



Instrucțiuni de utilizare

Olerup SSP® fără polimerază Taq

© 2023 CareDx, Inc. Toate mărcile de servicii sau mărcile comerciale sunt deținute sau licențiate de CareDx, Inc. sau de afiliații săi. Toate drepturile rezervate.

Kituri de tipizare HLA 1593-LBL v02 Olerup SSP® fără polimerază Taq

Destinat *utilizării pentru diagnostic In Vitro*

Revizuit septembrie 2023



Pagina 1 din 29

Destinat utilizării pentru diagnostic *in vitro*

UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Kiturile de tipizare *Olerup SSP*® HLA sunt kituri de diagnostic calitativ *in vitro* pentru tipizarea ADN a alelelor HLA de Clasa I și Clasa II. Produsele sunt utilizate de către specialiști calificați în medii medicale, în scopul determinării fenotipului HLA. Materialul sursă testat este ADN-ul.

REZUMAT ȘI EXPLICAȚIE

Antigenele leucocitare umane (HLA) erau determinate prin testul de limfocitotoxicitate. Cu toate acestea, din cauza ratei de eroare și a lipsei de rezoluție la nivelul unei alele, acest test a fost înlocuit cu sisteme de tipizare ADN bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR). La majoritatea sistemelor bazate pe PCR, procesul PCR este utilizat doar ca etapă de amplificare a ADN-ului țintă necesar și o etapă post-amplificare este necesară pentru a face o diferențiere între diferitele alele. În schimb, în metodologia PCR-SSP (sequence-specific primer – primer specific secvenței – SSP), diferențierea între diferitele alele are loc în timpul procesului PCR. Acest lucru reduce și simplifică etapa post-amplificare la o simplă etapă de detectare a electroforezei în gel. Rezultatele testelor SSP sunt fie pozitive, fie negative, eliminând necesitatea unei interpretări complicate a rezultatelor. În plus, rezoluția de tipizare prin metoda PCR-SSP este mai mare decât în cazul altor sisteme de tipizare bazate pe PCR, deoarece fiecare pereche de primeri definește două motive de secvențe aflate în *cis*, adică în același cromozom. În plus, datorită caracterului sintetic a reactivilor SSP, stabilitatea a fost îmbunătățită și variația de la lot la lot a fost redusă.

PRINCIPIUL PROCEDURII

Metodologia PCR-SSP are la bază principiul că primerii oligonucleotidici cu complementaritate perfectă sau aproape perfectă, fără nepotriviri la capătul 3' sunt mai eficienți în reacția PCR decât primerii necorespunzători de la polimerază ADN termostabilă fără corectare. Perechile de primeri sunt concepute pentru a se potrivi cu alele unice sau cu grupuri de alele, în funcție de gradul de rezoluție necesar pentru tipizare. În cazul condițiilor PCR strict controlate, perechile de primeri complementare sau aproape complet complementare permit amplificarea, adică un rezultat pozitiv, în timp ce perechile de primeri necomplementare nu permit amplificarea, adică un rezultat negativ.

În urma procesului PCR, fragmentele de ADN amplificate sunt separate în funcție de dimensiune, de ex. prin electroforeză în gel de agaroză, vizualizată prin colorare cu bromură de etidiu și expunere la lumină ultravioletă, documentată prin fotografiere și interpretată. Interpretarea rezultatelor PCR-SSP se bazează pe prezența sau absența produsului (produselor) PCR specific(e). Dimensiunile relative ale produsului (produselor) PCR specific(e) pot fi de ajutor la interpretarea rezultatelor. Metodologia PCR-SSP pentru HLA a fost descrisă inițial de O. Olerup în 1991 și 1992^{1,2}.

Cum procesul PCR poate fi afectat negativ de diverși factori (de ex. erori de pipetare, concentrație prea scăzută a ADN-ului, calitate slabă a ADN-ului, prezența inhibitorilor PCR, inexactitate a termociclorului), în fiecare reacție PCR este inclusă o pereche de

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® fără polimerază Taq

primeri de control intern pozitiv². Perechea de primeri de control intern pozitiv corespunde părților conservate ale genei hormonului uman de creștere, care este prezentă în toate probele de ADN uman. În prezența unui produs PCR specific al unei(unor) alele HLA, produsul de pe banda de control intern pozitiv poate fi slab sau absent. Amplimerii generați de perechile specifice de primeri HLA sunt mai scurți decât amplimerii perechilor de primeri cu control intern pozitiv, dar mai lungi decât cei ai primerilor neîncorporați (consultația Valori preconizate).

REACTIVI

A. Identificare

Kiturile de tipizare Olerup SSP® conțin primeri uscați, pre-optimizați, specifici secvențelor pentru amplificarea prin PCR a alelelor HLA și a genei hormonului uman de creștere, amestec principal pentru PCR fără polimerază Taq („amestec principal”) și folii adezive pentru sigilări PCR.

Soluțiile de primeri sunt pre-alicotate și uscate în godeuri de 0,2 ml în tăvi PCR tăiate în godeuri cu pereți subțiri. Fiecare godeu al tăvii conține o soluție de primer uscat formată dintr-un amestec de primer specific, adică primeri HLA specifici unei alele și grupului, precum și o pereche de primeri cu control intern pozitiv care corespund secvențelor nonalele și sunt gata pentru adăugarea de probe de ADN, amestec principal și H₂O.

Primerii sunt concepuți pentru o amplificare prin PCR optimă atunci când se utilizează amestecul principal și programul de termociclare de ADN recomandat (consultați Programarea termociclorului).

Tabelele de specificitate și interpretare specifice lotului sau foaia de lucru pentru alelele HLA specifice amplificate de fiecare amestec de primer pot fi preluate de pe pagina web www.caredx.com.

B. Avertismente și precauții

1. Destinat utilizării pentru diagnostic *in vitro*.
2. Acest produs nu trebuie utilizat ca temei unic pentru luarea unei decizii clinice.
3. Avertisment de pericol biologic: Toate produsele din sânge trebuie tratate ca potențial infecțioase. Nicio metodă (metode) de testare cunoscută (cunoscute) nu poate oferi garanția că produsele derivate din sânge uman nu vor transmite agenți infecțioși.
4. Avertisment de pericol biologic: Bromura de etidiu utilizată pentru colorarea ADN-ului în electroforeza în gel de agaroză este cancerigenă. Manipulați cu echipament individual de protecție corespunzător.
5. Atenție: Folosiți protecție oculară cu filtre de blocare UV și nu priviți direct în sursa de lumină UV atunci când vizualizați sau fotografiați gelurile.
6. Pipetele și alte echipamente utilizate pentru manipulări **post-PCR nu** trebuie utilizate pentru manipulări **pre-PCR**.
7. Pentru informații detaliate, consultați Fișa cu date de securitate (www.caredx.com).

C. Instrucțiuni de utilizare

Consultați Indicațiile de utilizare.

D. Instrucțiuni de depozitare

Depozitați componentele kitului în întuneric și la temperaturile indicate pe etichetele ambalajului.

A se utiliza înainte de data de expirare imprimată pe etichetele ambalajului.

E: Purificarea sau tratamentul necesar pentru utilizare

Consultați Indicațiile de utilizare.

F. Semne de instabilitate

1. Nu utilizați tăvi pentru primer care prezintă crăpături în godeuri sau au marginea superioară a godeurilor deteriorată, deoarece acest lucru poate cauza evaporare în timpul amplificării prin PCR. Nu utilizați benzi de tuburi PCR care prezintă crăpături, deoarece acest lucru poate cauza evaporare în timpul amplificării prin PCR.
2. Granulele din godeuri trebuie să fie de culoare roșie. Decolorarea spre galben a granulelor poate indica degradarea.
3. Amestecul principal trebuie să fie de la culoarea roșie până la violet. Decolorarea de la galben până la portocaliu poate indica degradarea.

CERINȚE PRIVIND INSTRUMENTELE**A. Instrument**

Trebuie utilizat un termociclor cu următoarele specificații minime:

- capac încălzit la o temperatură de 104 °C pentru o funcționare fără ulei
- bloc de probă (aluminiu, argint sau argint placat cu aur) pentru utilizare fie cu o placă PCR cu 96 de godeuri, fie cu tuburi de reacție de 0,2 ml cu pereți subțiri
- Kiturile *Olerup SSP* sunt validate pentru următoarele cicloare.

Viteze de creștere recomandate:

- GeneAmp 9700: Ciclorul GeneAmp 9700 setat pe modul 9600. Aceasta corespunde unei **viteze de creștere a probei** de 1,6 °C/s în sus și de 0,8° C/s în jos.
- ProFlex 1 bloc x 96 godeuri: Ciclorul ProFlex PCR cu o viteză de creștere în bloc de 3,0 °C/s (fiecare treaptă 3,0 °C/s). O **viteză de creștere în bloc** de 3,0 °C/s corespunde unei viteze de creștere a probei a de 1,52 °C/s în sus și de 1,36 °C/s în jos.
- ProFlex 2 blocuri x 96 godeuri: Ciclorul ProFlex PCR cu o viteză de creștere în bloc de 3,0 °C/s (fiecare treaptă 3,0 °C/s). O **viteză de creștere în bloc** de 3,0 °C/s corespunde unei viteze de creștere a probei a de 1,9 °C/s în sus și de 1,6 °C/s în jos.

Notă: Vitezele de creștere mai mari decât cele descrise mai sus pot influența rezultatele tipizării. De asemenea, vă rugăm rețineți că efectul asupra tipizării poate fi diferit între diferite cicloare nevalidate, în funcție de setări.

- interval de temperatură de la 4,0 °C la 99,9 °C
- precizie a temperaturii de ±0,25 °C în intervalul de la 35 °C până la 99,9 °C
- uniformitate a temperaturii blocului de probe de ≤0,75 °C în intervalul de la 55 °C până la 95 °C
- calibrare a temperaturii în conformitate cu un standard de referință (de ex., NIST)

Programați termociclorul utilizând parametrii de termociclare PCR din secțiunea B de mai jos.

Pentru informații specifice termociclorului, consultați manualul de utilizare al producătorului. Termocicloarele trebuie calibrate în conformitate cu normele de acreditare ASHI (Societatea Americană pentru Histocompatibilitate și Imunogenetică) sau EFI (Federația Europeană de Imunogenetică).

Programați termociclorul înainte de a începe să desfășurați instrucțiunile de utilizare descrise mai jos.

B. Parametrii de termociclare PCR

- | | | | | |
|----|---------------------|-------|-------|---------------------------------|
| 1. | 1 ciclu | 94 °C | 2 min | denaturare |
| 2. | 10 cicluri | 94 °C | 10 s | denaturare |
| | | 65 °C | 60 s | recoacere primer și extensie |
| 3. | 20 de cicluri | 94 °C | 10 s | denaturare |
| | | 61 °C | 50 s | recoacere |
| | | 72 °C | 30 s | extensie |
| 4. | Încheiere-menținere | RT | | dacă durează mai puțin de 8 ore |
| | 4 °C | | | dacă durează mai mult de 8 ore |

Volumul total de reacție în fiecare godeu, 10 µl.

Aceiași parametri de ciclare PCR sunt utilizați pentru toate kiturile *Olerup SSP*®.

COLECTAREA ȘI PREGĂTIREA PROBELOR

Pentru tipizările SSP este necesară extragere unei probe foarte pure de ADN. Probele de ADN care urmează să fie utilizate pentru tipizarea HLA de tip PCR-SSP trebuie să fie introduse din nou în suspensia de dH₂O. Raportul A_{260/280} trebuie să fie de 1,6 – 2,0 la spectrofotometria în UV, pentru o vizualizare optimă a benzii în timpul electroforezei.

Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP. Ca materie primă trebuie utilizat sângele din ACD.

Alternativ, ADN-ul poate fi extras prin orice metodă preferată care produce ADN pur. Atunci când se utilizează metode alternative, concentrația ADN-ului trebuie ajustată la 30 ng/µl. **Nu utilizați sânge heparinat la aceste metode.**

Concentrație recomandată pentru ADN dacă se utilizează:
ADN extras cu sistemul EZ1, 15 ng/µl.
ADN extras prin alte metode, 30 ng/µl.

Concentrațiile care depășesc 50 ng/µl vor crește riscul de amplificări nespecifice și benzi suplimentare slabe, în special la tipizările SSP de înaltă rezoluție pentru HLA clasa I. Dacă este necesar, diluați ADN-ul extras în dH₂O.

Probele de ADN nu trebuie introduse din nou în soluții care conțin agenți chelatori, cum ar fi EDTA, cu o concentrație mai mare de 0,5 mM.

Probele de ADN pot fi utilizate imediat după extracție sau depozitate la +4 °C timp de până la 2 săptămâni, fără efecte negative asupra rezultatelor. Probele de ADN pot fi depozitate la -20 °C sau mai puțin timp de 9 luni. Puritatea și concentrația probelor de ADN extrase care au fost depozitate pentru o perioadă îndelungată trebuie testate cu privire la acceptabilitate înainte de tipizarea HLA.

Probele de ADN trebuie expediate la o temperatură de + 4 °C sau mai mică pentru a-și păstra integritatea în timpul transportului.

PROCEDURĂ**A. Materiale furnizate**

1. Tăvi pentru primer, *Olerup SSP*®.
2. Amestec principal fără polimerază *Taq* (un volum corespunzător pentru tăvile kitului). Același amestec principal este folosit pentru toate kiturile *Olerup SSP*®.
3. Folii adezive de etanșare PCR (număr corespunzător pentru tăvile kitului).

B. Materiale necesare, dar care nu sunt furnizate

1. Kit/echipament de izolare ADN
2. Spectrofotometru UV
3. Dispozitive de pipetare. Vă recomandăm să utilizați un dozator electronic cu un singur canal care poate distribui 10 µl de părți alicote pentru adăugarea soluției principale ADN-dH₂O în godeurile tăvii.
4. Vârfuri de pipetă de unică folosință
5. Tuburi de polipropilenă
6. Mixer vortex
7. Microcentrifugă
8. Suport pentru tavă PCR
9. Termociclor cu capac încălzit pentru PCR cu structură cu 96 de godeuri, gradient de temperatură pe întregul bloc de încălzire de ≤ 0,75 °C și tavă/dispozitiv de fixare pentru godeuri de reacție de 0,2 ml, cu pereți subțiri
10. Cuptor cu microunde sau încălzitor pentru încălzirea soluțiilor de agaroză
11. Calitate agaroză pentru electroforeză, de ex., FMC Seakem LE
12. 0,5 x tampon TBE; 1 x tampon TBE are 89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA disodic, pH 8,0
13. Sticlă cu picurător pentru bromură de etidiu Nr. produs 103.301-10 sau sticlă cu picurător pentru GelRed Nr. produs 103.302-05
14. Dispozitiv de pipetare pentru încărcare cu gel. Pentru încărcarea cu gel vă recomandăm pipeta cu 8 canale, cu volum reglabil de 5 – 25 µl
15. Marker de dimensiunea ADN-ului pentru a acoperi intervalul de 50 – 1.000 bp, de exemplu, scară cu 100 de perechi de baze, Nr. produs pentru markerul de dimensiunea ADN-ului 103.202-100 sau marker de dimensiunea ADN-ului pentru cantități reduse de gel, Nr. produs 103.203-100
16. Aparat de electroforeză/sursă de alimentare
17. Transiluminator cu UV
18. Sistem de documentare cu fotografii sau imagini
19. Roche polimerază *Taq* ADN, clasă BPF. [Catalog # 03 734 927 001 (1000 U) sau # 03 734 935 001 (5000 U)].

C. Procedură pas cu pas

Consultați Indicațiile de utilizare.

INDICAȚII DE UTILIZARE**A. Pregătirea probelor**

1. Purificați ADN-ul genomic din proba cu leucocite prin metoda aleasă, consultați Colectarea și pregătirea probelor, de mai sus.
2. Pentru informații specifice privind pregătirea și depozitarea probelor, consultați Colectarea și pregătirea probelor, de mai sus.
3. Efectuați amplificarea prin PCR pe proba de ADN purificat folosind o tavă de tipizare *Olerup SSP*® sau depozitați proba de ADN până când este gata pentru tipizare.

B. Pregătirea reactivului/echipamentului

1. Programați un termociclor pentru a rula programul PCR *Olerup SSP*®, consultați Cerințe privind instrumentele – Parametrii de termociclare PCR de mai sus.
2. Țineți polimeraza Taq la îndemână (5 unități/μl), depozitați la -20 °C.
3. Preparați gelul de electroforeză, consultați secțiunea C – **Preparare electroforeză în gel** de mai jos.

C. Prepararea electroforezei în gel

Pentru *sistemul cu gel Olerup SSP*® 96 (Nr. produs 103.101-01)

1. Configurare
 - Aduceți la același nivel camera de turnare pentru 1 gel (Nr. produs 103.101-31) sau camera de turnare pentru 3 geluri (Nr. produsului 103.101-33) utilizând nivela cu bulă de aer și cele trei picioare reglabile pe înălțime.
 - Așezați tava (tăvile) pentru gel în camera de turnare.
2. 2% (m/ v) Prepararea gelului de agaroză
Utilizați agaroză de înaltă calitate pentru electroforeză, cu o rezoluție de 50 – 2.000 de fragmente de ADN de perechi de baze.
 - La 5 ml de 10 x tampon TBE (Tris-borat-EDTA) se adaugă 150 ml de apă distilată și 2 g de agaroză într-un flacon de sticlă de 500 ml.
 - Se dizolvă agaroză prin fierbere într-un cuptor cu microunde până când se obține 100 ml de soluție omogenă.
 - Lăsați soluția de gel dizolvat să se răcească la 60 °C, de ex. într-o etuvă.
 - Înainte de turnare, colorați gelul cu bromură de etidiu (10 mg/ml), 5 μl la 100 ml soluție de gel. Pentru a ușura maxim manipularea, utilizați sticlele noastre cu pipetă pentru bromură de etidiu (Nr. produs. 103.301-10). **Notă: Bromura de etidiu este cancerigenă. Manipulați cu echipament individual de protecție corespunzător.**
 - Turnați 100 ml de soluție de gel în tava pentru gel din camera de turnare. Introduceți 6 piepteni pentru gel (Nr. produs 103.101-21) în fantele tăvii pentru gel.
 - Lăsați gelul să se stabilizeze timp de 15 minute.
 - Turnați 750 ml de 0,5 x tampon TBE în rezervorul pentru gel. Scufundați tava pentru gel în cutia cu gel și scoateți cu atenție cei 6 piepteni pentru gel, prin ridicare.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup SSP*® fără polimerază *Taq*

Respectați instrucțiunile de utilizare ale producătorului atunci când utilizați sisteme alternative pentru electroforeză. Pentru a putea fi utilizate cu kiturile de tipizare HLA *Olerup SSP*®, aceste sisteme trebuie să permită identificarea produsele PCR care variază, ca dimensiune, între 50 și 1.100 de perechi de baze.

D. Procedura pe etape

1. Scoateți de la temperatura (temperaturile) de depozitare indicată (indicate): numărul corespunzător de probe de ADN, tava (tăvile) pentru primer, volumul de amestec principal și polimerază *Taq* (5 unități/μl) necesare pentru proba (probele) de ADN /tavă (tăvi) pentru primer selectată(e). Dezghețați la temperatura camerei (20 până la 25 °C)

Același amestec principal este folosit pentru toate kiturile *Olerup SSP*®.

2. Amestecați proba (probele) de ADN pentru scurt timp, într-un mixer vortex.
3. Așezați tava (tăvile) pentru primer într-un suport pentru tavă PCR.
4. **Kituri de joasă și înaltă rezoluție**
 - Centrifugați în vortex amestecul principal înainte de a lua părți alicote.
 - Cu o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați amestecul principal la temperatura camerei, polimerază *Taq* (5 unități/μl) și dH₂O într-un tub de 0,5 ml sau 1,5 ml. (Consultați tabelul 1 de mai jos pentru cantitățile corespunzătoare.)
 - Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotiți-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
 - Utilizând o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați 8 μl amestecul principal și dH₂O și 2 μl de dH₂O în godeul de control negativ, adică godeul cu perechile de primeri cu control negativ, din tava pentru primer.
 - Cu o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați proba de ADN la temperatura camerei în amestecul principal – dH₂O rămas. (Consultați tabelul 1 de mai jos pentru cantitățile corespunzătoare.)
 - Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotiți-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
 - Utilizând un dozator electronic cu un singur canal, distribuiți în părți alicote 10 μl din amestecul reactiv al probei în fiecare godeu, cu excepția godeului de control negativ de pe tava pentru primer.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup SSP®* fără polimerază Taq

Tabelul 1: Volumele componentelor necesare per test pentru un număr diferit de godeuri atunci când se utilizează amestec principal fără polimerază Taq.

Nr. de godeuri per test	Volum de amestec principal (μl)	Volumul probei de ADN (μl)	Volumul de dH ₂ O (μl)	Volumul de polimerază Taq (μl)	Nr. de godeuri per test	Volum de amestec principal (μl)	Volumul probei de ADN (μl)	Volumul de dH ₂ O (μl)	Volumul de polimerază Taq (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

Volumele recomandate enumerate mai sus includ volumul pentru compensarea variațiilor de pipetă și pentru pierderile de lichid de pe pereții interiori ai tuburilor.

5. Kituri Combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ și DQA-DQB-DR Îmbunătățite și HLA-C de înaltă rezoluție pentru kitul de alele frecvente

- Amestecați în mixerul vortex, amestecul principal.
- Cu o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați 8,3 μl polimerază Taq (5 unități/μl) la temperatura camerei și 511,7 μl dH₂O în tubul de 1,5 ml furnizat și care conține 312 μl de amestec principal.
- Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotații-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
- Cu o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați 8 μl din amestecul principal – *polimerază Taq* – dH₂O și 2 μl dH₂O în godeul de control negativ Nr. 96, adică godeul cu perechile de primeri cu control negativ.
- Cu o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați o probă de ADN de 206 μl la temperatura camerei la restul amestecului amestec principal – *polimerază Taq*– dH₂O.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup SSP*® fără polimerază Taq

- Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotiți-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
- Utilizând un dozator electronic cu un singur canal, distribuiți în părți alicote 10 µl din amestecul reactiv al probei în fiecare godeu, cu excepția godeului de control negativ Nr. 96 al tăvii pentru primer.

Important:

Asigurați-vă că aplicați proba peste primeri (uscați în partea de jos a fiecărui godeu al tăvii pentru primer), pentru a evita contaminarea încrucișată între godeuri. Atingeți peretele interior al godeului cu vârful pipetei pentru ca proba să alunece în jos până pe fundul godeului. Verificați dacă toate probele au ajuns pe fundul fiecărui godeu. În caz contrar, loviți ușor tava de masa de lucru, astfel încât toate probele să se așeze pe fundul godeului înainte de a începe procesul PCR.

5. Acoperiți tava (tăvile) pentru primer cu foliile adezive de etanșare PCR furnizate. Verificați dacă toate godeurile de reacție sunt acoperite în totalitate pentru a preveni pierderea prin evaporare în timpul amplificării prin PCR. Placa de compresie *Olerup SSP*® (Nr. produs 103.505-06) poate fi așezată peste foliile adezive de etanșare PCR pentru a preveni evaporarea în timpul termociclării.
6. Așezați tava (tăvile) pentru primer în termociclor utilizând un adaptor adecvat pentru tavă și pentru tuburi. Nu depășiți cu mai mult de 5 minute intervalul dintre configurarea PCR și termociclare.
7. Introduceți numărul programului dvs. *Olerup SSP*®. Specificați un volum de reacției de 10 µl.
8. Porniți programul pentru PCR. Programul durează aproximativ 1 oră și 20 de minute.
9. Scoateți tava (tăvile) pentru primer din termociclor. Inspectați tava PCR pentru a vă asigura că în fiecare godeu PCR este aproximativ același volum de lichid. Supuneți probele la electroforeză; consultați secțiunea E – Electroforeză în gel, de mai jos. Interpretați rezultatele tipizării utilizând **tabelele de interpretare specifice lotului și tabelele de specificitate sau foile de lucru**. Consultați secțiunea Valori preconizate de mai jos.

E. Electroforeză în gel

1. După încheierea reacției PCR, orientați tava pentru primer și cutia cu gel. Ordinea godeurilor este de la stânga la dreapta și de sus în jos.
2. Scoateți cu grijă benzile de capace, fără să vărsați produsele PCR.
3. Încărcați produsele PCR în ordine, în gelul de agaroză 2%. (Nu este necesar să adăugați soluția tampon de încărcare a gelului.) Pentru încărcarea cu gel se recomandă utilizarea unei pipete cu 8 canale.
4. Încărcați un marker de dimensiune ADN (scară cu 100 de perechi de baze, Nr. produs pentru markerul de dimensiune ADN 103.202-100 sau Marker de dimensiune ADN pentru cantități reduse de gel are Nr. produs 103.203-100) într-un singur godeu de pe fiecare rând.
5. Acoperiți cutia pentru gel cu capacul acesteia.
6. Supuneți gelul la procesul de electroforeză în soluție tampon TBE de 0,5 x, fără a recircula soluția tampon, pentru 15 – 20 de minute, la 8 – 10 V/cm.
7. Transferați tava cu gel la un transiluminator cu UV.
8. Fotografați gelul cu sau fără tava pentru gel.
9. Marcați fotografia în conformitate cu regulile laboratorului.

CONTROLUL CALITĂȚII

Instrucțiunile privind testarea HLA ASHI indică faptul că un godeu de control negativ (contaminare) trebuie inclus în fiecare configurare PCR. (Standarde revizuite pentru laboratoare acreditate, Societatea Americană pentru Histocompatibilitate și Imunogenetică, Standarde finale revizuite aprobate de CMS: 16 februarie 2021). Un godeu de control negativ este inclus în toate kiturile, cu excepția kiturilor cu doză unică HLA-B*27 și cu un singur godeu HLA-B*27.

Consultați Interpretare gel de la pagina 14.

REZULTATE

Fișele de validare a liniei celulare specifice lotului și certificatul de analiză pot fi accesate online, www.caredx.com.

LIMITĂRI ALE PROCEDURII

1. Procesul PCR-SSP necesită condiții de testare riguros controlate pentru a asigura o amplificare diferențiată în mod corespunzător. Procedura descrisă în instrucțiunile de utilizare trebuie urmată cu strictețe.
2. Proba de ADN extrasă reprezintă șablonul pentru procesul specific de amplificare PCR. ADN-ul purificat trebuie să aibă un raport $A_{260/280}$ cuprins între 1,6 și 2,0 pentru o vizualizare optimă a benzii la electroforeză.
3. Toate instrumentele, de exemplu, termociclorul și dispozitivele de pipetare, trebuie să fie calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.
4. Informațiile specifice lotului sunt prezentate în prospectul produsului: Informații specifice lotului și în Foaia de lucru specifică lotului.
5. Pe baza testelor efectuate, următoarele substanțe au fost evaluate prin trei (3) metode de extracție la concentrațiile enumerate și s-a constatat că acestea nu afectează rezultatele testelor.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup* SSP® fără polimerază Taq

Metodă de extracție	Substanță de interferență	Concentrație de interferență*
Sistem pentru extragerea ADN-ului din sânge EZ1 DSP	Bilirubină	200 mg/L
	Hemoglobină	200 g/L
	Trigliceride	30 g/L
	Proteină	110 g/L
Kit pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAamp DSP	Bilirubină	200 mg/L
	Hemoglobină	200 g/L
	Trigliceride	18,2 g/L
	Proteină	77 – 96 g/L
Metoda Gentra PureGene	Bilirubină	200 mg/L
	Hemoglobină	200 g/L
	Trigliceride	18,2 g/L
	Proteină	119 – 146 g/L

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® fără polimerază Taq

6. Plăcile PCR sunt compatibile cu majoritatea termocicloarelor de pe piață. Consultați tabelul pentru compatibilitate piese din material plastic- termociclor de mai jos.

Notă: Tabelul are exclusiv rol informativ. Pentru a vedea care sunt termocicloarele validate, consultați secțiunea Cerințe privind instrumentele – Instrument.

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










7. Performanța acestui kit cu amestec principal fără polimerază Taq a fost validată doar cu ROCHE polimerază Taq ADN, clasă BPF (Catalog # 03 734 927 001 sau #03 734 935 001). Rezultatele testelor cu orice alte enzime nu sunt cunoscute și trebuie stabilite și validate de către utilizator.

VALORI PRECONIZATE**A. Analiza datelor**

Examinați cu atenție fotografia gelului și identificați benzile pozitive.

1. O bandă mai scurtă, cu migrare mai rapidă va fi vizibilă pe o bandă de gel dacă alela (alelele) HLA specifică(e) a(u) fost amplificată(e). Acest lucru indică un rezultat pozitiv al testului.
 - a. Înregistrați prezența și absența produselor PCR specifice.
 - b. Atunci când se interpretează rezultatele testului cu gel, este util să se monitorizeze lungimile relative ale produselor PCR specifice, așa cum sunt ele menționate în prospectele specifice lotului de produse. Mai multe benzi au două sau mai multe lungimi posibile de produse PCR specifice. Aceste godeuri conțin mai multe perechi de primeri care generează produse PCR de diferite dimensiuni, în funcție de alelele HLA ale ADN-ului probei.
 - c. Potrivii modelul benzilor de gel cu produsele PCR specifice, conform informațiilor din Tabelele de interpretare în funcție de lot și din Tabelele de specificitate pentru a realiza tipizarea HLA a ADN-ului probei.
2. Ar trebui ca pe toate benzile de gel, cu excepția benzii de gel de control negativ, să fie vizibilă o bandă de control intern pozitiv, mai lungă și cu migrație mai lentă, ca măsură de control a amplificării reușite. Este posibil ca banda de control intern pozitiv să fie mai puțin vizibilă sau să lipsească de pe benzile de gel pozitive.
 - a. Înregistrați prezența și lungimile relative ale benzilor de control intern pozitiv. Benzile de control de diferite dimensiuni sunt utile pentru orientarea corectă a tipizării, precum și pentru identificarea kitului.
 - b. Absența benzii de control intern pozitiv fără produs PCR specific indică o reacție PCR nereușită.
 - i. Dacă alelele HLA pot fi determinate în prezența reacției (reacțiilor) PCR eșuate, iar reacția (reacțiile) PCR eșuată (eșuate) nu modifică atribuirea alelei, atunci nu este nevoie ca testul să fie repetat.
 - ii. Dacă, totuși, reacția (reacțiile) PCR eșuată (eșuate) pot modifica atribuirea alelei HLA, atunci tipizarea trebuie repetată.
3. Prezența unui produs PCR specific sau a unei benzi de control intern pozitive în banda (benzile) de control negativ indică contaminarea cu produs(e) PCR și anulează toate rezultatele testelor. Oligomerii de primer de la 40 până la 60 de perechi de baze pot fi observați pe banda (benzile) de control negativ. Acest lucru nu reprezintă contaminarea.

B. Interpretarea gelului

	Reacție pozitivă	Reacție negativă	Reacție PCR eșuată
Godeu			
Bandă internă de control pozitiv			
Bandă specifică			
Bandă pentru primer			

1. Un marker de dimensiunea ADN-ului (scară cu 100 de perechi de baze, Nr. produs 103.202-100 pentru Markerul de dimensiune ADN sau un marker de dimensiunea ADN-ului pentru cantități reduse de gel cu Nr. produs 103.203-100) trebuie introdus în câte un godeu de pe fiecare rând al gelului sau în conformitate cu reglementările locale de acreditare a laboratoarelor.
2. Se pot obține benzi mai lungi decât banda de control intern pozitiv, iar acestea nu trebuie să fie luate în considerare la interpretarea rezultatelor tipizării.
3. Primerii neutilizați vor forma o bandă difuză mai scurtă, cu 50 de perechi de baze.
4. Se pot observa artefacte de oligomer în primer. Acestea sunt mai lungi decât banda pentru primer, dar mai scurte decât benzile specifice.

CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ SPECIFICE

Controlul calității lotului de kituri

Fiecare soluție de primer este testată pe o gamă de 48 de probe de ADN prelevate din linii celulare bine definite ale IHWC, consultați fișa (fișele) de validare a liniei celulare specifice lotului din prospectul produsului, informații specifice lotului.

Metoda de comparație

S-a efectuat un studiu pentru a compara kiturile de tipizare HLA *Olerup SSP*[®] cu și fără polimerază Taq furnizate în amestecul principal pentru PCR. Scopul studiului a fost de a demonstra că adăugarea manuală nu influențează rezultatele testului și că loturi diferite de polimerază Taq dau aceleași rezultate. Studiul a inclus 15 probe de DNA cu tipizare la rezoluție mică de HLA-A, -B (Clasa I) și -DRB (clasa II) cu genotip HLA cunoscut preluate din colecția Atelierul internațional de histocompatibilitate. Probele au fost preparate și codificate de personal diferit de cel care a efectuat

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® fără polimerază Taq

testarea; personalul de testare nu a fost informat cu privire la tipurile HLA ale probelor. Fiecare probă a fost testată în paralel cu tava HLA-A-B-DR Combi Olerup SSP® cu amestec principal pentru PCR fără polimerază Taq („Test”) și tava HLA-A-B-DR Combi Olerup SSP® cu amestec principal pentru PCR cu polimerază Taq („Control”), în conformitate cu instrucțiunile din prospectul de produs pentru fiecare test. Toate testele au fost efectuate în laboratorul CareDx AB din Stockholm, Suedia, cu un lot de kituri și două loturi de polimerază Taq. Pentru studiu s-a folosit Roche polimerază Taq ADN, clasa BPF. Testarea fiecărei probe a constat din tipizare la rezoluție mică cu tava Olerup SSP® HLA-A-B-DR Combi, pentru care s-a folosit: 1) Amestec principal pentru PCR inclusiv polimerază Taq (test aprobat de FDA) (test de control), 2) Amestec principal pentru PCR plus Roche polimerază Taq ADN, produs clasa BPF, 5 U/μL; Lotul #1 (lotul de testare #1) și 3) Amestec principal pentru PCR plus Roche polimerază Taq ADN, produs clasa BPF, 5 U/μL; Lotul #2 (lotul de testare #2). După PCR, detectarea a fost efectuată prin electroforeză în gel. Rezultatele sunt sintetizate mai jos.

Comparație	Acord			% acord (interval de încredere de 95% ^a)
	Rezultate tipizare clasa I (# acord/total)		Rezultate tipizare clasa II (# acord/total)	
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Lot de testare #1 / Lot de control	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lot de testare #1 / Consens ^b	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lot de testare #2 / Lot de control	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lot de testare #2 / Consens	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Lot de testare #1 / Lot de testare #2	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)

^a Metodă de punctare

^b Rezultat de consens din colecția Atelierul internațional de histocompatibilitate

BIBLIOGRAFIE

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: O tehnică sensibilă, specifică și rapidă. *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: O alternativă la tipizarea serologică a DR în practica clinică, inclusiv potrivirea donator-primitor în transplanturile cadaverice. *Tissue Antigens* 1992: **39**: 225-235.
3. Alelele HLA actuale pot fi găsite pe www.ebi.ac.uk/imgt/hla

DEPANAREA

Problema	Motivul	Măsurile de luat
Fără amplificare (nici amplificarea fragmentelor de control intern, nici amplificări specifice).	Cantitate prea mică de ADN.	Măsurați concentrația ADN-ului și vedeți dacă cantitatea adăugată este corectă. Contaminarea ARN-ului poate cauza o supraestimare a concentrației ADN-ului, în urma spectrofotometriei. Repețiți cu atenție extracția ADN-ului, utilizând soluții proaspăt preparate. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	ADN-ul conține inhibitori PCR, de ex., proteine, etanol (din pașii de precipitare), matrice rămase din produsele solide de purificare ADN.	Evaluați calitatea ADN-ului. Recomandăm utilizarea unui raport A260/A280 de 1,6 – 2,0 prin spectrofotometrie cu UV. Respectați cu strictețe protocolul furnizorului de extracție a ADN-ului. Extrageți din nou ADN-ul. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	ADN-ul a fost extras din sânge heparinizat.	Utilizați sânge neheparinizat sau protocoale de extragere a ADN din sânge heparinizat.
	ADN-ul este dizolvat într-o soluție tampon care conține EDTA.	Repețiți extragerea ADN-ului și dizolvați ADN-ul în dH ₂ O.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsuri de luat
Continuare: Fără amplificare (nici amplificarea fragmentelor de control intern, nici amplificări specifice).	Introducere accidentală a unui înălbitor în test.	Verificați din nou zonele în care este posibil să fi fost introdus înălbitor.
	Kiturile nu sunt păstrate la temperatura corectă.	Depozitați kiturile la -20 °C.
	Termociclorul nu funcționează în mod corespunzător.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6 – 12 luni.
	Contact necorespunzător între blocul de încălzire al termociclorului și tava de tipizare SSP.	Utilizați tava corectă/dispozitivul de fixare corect pentru godeuri de reacție de 0,2 ml, cu pereți subțiri. Consultați manualul termociclorului.
Eșec aleatoriu al amplificării (întreruperi).	Dacă nu sunt bine închise, foliile de etanșare PCR/capacele pentru tuburile PCR vor duce la apariția evaporării și, ulterior, la eșecul amplificării.	Asigurați-vă că foliile de etanșare PCR/toate capacele sunt bine închise. Placa de compresie®(Nr. produs 103.505-06) poate fi așezată peste foliile adezive pentru sigilări PCR pentru a preveni evaporarea în timpul termociclării.
	Greșeli la încărcarea cu gel.	Verificați dacă a fost încărcat numărul corect de godeuri și dacă fiecare godeu conține aproximativ același volum de amestec PCR.
	Utilizarea de pipete necalibrate.	Calibrați periodic toate pipetele, conform recomandărilor furnizorului.
	Erori de pipetare.	Pipetați cu mai multă atenție.
	Amestecul principal nu a fost omogenizat bine cu ADN-ul de probă înainte de utilizare.	Amestecați scurt, într-un mixer vortex, înainte de utilizare. Vă recomandăm să puneți

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsuri de luat
		fiecare rând în mixerul vortex.
	În godeurile s-au depus volume inegale de ADN și amestec principal.	Pipetați cu mai multă atenție.
Fragmente slabe de control intern.	ADN impur.	Evaluați calitatea ADN-ului. Raportul A260/A280 trebuie să fie de 1,6 – 2,0 prin spectrofotometrie în UV. Contaminarea ARN-ului poate cauza o supraestimare a concentrației ADN-ului, în urma spectrofotometriei. ADN-ul degradat determină apariția petelor pe benzile de gel. Repetăți cu atenție extracția ADN-ului, utilizând soluții proaspăt preparate. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Cantitate prea mică de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP. Contaminarea ARN-ului poate cauza o supraestimare a concentrației ADN-ului, în urma spectrofotometriei. ADN-ul degradat determină apariția petelor pe benzile de gel.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup SSP*® fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsuri de luat
Continuare: Fragmente slabe de control intern.		Repetati cu atenție extracția ADN-ului, utilizând soluții proaspăt preparate. Vă recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Temperatura de recoacere este prea mare, termociclorul nu este calibrat.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6 – 12 luni.
	Amestecul principal pentru PCR a fost păstrat la + 4 °C pentru mai mult de 2 săptămâni.	Depozitați în mod corespunzător amestecul principal pentru PCR.
Amplificare nespecifică (scări sau froțiuri).	Utilizarea în exces a probei de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru determinarea ADN-ului în sânge QIAGEN EZ1 DSP. Unele soluții de primeri tind să genereze mai des amplificare nespecifică; consultați notele de subsol din fiecare Tabel de specificitate specific lotului.
	ADN impur.	Niciun fragment mai mare decât fragmentul de control intern nu trebuie luat în considerare la interpretarea rezultatelor obținute. Verificați calitatea ADN-ului. Repetați extracția ADN-ului.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup* SSP® fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsuri de luat
		<p>Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.</p> <p>Unele soluții de primeri tind să genereze mai des amplificare nespecifică; consultați notele de subsol din fiecare Tabel de specificitate specific lotului.</p>
Semnale de amplificare tot mai slabe în timp.	Soluția de colorare a gelului cu bromură de etidiu este veche.	Pregătiți o soluție proaspătă de bromură de etidiu pentru o mai bună colorare a gelului de agaroză și un semnal mai bun. Efectele de umbră cauzate de primeri sunt ușor de detectat dacă colorarea gelului de agaroză este normală.
	Una dintre lămpile cu UV este defectă.	Verificați echipamentul cu lumină UV. Efectele de umbră cauzate de primeri sunt ușor de detectat dacă lumina UV este normală.
	S-a folosit o cantitate prea mică de probă de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Temperatura de recoacere este prea mare, termociclorul nu este calibrat.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6 – 12 luni.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup SSP*[®] fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsuri de luat
Modele neobișnuite de amplificare.	Se utilizează un tabel de interpretare specific lotului/o foaie de lucru incorect(ă).	Verificați numărul de lot al produsului utilizat și tabelul de interpretare/foaia de lucru utilizat(ă).
	Ordine incorectă la încărcarea cu gel.	Verificați alinierea amestecurilor și a benzilor de gel.
	Modelul de amplificare conține un rezultat fals pozitiv.	Vedeți mai jos.
	Modelul de amplificare conține un rezultat fals negativ.	Vedeți mai jos.
Amplificări cu rezultat fals pozitiv.	Contaminarea ADN-ului.	Utilizați mănuși, vârfuri de pipetă cu bariere (dopuri filtrante) și încăperi separate pentru manipulările pre-PCR și post-PCR. Asigurați manipularea corectă a tuturor probelor, pe parcursul fiecărei etape. Verificați dacă există urme de contaminare utilizând kitul pentru testare prin ștergere <i>Olerup SSP</i> [®] .
	ADN impur.	Evaluați calitatea ADN-ului. Respectați cu strictețe protocolul furnizorului de extracție a ADN-ului. Încercați alte sisteme de extracție a ADN-ului. Extrageți din nou ADN-ul. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul pentru determinarea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Utilizarea în exces a probei de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup* SSP® fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsurile de luat
Continuare: Amplificări cu rezultat fals pozitiv.		pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Temperatura de recoacere este prea mică.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6 – 12 luni.
	Întârziere semnificativă între configurarea PCR și începerea termociclării.	Nu este permisă o întârziere mai lungă de 5 minute înainte de termociclare.
	Interval prea mare de timp între așezarea tăvilor de tipizare în termociclor și începerea termociclării.	Utilizați un termociclor preîncălzit.
	Utilizarea de bromură de etidiu în exces.	Utilizați cantitatea de bromură de etidiu recomandată.
	Interpretarea incorectă a unui artefact ca bandă specifică.	Verificați tabelul de specificitate specific lotului/foaia de lucru cu privire la dimensiunea corectă a benzii și notele de subsol.
	Modelul de amplificare conține un rezultat fals pozitiv.	Verificați dacă toate amplificările specifice au mărimea corectă sau dacă un artefact (transfer, primer-dimer) a fost interpretat greșit ca amplificare.
	Ordine incorectă la încărcarea cu gel.	Verificați alinierea amestecurilor și a benzilor de gel.
Amplificări fals negative.	Termociclorul nu este calibrat corect.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6 – 12 luni.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup* SSP® fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsuri de luat
		Dacă nu este corectat prin recalibrare, tipizați din nou testul cu o probă de referință cu aceeași specificitate. Dacă se confirmă rezultatul negativ, contactați departamentul de asistență pentru clienți.
	Ordine incorectă la încărcarea cu gel.	Verificați alinierea amestecurilor și a benzilor de gel.
Probleme generale legate de gel (geluri neclare și/sau benzi cu frotiu).	Probă de ADN degradată.	Apare ca un frotiu pe benzile de gel. Izolați ADN-ul dintr-o probă proaspătă.
	Numeroase striții în godeuri aleatorii.	Suspensii inegale de ADN. Asigurați-vă că ADN-ul de probă este dizolvat înainte de a lua părțile alicote. Amestecați în mixerul vortex, proba de ADN diluată.
	Produsul PCR a ieșit afară din godeu.	Aliniați cu atenție vârful pipetei la godeurile de gel și dozați cu grijă.
	Este posibil ca tamponul de electroforeză să fie prea cald.	Pregătiți un nou tampon TBE. Aplicați o tensiune mai mică.
	S-a utilizat un procent incorect de gel de agaroză.	Asigurați-vă că se utilizează gelul de agaroză recomandat de 2%.
	Agaroză nu s-a dizolvat complet.	Fierbeți din nou pentru o perioadă scurtă de timp pentru a topi agaroză.
	Concentrație incorectă de TBE.	Utilizați concentrația recomandată de 0,5 x TBE.
	Gelurile au fost turnate prea devreme.	Gelurile nu pot fi utilizate decât după 15 minute de la turnare.

Instrucțiuni de utilizare
Kituri de tipizare HLA *Olerup SSP*[®] fără polimerază Taq

Problema	Motivul	Măsuri de luat
	Gelurile sunt prea vechi.	Nu turnați gelurile cu prea mult timp înainte.
	Pieptenele pentru gel utilizat are dinții prea mari.	Utilizați piepteni cu dinți subțiri (4 x 1 mm).
	Tava pentru gel nu este transparentă la UV.	Scoateți gelul din tava pentru gel înainte de vizualizare.
	Imaginea gelului este prea luminoasă.	Utilizare în exces de bromură de etidiu. Verificați setările camerei.
	Imaginea gelului este prea întunecată.	Utilizați cantitatea de bromură de etidiu recomandată. Verificați setările camerei.
Probleme generale de amplificare fals negativă sau probleme care țin de intraserii de acest tip	Viteza de creștere a fost setată la o valoare prea mare.	Kiturile Olerup SSP sunt validate utilizând termociclorul GeneAmp 9700 setat pe modul 9600 și ProFlex cu o viteză de încălzire/răcire de 3 °C/s. Vitezele de încălzire/răcire mai mari decât acestea pot influența rezultatele tipizării.

MĂRCI UTILIZATE ÎN ACEST DOCUMENT/PRODUS

Olerup SSP[®] este o marcă înregistrată a *CareDx AB*.

Qiagen[™] este o marcă a QIAGEN.

NOTIFICARE CĂTRE CUMPĂRĂTOR: Kiturile *Olerup SSP*[®] fără polimerază *Taq* – Acest produs este optimizat pentru utilizarea cu Roche polimerază *Taq*, clasa BPF (Catalog # 03 734 927 001 sau #03 734 935 001) în procesul de reacție în lanț a polimerazei („PCR“), pentru care Roche Molecular Systems, Inc. și F. Hoffmann-La Roche Ltd. („Roche“) au primit un brevet. Laboratorul este responsabil cu contactarea companiei Roche Molecular Systems, Inc. pentru a determina dacă conform acestor brevete este necesară o licență.

GARANȚIE

CareDx AB garantează pentru cumpărătorul inițial produsele sale împotriva defectelor materialelor sau de producție în condiții normale de utilizare și aplicare. Singura obligație a *CareDx AB* în temeiul acestei garanții este de a înlocui, în mod gratuit, orice produs care nu respectă standardele de performanță menționate în fișa de specificații a produsului.

Această garanție se aplică numai produselor care au fost manipulate și depozitate în conformitate cu recomandările *CareDx AB* și nu se aplică produselor care au făcut obiectul alterării, utilizării incorecte sau abuzului.

Toate cererile în temeiul acestei garanții trebuie să fie direcționate către *CareDx AB* în scris și trebuie să fie însoțite de o copie a facturii cumpărătorului. Această garanție înlocuiește toate celelalte garanții, exprimate sau implicite, inclusiv garanțiile de vandabilitate și adecvare pentru un anumit scop. În nici un caz *CareDx AB* nu va fi răspunzătoare pentru daune accidentale sau indirecte.

Acest produs nu poate fi reformulat, reambalat sau revândut sub nicio formă fără acordul scris al *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Suedia.

Manipulați toate probele ca transmisibile de boli. Toate lucrările trebuie efectuate purtând mănuși și protecție adecvată.

GARANȚIE

CareDx AB garantează că primerii din tăvile de tipizare *Olerup SSP*[®] au specificațiile menționate date în foaia de lucru, tabelele de specificitate specifice lotului din prospectul produsului.

ADRESE:

Producător:

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

Tel: +46-8-508 939 00

Fax: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Pagina web: www.caredx.com

Distribuit de:

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

Tel: +46-8-508 939 00

Fax: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Pagina web: www.caredx.com

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

Tel: 1-877-653-7871

Fax: 610-344-7989

E-mail: orders-us@caredx.com

Pagina web: www.caredx.com

CareDx Pty Ltd., 20 Collie Street, Fremantle WA 6160, Australia.

Tel: +61 8 9336 4212

E-mail: orders-aus@caredx.com

Pagina web: www.caredx.com

Reprezentant autorizat:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Pentru informații despre distribuitorii CareDx din întreaga lume, contactați CareDx AB.

1593-LBL v02 este tradus din documentul în limba engleză master 0193-LBL v07 Olerup SSP® HLA typing kits without Taq polymerase.

Schimbări în versiunea 0193-LBL v07 față de 0193-LBL v06:

1. Adăugarea reprezentant autorizat elvetian.
2. Adăugarea GelRed la secțiunea B. Materiale necesare, dar care nu sunt furnizate.