu iekšējām sienām.

**5. Kombinētie komplekti A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ, DQA-DQB-DR Uzlaboti un HLA-C augstas izšķirtspējas komplekts biežu alēļu komplektam**

- Samaisiet Master Mix, izmantojot virpuļmikseri.
- Izmantojot manuālu vienkanāla pipeti, pievienojiet istabas temperatūrā 8,3 µl Taq polimerāzes (5 vienības/µl) un 511,7 µl dH<sub>2</sub>O komplektā iekļautajā 1,5 ml mēģenē, kas satur 312 µl Master Mix.
- Aizveriet mēģenes vāciņu un maisiet 5 sekundes ar virpuļmikseri. Pulsējiet mēģeni mikrocentrifūgā, lai no caurules malām izvadītu visu šķidrumu.
- Izmantojot manuālu vienkanāla pipeti, pievienojiet 8 µl Master Mix — Taq polimerāzes — dH<sub>2</sub>O maisījuma un 2 µl dH<sub>2</sub>O negatīvās kontroles iedobē Nr. 96, t. i., iedobē ar negatīvās kontroles praimeru pāriem.

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

- Izmantojot manuālu vienkanāla pipeti, istabas temperatūrā pievienojiet 206 µl DNS parauga atlikušajam Master Mix — Taq polimerāzes — dH<sub>2</sub>O maisījumam.
- Aizveriet mēģenes vāciņu un maisiet 5 sekundes ar virpuļmikseri. Pulsējiet mēģeni mikrocentrifūgā, lai no caurules malām izvadītu visu šķidrumu.
- Izmantojot elektronisku vienkanāla dozatoru, iedala 10 µl parauga reakcijas maisījuma katrā praimera paplātes iedobē, izņemot negatīvās kontroles iedobi Nr. 96.

### Svarīgi

Noteikti uzklājiet paraugu virs praimeriem (žāvēts katras praimera paplātes iedobes apakšā), lai izvairītos no savstarpēja piesārņojuma starp iedobēm. Pieskarieties iedobes iekšējai sienai ar pipetes galu, lai paraugs varētu noslīdēt līdz iedobes apakšai. Pārbaudiet, vai visi paraugi ir nokrituši līdz katras iedobes apakšai. Ja nē, pirms PĶR sākšanas uzmanīgi piesitiet paplātei pie darba virsmas, lai visi paraugi nosēstos iedobes apakšā.

5. Pārklājiet praimeru paplāti(-es) ar komplektā iekļautajiem līmējošajiem PĶR blīvējumiem. Pārbaudiet, vai visas reakcijas iedobes ir pilnībā nosegtas, lai novērstu iztvaikošanas zudumus PĶR amplifikācijas laikā. Olerup SSP® kompresijas paliktņi (produkta Nr. 103.505–06) var uzklāt virs līmējošiem PĶR blīvējumiem, lai novērstu iztvaikošanu termiskās cikla laikā.
6. Ievietojiet praimera paplāti(-es) amplifikatorā ar piemērotu caurules paplātes adapteri. Nepieļaujiet ilgāku par 5 minūšu aizkavi starp PĶR iestatīšanu un termisko ciklu.
7. Ievadiet savu Olerup SSP® programmas numuru. Norādiet 10 µl reakcijas tilpumu.
8. Sāciet PĶR programmu. Programma aizņem aptuveni 1 stundu un 20 minūtes.
9. Noņemiet praimera paplāti(-es) no amplifikatora. Pārbaudiet PĶR paplāti, lai pārliecinātos, ka katrā PĶR iedobē ir aptuveni vienāds šķidruma tilpums. Elektroforē paraugus, skatiet tālāk sadaļu “E — Gela elektroforēze”. Interpretējiet tipizēšanas rezultātus, izmantojot partijai raksturīgās **interpretācijas un specifiskāciju tabulas vai darblapu**, skatiet tālāk paredzamās vērtības.

**E. Gēla elektroforēze**

1. Pēc PĶR reakcijas pabeigšanas orientējiet praimera paplāti un gēla kastīti. Iedobju secība ir no kreisās uz labo un no augšas uz leju.
2. Viegli noņemiet sloksnes vākus, neizšļakstot PĶR produktus.
3. PĶR produktus secīgi iepilda 2 % agarozes gēlā. (Gēla ielādes buferšķīdums nav jāpievieno.) Gēla iepildīšanai ieteicams izmantot 8 kanālu pipeti.
4. Ievietojiet DNS izmēra marķieri (100 bāzu pāru kāpnes, DNS izmēra marķiera produkta Nr. 103.202-100 vai DNS izmēra marķieri īsiem gēla posmiem 103.203-100) vienā iedobē katrā rindā.
5. Nosedziet gēla kasti ar gēla kastes vāku.
6. Elektroforē gēlu 0,5 x TBE buferšķīdumā, bez buferšķīduma atkārtotas cirkulācijas, 15–20 minūtes pie 8–10 V/cm.
7. Pārnesiet gēla paplāti ar gēlu uz UV transluminatoru.
8. Fotografējiet gēlu ar vai bez gēla paplāti.
9. Atzīmējiet fotoattēlu atbilstoši laboratorijas noteikumiem.

**KVALITĀTES KONTROLE**

ASHI HLA testēšanas vadlīnijas norāda, ka katrā PĶR iestatījumā ir jāiekļauj negatīva (piesārņojuma) kontroles iedobe. (Pārskatītie akreditēto laboratoriju standarti, Amerikas Histokompatibilitātes un imunoģenētikas biedrība, CMS apstiprinātie galīgie pārskatītie standarti: 2021. gada 16. februāris). Negatīvās kontroles iedobe ir iekļauta visos komplektos, izņemot HLA-B\*27 — vienības devas un HLA-B\*27 vienas iedobes komplektus.

Skatiet sadaļu Gēla interpretācija 14. lpp.

**REZULTĀTI**

Partijai raksturīgajām šūnu līnijas validācijas lapām un analīzes sertifikātam var piekļūt tiešsaistē, [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

**PROCEDŪRAS IEROBEŽOJUMI**

1. PĶR-SSP procesam ir nepieciešami ļoti kontrolēti testa apstākļi, lai nodrošinātu adekvātu diskriminējošu pastiprināšanu. Stingri jāievēro lietošanas instrukcijā aprakstītā procedūra.
2. Ekstrahētais DNS paraugs ir veidne konkrētajam PĶR amplifikācijas procesam. Attīrītās DNS attiecībai A<sub>260/280</sub> jābūt no 1,6 līdz 2,0, lai iegūtu optimālu joslu vizualizāciju ar elektroforēzi.
3. Visi instrumenti, piemēram, amplifikators, pipetēšanas ierīces, ir jākalibrē saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
4. Partijai raksturīgā informācija ir sniegta Produkta iespaidumā: Partijai raksturīgā informācija un partijai raksturīgajā darblapā.
5. Pamatojoties uz veikto testēšanu, tālāk norādītās vielas tika novērtētas ar trim (3) ekstrakcijas metodēm norādītajās koncentrācijās, un tika konstatēts, ka tās neietekmē testa veiktspēju.

		<b>Traucēta koncentrācija*</b>
--	--	--------------------------------

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

<b>Ekstrakcijas metode</b>	<b>Traucējošā viela</b>	
EZ1 DSP DNS asins sistēma	Bilirubīns	200 mg/l
	Hemoglobīns	200 g/l
	Triglicerīdi	30 g/l
	Olbaltumvielas	110 g/l
QIAamp DSP DNS asins komplekts	Bilirubīns	200 mg/l
	Hemoglobīns	200 g/l
	Triglicerīdi	18,2 g/l
	Olbaltumvielas	77–96 g/l
Gentra PureGene metode	Bilirubīns	200 mg/l
	Hemoglobīns	200 g/l
	Triglicerīdi	18,2 g/l
	Olbaltumvielas	119–146 g/l

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

6. PĶR plāksnes ir fiziski saderīgas ar lielāko daļu tirgū esošo amplifikatoru. Skatīt tālāk esošo amplifikatoru plastmasas saderības tabulu.  
*Piezīme. Tabula ir paredzēta tikai kā ceļvedis. Par apstiprinātajiem amplifikatoriem skatīt sadaļu "Prasības attiecībā uz instrumentiem — Instruments".*

<b>Saderības tabula</b>	
<b>Ražotājs</b>	<b>Amplifikators</b>
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96 iedobes
	ProFlex 2x96 iedobes
	Veriti 0,2 ml 96 iedobju bloks
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 amplifikators
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
	TProfessional
Bio-Rad	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 ar 96 iedobju bloku
Eppendorfa	Mastercycler Gradient
	Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus
MWG	Primus 96
	TheQ Lifecycler
Thermo Scientific	Arktik
Techne	Flexigene, TC-412, TC-4000
	Genius, Touchgene, TC-512, TC-5000
	TC-PLUS, Prime, PrimeG, Prime Elite
Thermo Scientific Hybaid	PCR Express, Px2, PxE
	MultiBlock sistēma un MBS
	Omnigene, Omn-E
Gene Technologies	GS1, GS4, GSX
Takara	TP 3000










7. Šī komplekta veiktspēja, izmantojot Master Mix bez Taq polimerāzes, ir apstiprināta tikai ar Roche Taq DNS polimerāzi, GMP pakāpe (kataloga Nr. 03 734 927 001 vai Nr. 03 734 935 001). Pārbaudes veiktspēja, izmantojot citus enzīmus, nav zināma, un tā ir jānosaka un jāapstiprina lietotājam.

**PAREDZAMĀS VĒRTĪBAS****A. Datu analīze**

Rūpīgi pārbaudiet gela fotoattēlu un nosakiet pozitīvās joslas.

1. Gela joslā būs redzama ātrāk migrējoša, īsāka josla, ja tiks pastiprināta(s) noteikta(s) HLA alēle(-es). Tas norāda uz pozitīvu testa rezultātu.
  - a. Reģistrējiet konkrētu PĶR produktu esamību un neesamību.
  - b. Interpretējot gela rezultātus, ir lietderīgi uzraudzīt konkrēto PĶR produktu relatīvos garumus, kā norādīts partijai raksturīgo produktu ieliktnos. Vairākām joslām ir divi vai vairāki iespējamie specifisko PĶR produktu garumi. Šajās iedobēs ir vairāki praimeru pāri, kas rada dažāda lieluma PĶR produktus atkarībā no parauga DNS HLA alēles(-ēm).
  - c. Saskaņojiet gela joslu modeli ar konkrētiem PĶR produktiem ar informāciju partijai raksturīgajās interpretācijas un specififikācijas tabulās, lai iegūtu parauga DNS HLA tipizēšanu.
2. Iekšējai pozitīvās kontroles joslai, kas migrē lēnāk un ir garāka, ir jābūt redzamai visās gela joslās, izņemot negatīvās kontroles gela joslu, kā veiksmīgas amplifikācijas kontrolei. Pozitīvajās gela joslās iekšējā pozitīvās kontroles josla var būt vāja vai tās vispār nav.
  - a. Reģistrē iekšējās pozitīvās kontroles joslu klātbūtni un relatīvo garumu. Dažāda izmēra vadības joslas palīdzēs pareizi orientēties tipizēšanai, kā arī komplekta identifikācijā.
  - b. Iekšējās pozitīvās kontroles joslas trūkums bez specifiska PĶR produkta norāda uz neveiksmīgu PĶR reakciju.
    - i. Ja HLA alēles var noteikt neveiksmīgas PĶR reakcijas(-u) klātbūtnē un neveiksmīgā(-ās) PĶR reakcija(-s) nemaina alēļu piešķiršanu, tests nav jāatkārto.
    - ii. Tomēr, ja neveiksmīgā(-s) PĶR reakcija(s) varētu mainīt HLA alēļu piešķiršanu, tipizēšana ir jāatkārto.
3. Konkrēta PĶR produkta vai iekšējās pozitīvās kontroles joslas klātbūtne negatīvās kontroles joslā(-ās) norāda uz piesārņojumu ar PĶR produktu(-iem) un anulē visus testa rezultātus. Praimeru oligomēri, kuru izmērs ir no 40 līdz 60 bāzes pāriem, var tikt novēroti negatīvās kontroles joslā(-s). Tas neatspoguļo piesārņojumu.

## B. Gela interpretācija

	Pozitīva reakcija	Negatīva reakcija	Neveiksmīga PQR reakcija
Iedobe			
Iekšējā pozitīvā kontroles josla			
Īpaša josla			
Praimeru josla			

1. DNS izmēra marķieris (100 bāzu pāru kāpnes, DNS izmēra marķieris produkts Nr. 103.202-100 vai DNS izmēra marķieris īsiem gela gājienu 103.203-100) jāievada vienā iedobē katrā gela rindā vai saskaņā ar vietējās laboratorijas akreditācijas vadlīnijām.
2. Var iegūt joslas, kas garākas par iekšējās pozitīvās kontroles joslu, un tās nav jāņem vērā, interpretējot tipizēšanas rezultātus.
3. Neizmantojie praimeri veidos izkliedētu joslu, īsāku joslu par 50 bāzes pāriem.
4. Var novērot praimeru oligomēru artefaktus. Tie ir garāki par praimeru joslu, bet īsāki nekā konkrētās joslas.

## SPECIFISKS DARBĪBAS RAKSTUROJUMS

### Komplekta partijas kvalitātes kontrole

Katrs praimeru šķīdums tiek pārbaudīts, salīdzinot ar 48 DNS paraugu paneli no labi raksturotām IHC šūnu līnijām, skatiet partijai raksturīgo šūnu līnijas validācijas lapu(-as) Produkta iespaidumā, partijai raksturīgā informācija.

### Metodes salīdzinājums

Tika veikts pētījums, lai salīdzinātu Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplektus ar un bez Taq polimerāzes, kas nodrošināta PQR Master Mix. Pētījuma mērķis bija pierādīt, ka manuāla pievienošana neietekmē testa rezultātus un ka dažādas Taq polimerāzes partijas dod tādus pašus rezultātus. Pētījumā tika iekļauta HLA-A, -B (I klase) un -DRB (II klase) zemas izšķirtspējas tipizēšana 15 DNS paraugiem ar zināmu HLA genotipu, kas iegūti no Starptautiskā histokompatibilitātes darbnīcas kolekcija (International Histocompatibility Workshop Collection). Paraugus sagatavoja un kodēja personāls, kas atšķiras no tiem, kas veica testēšanu; testēšanas personāls bija akls par paraugu HLA veidiem. Katrs paraugs tika testēts paralēli Olerup SSP® HLA-A-B-DR kombinētā



**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

pagrāde ar PQR Master Mix bez Taq polimerāzes ("Tests") un Olerup SSP® HLA-A-B-DR kombinētā pagrāde ar PQR Master Mix, ieskaitot Taq polimerāzi ("Kontrolē") saskaņā ar katra testa produkta ieliktnā instrukciju. Visas testēšanas tika veiktas CareDx AB laboratorijā Stokholmā, Zviedrijā, izmantojot vienu komplekta partiju un divas Taq polimerāzes partijas. Pētījumā tika izmantota Roche Taq DNS polimerāze, GMP pakāpe. Katra parauga testēšana sastāvēja no zemas izšķirtspējas tipizēšanas ar Olerup SSP® HLA-A-B-DR kombinētā pagrāde, ko veica ar: 1) PQR galvenais maisījums, tostarp Taq polimerāzi (FDA notīrīts tests) (Kontrolē pārbaude); 2) PQR Master Mix plus Roche Taq DNS polimerāze, GMP kvalitātes produkts, 5 U/μL; partija Nr. 1 (Testa partija Nr. 1); un 3) PQR Master Mix plus Roche Taq DNS polimerāze, GMP kvalitātes produkts, 5 U/μL; partija Nr. 2 (Testa partija Nr. 2). Pēc PQR noteikšana tika veikta, izmantojot gela elektroforēzi. Rezultāti ir apkopotu tālāk.

Salīdzinājums	Līgums			% Līgums (95 % ticamības intervāls <sup>a</sup> )
	I klases tipizēšanas rezultāti (līgumu skaits/kopskaits)		II klases tipizēšanas rezultāti (līgumu skaits/kopskaits)	
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Testa partija Nr. 1 / kontrolē partija	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testa partija Nr. 1 / Konsenss <sup>b</sup>	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testa partija Nr. 2 / kontrolē partija	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testa partija Nr. 2 / Konsenss	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testa partija Nr. 1 / Testa partija Nr. 2	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)

<sup>a</sup> Rezultātu metode

<sup>b</sup> Vienprātības rezultāts no Starptautiskās histokompatibilitātes darbnīcas kolekcijas (International Histocompatibility Workshop Collection)

## BIBLIOGRĀFIJA

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

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. Aktuāla informācija par HLA alēlēm ir atrodama šeit: [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

## PROBLĒMU NOVĒRŠANA

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Rīcība</b>
<b>Nav amplifikācijas (ne iekšējās kontroles fragmentu pastiprināšanas, ne specifisku pastiprinājumu).</b>	Pārāk mazs DNS daudzums.	Izmēriet DNS koncentrāciju un pārbaudiet, vai pievienotais daudzums ir pareizs. RNS piesārņojums var izraisīt DNS koncentrācijas spektrofotometrisku pārvērtēšanu. Uzmanīgi atkārtojiet DNS ekstrakciju ar svaigi pagatavotiem šķīdumiem. Iesakām automatizētu DNS ekstrakciju ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu.
	DNS satur PĶR inhibitorus, piemēram, olbaltumvielas, etanolu (no nosēdināšanas darbībām), atlikušās matricas no cietās fāzes DNS attīrīšanas produktiem.	Mēriet DNS kvalitāti. Mēs iesakām A260/A280 attiecību 1,6–2,0, izmantojot UV spektrofotometriju. Precīzi ievērojiet piegādātāja DNS ekstrakcijas protokolu. Atkārtoti ekstrahējiet DNS. Iesakām automatizētu DNS ekstrakciju ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu.
	DNS ir ekstrahēta no heparinizētām asinīm.	Izmantojiet neheparinizētas asinis vai izmantojiet heparinizētām asinīm paredzētus DNS ekstrakcijas protokolus.
	DNS ir izšķīdināta buferšķīdumā, kas satur EDTA.	Atkārtojiet DNS ekstrahēšanu un atšķaidiet DNS, izmantojot dH <sub>2</sub> O.

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Rīcība</b>
<b>Turpinot:</b> <b>Nav amplifikācijas (ne iekšējās kontroles fragmentu pastiprināšanas, ne specifisku pastiprinājumu).</b>	Nejauša balinātāja ievadīšana testā.	Pārskatiet vietas, kur, iespējams, var tikt ievadīts balinātājs.
	Komplekti nav uzglabāti atbilstošā temperatūrā.	Uzglabājiet komplektus - 20 °C temperatūrā.
	Amplifikators nedarbojas pareizi.	Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, kuru izmanto parastai PĶR-SSP tipizēšanai, ir jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem.
	Nepietiekams kontakts starp amplifikatora sildīšanas bloku un SSP tipizēšanas paplāti.	Izmantojiet pareizu paplāti/fiksatoru 0,2 ml plānsienu reakcijas iedobēm, skatiet amplifikatora rokasgrāmatu.
<b>Nejauša pastiprināšanas kļūme (pārtraukumi).</b>	PĶR blīvējumi/PĶR mēģeņu vāciņi, kas nav cieši noslēgti, novedīs pie iztvaikošanas un sekojošas pastiprināšanas neveiksmes.	Pārliecinieties, vai PĶR blīvējumi/visi vāciņi ir cieši noslēgti. <i>Olerup SSP®</i> kompresijas paliktņi (produkts Nr. 103.505–06) var uzklāt virs līmējošiem PĶR blīvējumiem, lai novērstu iztvaikošanu termiskās cikla laikā.
	Gela ievadīšanas kļūdas.	Pārbaudiet, vai ir ievietots pareizais iedobumu skaits un vai katrā iedobē ir aptuveni vienāds PĶR maisījuma tilpums.
	Nekalibrētu pipešu lietošana.	Regulāri kalibrējiet visas pipetes saskaņā ar piegādātāja ieteikumiem.
	Pipetēšanas kļūdas.	Rūpīgāk veiciet pipetēšanu.
	Pirms lietošanas Master mix un DNS paraugs nav pareizi samaisīti.	Pirms lietošanas ātri samaisiet, izmantojot virpuļmikseri. Mēs iesakām veikt maisīšanu

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Rīcība</b>
		ar virpuļmikseri pēc katras rindas.
	ledobēs pievienots nevienmērīgs DNS-master mix maisījuma tilpums.	Rūpīgāk veiciet pipetēšanu.
<b>Vāji iekšējās kontroles fragmenti.</b>	Piesārņots DNS.	Mēriet DNS kvalitāti. Ar UV spektrofotometriju A260/A280 attiecībai jābūt 1,6–2,0. RNS piesārņojums var izraisīt DNS koncentrācijas spektrofotometrisku pārvērtēšanu. Degradēta DNS izraisa uztriepi gela joslās. Uzmanīgi atkārtojiet DNS ekstrakciju ar svaigi pagatavotiem šķīdumiem. Iesakām automatizētu DNS ekstrakciju ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu.
	Pārāk mazs DNS daudzums.	Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet uz 30 ng/μl vai uz 15 ng/μl DNS, kas ekstrahēta ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu. RNS piesārņojums var izraisīt DNS koncentrācijas spektrofotometrisku pārvērtēšanu. Degradēta DNS izraisa uztriepi gela joslās. Uzmanīgi atkārtojiet DNS ekstrakciju ar svaigi pagatavotiem šķīdumiem. Iesakām automatizētu DNS ekstrakciju ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu.

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Rīcība</b>
<b>Turpinot:</b> <b>Vāji iekšējās kontroles fragmenti.</b>	Pārāk augsta atkausēšanas temperatūra, amplifikators nav kalibrēts.	Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, kuru izmanto parastai PĶR-SSP tipizēšanai, ir jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem.
	PĶR Master Mix ir uzglabāts +4 °C temperatūrā ilgāk par 2 nedēļām.	Pareizi uzglabājiet PĶR Master Mix.
<b>Nespecifiska pastiprināšana (kāpnes vai uztriepes).</b>	Liekā DNS parauga izmantošana.	Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet 30 ng/μl vai 15 ng/μl DNS, kas ekstrahēta ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu. Dažiem praimeru šķīdumiem ir lielāka tendence izraisīt nespecifisku pastiprināšanos, skatīt zemspvītras piezīmes katrai partijai raksturīgajā specifikācijas tabulā.
	Piesārņots DNS.	Interpretējot iegūtos rezultātus, nav jāņem vērā visi fragmenti, kas ir lielāki par iekšējās kontroles fragmentu. Pārbaudiet DNS kvalitāti. Atkārtojiet DNS ekstrakciju. Iesakām automatizētu DNS ekstrakciju ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu. Dažiem praimeru šķīdumiem ir lielāka tendence izraisīt nespecifisku pastiprināšanos, skatīt zemspvītras piezīmes

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Rīcība</b>
		katrai partijai raksturīgajā specifiskācijas tabulā.
<b>Laika gaitā vājāki un vājāki pastiprinājuma signāli.</b>	Etīdija bromīda agarozes gēla krāsošanas šķīdums ir vecs.	Sagatavojiet svaigu etīdija bromīda šķīdumu, lai panāktu labāku agarozes želejas krāsojumu un labāku signālu. Praimera mākoņus ir viegli noteikt, vai agarozes želejas krāsojums ir normāls.
	Viena no UV lampām ir salauzta.	Pārbaudiet UV gaismas aprīkojumu. Praimera mākoņus ir viegli noteikt, ja UV gaisma ir normāla.
	Izmantots pārāk maz DNS parauga.	Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet uz 30 ng/μl vai uz 15 ng/μl DNS, kas ekstrahēta ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu.
	Pārāk augsta atkausēšanas temperatūra, amplifikators nav kalibrēts.	Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, kuru izmanto parastai PĶR-SSP tipizēšanai, ir jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem.
<b>Dīvaini pastiprināšanas modeļi.</b>	Tiek izmantota nepareiza partijai raksturīga interpretācijas tabula/darblapa.	Pārbaudiet izmantotā produkta partijas numuru un izmantotā interpretācijas tabula/darblapa.
	Nepareiza gēla iekraušanas secība.	Pārbaudiet maisījumu un gēla joslu izlīdzināšanu.
	Pastiprināšanas modelis satur kļūdaini pozitīvu.	Skatīt tālāk.
	Pastiprināšanas modelis satur kļūdaini negatīvu.	Skatīt tālāk.

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Rīcība</b>
<b>Kļūdaini pozitīvi pastiprinājumi.</b>	DNS piesārņojums.	Izmantojiet cimodus, pipetes uzgaļus ar barjerām (filtra aizbāžņiem), kā arī apstrādi pirms un pēc PĶR veiciet dažādās telpās. Nodrošiniet precīzu visu paraugu apstrādi visos posmos. Pārbaudiet, vai nav piesārņojuma, izmantojot <i>Olerup SSP®</i> tīrīšanas testa komplektu.
	Piesārņots DNS.	Izmēri DNS kvalitāti. Precīzi ievērojiet piegādātāja DNS ekstrakcijas protokolu. Izmēģiniet citas DNS ekstrakcijas sistēmas. Atkārtoti ekstrahējiet DNS. Iesakām automatizētu DNS ekstrakciju ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu.
	Liekā DNS parauga izmantošana.	Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet uz 30 ng/μl vai uz 15 ng/μl DNS, kas ekstrahēta ar QIAGEN EZ1 DSP DNS asins sistēmu.
	Pārāk zema atkausēšanas temperatūra.	Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, kuru izmanto parastai PĶR-SSP tipizēšanai, ir jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem.
	Liela aizkave starp PĶR iestatīšanu un termiskās cikla sākumu.	Pirms termiskā cikla nedrīkst būt ilgāka par 5 minūšu kavēšanos.
	Aizkave starp tipizēšanas paplātēm ievietošanu	Izmantojiet iepriekš uzsildītu amplifikatoru.



**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Rīcība</b>
	amplifikatorā un cikla sākšanu.	
<b>Turpinot: Kļūdaini pozitīvi pastiprinājumi.</b>	Pārmērīga etīdija bromīda izmantošana.	Izmantojiet ieteicamo etīdija bromīda daudzumu.
	Nepareiza artefakta kā konkrētas joslas interpretācija.	Pārbaudiet partijai raksturīgo interpretācijas tabulu/darblapu un specififikācijas tabulu, lai uzzinātu pareizo joslas izmēru un zemsvītras piezīmes.
	Pastiprināšanas modelis satur kļūdaini pozitīvu.	Pārbaudiet, vai visi konkrētie pastiprinājumi ir pareiza izmēra vai artefakts (pārnesums, praimeru dimērs) ir nepareizi interpretēts kā pastiprinājums.
	Nepareiza gela iekraušanas secība.	Pārbaudiet maisījumu un gela joslu izlīdzināšanu.
<b>Kļūdaini negatīvi pastiprinājumi.</b>	Amplifikators nav pareizi kalibrēts.	Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PQR programmu. Amplifikators, kuru izmanto parastai PQR-SSP tipizēšanai, ir jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem. Ja tas netiek labots ar atkārtotu kalibrēšanu, atkārtoti ievadiet testu ar tādas pašas specifikas standartparaugu. Ja apstiprinājums ir negatīvs, sazinieties ar klientu atbalsta dienestu.
	Nepareiza gela iekraušanas secība.	Pārbaudiet maisījumu un gela joslu izlīdzināšanu.

**Lietošanas instrukcija**  
**Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplekti bez Taq polimerāzes**

<b>Problēma</b>	<b>Iemesls</b>	<b>Īcība</b>
<b>Vispārējas gela problēmas (izplūduši gēli un/vai izsmērētas joslas).</b>	Degradēts DNS paraugs.	Parādās kā uztriepes gela joslās. Izolējiet DNS no svaiga parauga.
	Smagas svītras nejaušās iedobēs.	Nevienmērīgas DNS suspensijas. Pirms alikvotas ņemšanas pārlicinieties, vai DNS paraugs ir izšķīdis. DNS parauga atšķaidīšana, izmantojot virpuļmikseri.
	PQR produkts izpeldēja no akas.	Uzmanīgi izlīdziniet pipetes uzgaļus ar gela iedobēm un lēnām izdaliet.
	Elektroforēzes buferšķīdums varētu būt pārāk silts.	Sagatavojiet jaunu TBE buferšķīdumu. Darbiniet ar zemāku spriegumu.
	Ir izmantots nepareizs agarozes gels procentuālais daudzums.	Pārlicinieties, vai tiek izmantots ieteicamais 2 % agarozes gels.
	Agarozē nav pilnībā izšķīdusi.	Īsi atkārtoti uzvāra, lai agarozē izkūst.
	Nepareiza TBE koncentrācija.	Izmantojiet ieteicamo koncentrāciju 0,5 x TBE.
	Tika izlieti pārāk jauni geli.	Geli ir gatavi lietošanai tikai 15 minūtes pēc liešanas.
	Pārāk veci geli.	Neizlejiet gelus pārāk tālu iepriekš.
	Izmantotajai gela ķemmei ir pārāk biezas spraugas.	Izmantojiet plānas ķemmes (4 x 1 mm).
	Gela paplāte nav UV caurspīdīga.	Pirms apskates noņemiet gelu no gela paplātes.
	Gela attēls pārāk spilgts.	Pārmērīga etīdija bromīda lietošana. Pārbaudiet kameras iestatījumus.
	Gela attēls pārāk tumšs.	Izmantojiet ieteicamo etīdija bromīda daudzumu. Pārbaudiet kameras iestatījumus.

Problēma	Iemesls	Rīcība
Vispārīgas problēmas ar viltus negatīvu pastiprinājumu vai šāda rakstura no palaišanas atkarīgām problēmām	Rampas ātruma iestatījums ir pārāk augsts.	Olerup SSP komplekti tiek validēti, izmantojot GeneAmp 9700 amplifikatoru, kas iestatīts uz 9600 režīmu, un ProFlex ar rampas ātrumu 3 °C/s. Lielāks rampas ātrums nekā ekvivalents var ietekmēt tipizēšanas rezultātus.

### ŠAJĀ DOKUMENTĀ/PRODUKTĀ IZMANTOTĀS PREČU ZĪMES

Olerup SSP® ir CareDx AB reģistrēta preču zīme.

Qiagen™ ir QIAGEN preču zīme.

**PAZIŅOJUMS PIRCĒJAM.** Olerup SSP® komplekti bez Taq polimerāzes — šis produkts ir optimizēts lietošanai ar Roche Taq polimerāzi, GMP pakāpe (kataloga Nr. 03 734 927 001 vai Nr. 03 734 935 001) polimerāzes ķēdes reakcijas (“PQR”) procesā, uz kuriem var attiekties Roche Molecular Systems, Inc. un F. Hoffmann-La Roche Ltd. (“Roche”) patenti. Laboratorija ir atbildīga par sazināšanos ar Roche Molecular Systems, Inc., lai noteiktu, vai saskaņā ar šiem patentiem ir nepieciešama licence.

### GARANTĪJA

CareDx AB sākotnējam pircējam sniedz savu produktu garantiju attiecībā uz materiālu un ražošanas defektiem, pastāvot normālas izmantošanas un pielietojuma mērķim. CareDx AB vienīgais pienākums saskaņā ar šo garantiju ir bez maksas nomainīt jebkuru produktu, kas neatbilst produkta specifikācijas lapā norādītajiem darbības standartiem.

Šī garantija attiecas tikai uz produktiem, kas apstrādāti un uzglabāti saskaņā ar CareDx AB ieteikumiem, un neattiecas uz produktiem, kas ir bijuši mainīti, nepareizi vai ļaunprātīgi izmantoti.

Visas prasības saskaņā ar šo garantiju nosūtāmas CareDx AB rakstiski, tām pievienojot pircēja rēķina kopiju. Šī garantija aizstāj visas citas garantijas, tieši vai netieši izteiktas, ieskaitot garantijas par piemērotību pārdošanai un piemērotību noteiktam mērķim. CareDx AB nekādā gadījumā nav atbildīgs par nejaušiem vai netiešiem zaudējumiem.

Šo produktu nedrīkst pārveidot, pārpakot vai pārdot tālāk jebkāda veidā bez CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stokholma (Zviedrija) rakstiskas piekrišanas.

Ar visiem paraugiem jāstrādā tā, it kā tie varētu pārnēsāt slimību. Visi darbi jāveic, izmantojot cimdus un atbilstošu aizsardzību.

### GARANTĪJA

CareDx AB garantē, ka Olerup SSP® tipizēšanas paliktņos esošajiem praimeriem ir specifika, kas norādīta produkta ieliktna darblapā, partijai raksturīgajās specifikācijas un interpretācijas tabulās.

## ADRESES

### Ražotājs:

CareDx, AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Stokholma, Zviedrija

Tālr.: +46-8-508 939 00

Fakss: +46-8-717 88 18

E-pasts: orders-se@caredx.com

Timekļa lapa: www.caredx.com

### Izplatītājs:

CareDx, AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Stokholma, Zviedrija

Tālr.: +46-8-508 939 00

Fakss: +46-8-717 88 18

E-pasts: orders-se@caredx.com

Timekļa lapa: www.caredx.com

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

Tālr.: 1-877-653-7871

Fakss: 610 344 7989

E-pasts: orders-us@caredx.com

Timekļa lapa: www.caredx.com

CareDx Pty Ltd., 20 Collie Street, Frīmentla (Fremantle), WA 6160, Austrālija.

Tālr.: +61 8 9336 4212

E-pasts: orders-aus@caredx.com

Timekļa lapa: www.caredx.com

### Pilnvarotais pārstāvis:

Qarad Suisse S.A., World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausanne, Šveice.

CHRN: CHRN-AR-20002058

Lai iegūtu informāciju par CareDx izplatītājiem visā pasaulē, sazinieties ar CareDx AB.

1591-LBL v02 ir tulkots no angļu valodas pamatteksta 0193-LBL versijas 07 Olerup SSP® HLA tipizēšanas komplektiem bez Taq polimerāzes.

Izmaiņas versijā 0193-LBL versija 07 salīdzinājumā ar 0193-LBL versiju 06.

1. Šveices pilnvarotā pārstāvja pievienošana.
2. GelRed pievienošana sadaļai B. nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti.