



# Návod na použitie

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

Autorské práva © 2023 CareDx, Inc. Všetky servisné známky alebo ochranné známky sú vlastnené alebo licenčne poskytované spoločnosťou CareDx, Inc alebo jej pridruženými spoločnosťami. Všetky práva vyhradené.

1596-LBL v02 Typizačné súpravy Olerup SSP<sup>®</sup> HLA bez Taq polymerázy

Na *in-vitro* diagnostické použitie

Dátum revízie: septembra 2023



Strana 1 z 30

## Na diagnostické použitie *in vitro*

### ÚČEL POUŽITIA

Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA sú kvalitatívne diagnostické súpravy *in vitro* na typizáciu DNA alel HLA triedy I a alel HLA triedy II. Tieto produkty používajú vyškolení odborníci v zdravotníckych zariadeniach na určenie fenotypu HLA. Testovaným zdrojovým materiálom je DNA.

### SÚHRN A VYSVETLENIE

Ľudské leukocytové antigény (HLA) sa kedysi stanovovali testom lymfocytotoxicity. Tento test bol však nahradený postupmi typizácie DNA založenými na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) pre jeho chybovosť a nemožnosť rozlíšenia na úrovni alel. V rámci väčšina postupov založených na PCR sa proces PCR používa iba ako amplifikačný krok požadovanej cieľovej DNA. Zároveň sa vyžaduje krok následnej amplifikácie na odlíšenie jednotlivých alel. V rámci metodológie PCR-SSP (sequence-specific primer – SSP) dochádza na rozdiel od uvedeného k odlíšeniu jednotlivých alel počas procesu PCR. Vďaka tomu sa skraca a zjednodušuje krok následnej amplifikácie na jednoduchý krok detekcie gélovej elektroforézy. Výsledky testov SSP sú buď pozitívne, alebo negatívne, vďaka čomu odpadá potreba komplikovanej interpretácie výsledkov. Okrem toho je rozlíšenie typizácie PCR-SSP vyššie ako pri iných technikách typizácie PCR, pretože každý základný pár primérov definuje dva sekvenčné motívy umiestnené v *cis*, t. j. na rovnakom chromozóme. Okrem toho sa vďaka syntetickej povahe reagensov SSP zlepšila stabilita a obmedzil sa výskyt odchýlok medzi šaržami.

### PRINCÍP POSTUPU

Metodológia PCR-SSP je založená na takom princípe, že úplne alebo takmer úplne zhodné oligonukleotidové priméry bez 3'-koncových nezhôd sa v rámci reakcie PCR používajú efektívnejšie ako nezhodné priméry, a to vďaka termostabilným polymerázam DNA bez vlastností „proofreadingu“ (overovania). Páry primérov sú navrhnuté tak, aby sa spárovali s jednotlivými alelami alebo skupinami alel v závislosti od stupňa požadovaného typizačného rozlíšenia. V prípade striktno kontrolovaných podmienok PCR umožňujú zhodné alebo takmer úplne zhodné páry primérov výskyt amplifikácie (t. j. pozitívny výsledok), zatiaľ čo nezhodné páry primérov neumožňujú amplifikáciu (t. j. negatívny výsledok).

Po dokončení procesu PCR sa amplifikované fragmenty DNA oddelia podľa veľkosti, napr. agarózovou gélovou elektroforézou, vizualizujú sa zafarbením etídiumbromidom a expozíciou voči ultrafialovému svetlu, fotograficky sa zdokumentujú a následne interpretujú. Interpretácia výsledkov PCR-SSP je založená na prítomnosti alebo neprítomnosti špecifického produktu PCR. Relatívne veľkosti špecifických produktov PCR môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov. Metodológiu PCR-SSP pre HLA pôvodne predstavil O. Olerup v rokoch 1991 a 1992<sup>1,2</sup>.

Keďže proces PCR môže byť nepriaznivo ovplyvnený rôznymi faktormi (napr. chyby počas pipetovania, príliš nízka koncentrácia DNA, nedostatočná kvalita DNA,

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

prítomnosť inhibítorov PCR, nepresnosť tepelného cyklu), do každej reakcie PCR sa zahrnie pár primérov internej pozitívnej kontroly<sup>2</sup>. Pár primérov internej pozitívnej kontroly sa zhoduje so zachovanými oblasťami génu ľudského rastového hormónu, ktorý sa nachádza vo všetkých vzorkách ľudskej DNA. V prítomnosti špecifického produktu PCR alel HLA môže byť výsledok pásma internej pozitívnej kontroly slabý alebo môže chýbať. Amplikóny generované špecifickými párami primérov sú kratšie ako amplikóny páru primérov internej pozitívnej kontroly, ale väčšie ako neregistrované priméry (pozri časť Predpokladané hodnoty).

## REAGENCIE

### A. Identifikácia

Typizačné súpravy Olerup SSP® obsahujú vysušené, vopred optimalizované a sekvenčnej špecifické priméry na amplifikáciu PCR alel HLA a génu ľudského rastového hormónu – hlavnú zmes PCR bez polymerázy Taq („hlavná zmes“) a adhezívne uzávery PCR.

Roztoky primérov sa vopred rozdelia na alikvotné časti a sušia sa v 0,2 ml kalíškoch vyrezaných tenkostenných zásobníkov PCR. Každý kalíšok zásobníka obsahuje vysušený roztok priméru pozostávajúci zo špecifickej zmesi priméru, t. j. primérov HLA špecifických pre alely a skupiny, ako aj z páru primérov internej pozitívnej kontroly zodpovedajúcim nealelickým sekvenciám, ktoré sú pripravené na pridanie vzorky DNA, hlavnej zmesi a H<sub>2</sub>O.

Priméry sú vytvorené na optimálnu amplifikáciu PCR pri použití hlavnej zmesi a použitie odporúčaného cyklického programu DNA (pozri časť Programovanie tepelného cyklovača).

Tabuľky špecificity podľa šarží a tabuľky interpretácie alebo pracovný hárok pre špecifické alely HLA amplifikované každou zmesou priméru nájdete na webovej lokalite [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### B. Varovania a preventívne opatrenia

1. Na *diagnostické použitie in vitro*.
2. Tento produkt nesmie slúžiť ako jediný podklad na prijatie klinického rozhodnutia.
3. Varovanie pred biologickým rizikom: So všetkými krvnými produktmi zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými. Žiadne známe metódy testovania nedokážu poskytnúť záruku na to, že produkty získané z ľudskej krvi nebudú prenášať infekčné látky.
4. Varovanie pred biologickým rizikom: Etídiumbromid používaný na farbenie DNA v agarózovej gélovej elektroforéze je karcinogén. Na manipuláciu používajte vhodné osobné ochranné prostriedky.
5. Upozornenie: Používajte ochranu zraku blokujúcu UV žiarenie a pri prezeraní alebo fotografovaní gélov sa nepozerajte priamo do zdroja UV svetla.
6. Pipety a iné vybavenie používané na manipuláciu **po** PCR by sa **nemali** používať na manipuláciu **pred** PCR.
7. Podrobné informácie nájdete na karte bezpečnostných údajov ([www.caredx.com](http://www.caredx.com)).

**C. Návod na použitie**

Prečítajte si pokyny na použitie.

**D. Pokyny na skladovanie**

Komponenty súpravy skladujte v tmavom prostredí pri teplotách uvedených na štítkoch obalov.

Produkt použite pred uplynutím dátumu expirácie vytlačeného na štítkoch obalov.

**E: Čistenie alebo spracovanie vyžadované na použitie**

Prečítajte si pokyny na použitie.

**F. Indikácie nestability**

1. Nepoužívajte zásobníky s primérom s prasklinami v kalíškoch alebo poškodením hornej obruby kalíškov – v opačnom prípade hrozí riziko odparovania počas amplifikácie PCR. Nepoužívajte pásky s viečkami PCR s prasklinami – v opačnom prípade hrozí riziko odparovania počas amplifikácie PCR.
2. Pelety v kalíškoch by mali byť červenej farby. Žlté sfarbenie peliet môže naznačovať ich degradáciu.
3. Hlavná zmes by mala mať červenú až fialovú farbu. Žlté až oranžové sfarbenie môže naznačovať degradáciu.

**POŽIADAVKY NA PRÍSTROJE****A. Prístroj**

Je potrebné používať tepelný cyklovač s nasledujúcimi minimálnymi špecifikáciami:

- vyhrievané veko s teplotou 104 °C (bezolejová prevádzka)
- blok vzoriek (hliníkové, strieborné alebo pozlátené striebro) na použitie s platničkou na PCR s 96 kalíškami alebo s 0,2 ml tenkostennými reakčnými skúmavkami
- Použitie súprav Olerup SSP je schválené v nasledujúcich cyklovačoch. Odporúčané miery tepelnej strmosti:
  - GeneAmp 9700: Cyklovač GeneAmp 9700 nastavený do režimu 9600. To zodpovedá **miere tepelnej strmosti vzorky** 1,6 °C/s smerom nahor a 0,8 °C/s smerom nadol.
  - Blok ProFlex, 1 x 96 kalíškov: Cyklovač ProFlex PCR s mierou tepelnej strmosti bloku 3,0 °C/s (každý krok po 3,0 °C/s). **Miera tepelnej strmosti bloku** 3,0 °C/s zodpovedá miere tepelnej strmosti vzorky 1,52 °C/s smerom nahor a 1,36 °C/s smerom nadol.
  - Blok ProFlex, 2 x 96 kalíškov: Cyklovač ProFlex PCR s mierou tepelnej strmosti bloku 3,0 °C/s (každý krok po 3,0 °C/s). **Miera tepelnej strmosti bloku** 3,0 °C/s zodpovedá miere tepelnej strmosti vzorky 1,9 °C/s smerom nahor a 1,6 °C/s smerom nadol.

**Poznámka: Vyššie miery tepelnej strmosti než miery, ktoré sú uvedené vyššie, môžu ovplyvňovať výsledky typizácie. Upozorňujeme, že vplyv na typizáciu sa v závislosti od nastavení môže v rôznych neschválených cyklovačoch odlišovať.**

- teplotný rozsah od 4,0 °C do 99,9 °C
- presnosť teploty  $\pm 0,25$  °C v rozsahu od 35 °C do 99,9 °C
- rovnomernosť teploty bloku vzoriek  $\leq 0,75$  °C v rozsahu od 55 °C do 95 °C
- kalibrácia teploty sledovateľná podľa referenčného štandardu (t. j. NIST)

Naprogramujte tepelný cyklovač použitím parametrov cyklovania PCR v časti B nižšie.

Špecifické informácie o tepelných cyklovačoch nájdete v používateľskej príručke od výrobcu. Tepelné cyklovače by mali byť kalibrované podľa akreditačných pravidiel spoločnosti ASHI (Americká spoločnosť pre histokompatibilitu a imunogenetiku) alebo EFI (Európska federácia imunogenetiky).

Než začnete s pokynmi na použitie uvedenými nižšie, naprogramujte tepelný cyklovač.

Návod na použitie  
Typizačné súpravy *Olerup SSP*® HLA bez Taq polymerázy

**B. Parametre cyklov PCR**

- |    |                    |       |       |                                      |
|----|--------------------|-------|-------|--------------------------------------|
| 1. | 1 cyklus           | 94 °C | 2 min | denaturácia                          |
| 2. | 10 cyklov          | 94 °C | 10 s  | denaturácia                          |
|    |                    | 65 °C | 60 s  | žihanie a rozšírenie                 |
| 3. | 20 cyklov          | 94 °C | 10 s  | denaturácia                          |
|    |                    | 61 °C | 50 s  | žihanie                              |
|    |                    | 72 °C | 30 s  | rozšírenie                           |
| 4. | Koniec – podržanie | RT    |       | v prípade času kratšieho ako 8 hodín |
|    | 4 °C               |       |       | v prípade času dlhšieho ako 8 hodín  |

Celkový reakčný objem v každom kalíšku, 10 µl.

Vo všetkých súpravách *Olerup SSP*® sa používajú rovnaké parametre cyklovania  
PCR.

**ODBER A PRÍPRAVA VZORIEK**

Na typizáciu SSP sa vyžaduje extrahovaná DNA s vysokou čistotou. Vzorky DNA, ktoré sa použijú na typizáciu PCR-SSP HLA, by sa mali resuspendovať v dH<sub>2</sub>O. Na optimálnu vizualizáciu pásma počas elektroforézy by mal pomer A<sub>260/280</sub> podľa UV spektrofotometrie dosahovať hodnotu 1,6 – 2,0.

Odporúčame použiť automatizovanú extrakciu DNA pomocou systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Základným materiálom by mala byť krv ACD.

Alternatívne je možné DNA extrahovať akoukoľvek preferovanou metódou, výsledkom ktorej je čistá DNA. Pri použití alternatívnych metód by sa koncentrácia DNA mala upraviť na 30 ng/μl. **V rámci týchto postupov nepoužívajte heparinizovanú krv.**

Odporúčaná koncentrácia DNA s použitím:  
EZ1-extrahovaná DNA, 15 ng/μl.  
DNA extrahovaná inými metódami, 30 ng/μl.

Koncentrácie presahujúce 50 ng/μl zvýšia riziko nešpecifických amplifikácií a slabých extra pásiem, najmä pri typizáciách SSP HLA triedy I s vysokým rozlíšením. Podľa potreby zriedte extrahovanú DNA v dH<sub>2</sub>O.

**Vzorky DNA by sa nemali resuspendovať v roztokoch obsahujúcich chelátotvorné činidlá, ako je EDTA, s koncentráciou vyššou než 0,5 mM.**

Vzorky DNA sa môžu použiť ihneď po extrakcii alebo ich môžete uskladniť pri teplote +4 °C až na 2 týždne bez nežiaducich vplyvov na výsledky. Vzorky DNA sa môžu skladovať pri teplote -20 °C alebo nižšej počas 9 mesiacov. Čistota a koncentrácia extrahovaných vzoriek DNA, ktoré boli skladované dlhší čas, by sa mala pred typizáciou HLA testovať z hľadiska ich prijateľnosti.

Vzorky DNA by sa mali prepravovať pri teplote +4 °C alebo nižšej, aby sa zachovala ich integrita počas prepravy.

**POSTUP****A. Poskytnuté materiály**

1. Zásobníky na primér *Olerup SSP*®.
2. Hlavná zmes bez polymerázy *Taq* (vhodný objem pre zásobníky súpravy).  
Vo všetkých súpravách *Olerup SSP*® sa používa rovnaká hlavná zmes.
3. Adhezívne uzávery PCR (vhodný počet vzhľadom na zásobníky súpravy).

**B. Požadované materiály, ktoré netvoria súčasť dodávky**

1. Súprava/zariadenie na izoláciu DNA
2. UV spektrofotometer
3. Pipetovacie zariadenia. Odporúčame použiť elektronický jednokanálový dávkovač schopný dávkovať alikvoty s objemom 10 µl na pridanie zmesi DNA – hlavná zmes – dH<sub>2</sub>O do kalíškov zásobníka.
4. Jednorazové špičky pipiet
5. Polypropylénové skúmavky
6. Vírivý mixér
7. Mikroodstredivka
8. Stojan na zásobníky PCR
9. Tepelný cyklovač s vyhrievaným vekom pre PCR s 96 kalíškami, tepelný gradient vo vyhrievacom bloku ≤ 0,75 °C a zásobník/držiak na 0,2 ml tenkostenné reakčné kalíšky
10. Mikrovlnná rúra alebo horúca doska na ohrev agarózových roztokov
11. Agaróza elektroforéznej triedy, napr. FMC Seakem LE
12. Pufer 0,5 × TBE; pufer 1 × TBE je 89 mM tris-boritan, 2 mM EDTA disodný, pH 8,0
13. Fľaša s kvapkadlom a etídiumbromidom č. produktu 103.301-10 alebo fľaša s kvapkadlom GelRed č. produktu 103.302-05
14. Pipetovacie zariadenie na aplikáciu gélu. Odporúčame 8-kanálovú pipetu na aplikáciu gélu, nastaviteľný objem 5 – 25 µl
15. Marker veľkosti DNA na pokrytie rozsahu 50 – 1 000 bp, napríklad stupnica (rebríček) 100 bázičných párov, číslo produktu markera veľkosti DNA 103.202-100 alebo markera veľkosti DNA pre krátke gélové cykly 103.203-100
16. Prístroj na elektroforézu/zdroj napájania
17. UV transiluminátor
18. Fotografický alebo obrazový dokumentačný systém
19. Roche *Taq* DNA polymeráza, trieda GMP. [Katalógové číslo 03 734 927 001 (1000 U) alebo 03 734 935 001 (5000 U)].

**C. Podrobný postup**

Prečítajte si pokyny na použitie.



**POKYNY NA POUŽITIE****A. Príprava vzorky**

1. Metódou vlastného výberu purifikujte genomickú DNA zo vzorky leukocytov (pozri časť Odber a príprava vzoriek vyššie).
2. Špecifické informácie o príprave a skladovaní vzoriek nájdete v časti Odber a príprava vzoriek vyššie.
3. Vykonaajte amplifikáciu PCR na purifikovanej vzorke DNA pomocou typizačného zásobníka Olerup SSP® alebo uložte vzorku DNA dovtedy, kým nebude pripravená na typizáciu.

**B. Príprava reagentie/zariadenia**

1. Naprogramujte tepelný cyklovač na spustenie *programu Olerup SSP® PCR*; prečítajte si časť Požiadavky na prístroj – parametre cyklovania PCR vyššie.
2. Majte pripravený Taq polymerázu (5 jednotiek/μl), uchovávajte pri teplote - 20 °C.
3. Pripravte si gél na elektroforézu, pozri časť C – **Príprava gélovej elektroforézy nižšie.**

**C. Príprava gélovej elektroforézy**

Platí pre systém Olerup SSP® Gel System 96 (č. produktu 103.101-01)

**1. Nastavenie**

- Vyrovnajte odlievaciu komoru na 1 gél (č. produktu 103.101-31) alebo odlievaciu komoru na 3 gély (č. produktu 103.101-33) pomocou vyrovnávacej bubliny a troch výškovo nastaviteľných nožičiek.
- Do odlievacej komory vložte gélové zásobníky.

**2. Príprava agarózového gélu 2 % (hm.)**

Použite vysokokvalitnú agarózu elektroforéznej triedy, ktorá dokáže odlišiť 50 – 2000 fragmentov bazických párov DNA.

- Do 5 ml pufru 10 × TBE (Tris-boritan EDTA) pridajte 150 ml destilovanej vody a 2 g agarózy do sklenenej fľaše s objemom 500 ml.
- Agarózu rozpúšťajte varom v mikrovlnnej rúre dovtedy, kým sa nevytvorí homogénny roztok s objemom 100 ml.
- Rozpustený gélový roztok nechajte vychladnúť na 60 °C, napríklad vo vyhrievacej skrinke.
- Gél pred odlievaním zafarbite etídiumbromidom (10 mg/ml), 5 μl na 100 ml gélového roztoku. Na maximálne zjednodušenie manipulácie s fľašami s etídiumbromidom používajte naše fľaše s kvapkadlami na etídiumbromid (č. produktu 103.301-10). **Poznámka: Etídiumbromid je karcinogén. Na manipuláciu používajte vhodné osobné ochranné prostriedky.**
- Nalejte 100 ml gélového roztoku do gélového zásobníka v odlievacej komore. Vložte 6 gélových hrebeňov (č. produktu 103.101-21) do otvorov v gélovom zásobníku.
- Gél nechajte ustáť 15 minút.
- Do gélovej nádrže nalejte 750 ml pufru 0,5 × TBE. Ponorte gélový podnos do gélovej škatule a opatrným zdvihnutím vytiahnite 6 gélových hrebeňov.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

Keď používate alternatívne elektroforézne systémy, postupujte podľa pokynov výrobcu. Aby sa tieto systémy dali používať s typizačnými súpravami Olerup SSP® HLA, musia byť schopné odlíšiť produkty PCR veľkosti 50 až 1100 bázičných párov.

**D. Kroky postupu**

1. Z priestorov s indikovanými teplotami vytiahnite: príslušný počet vzoriek DNA, zásobníky s primérom, objem hlavnej zmesi a Taq polymerázy (5 jednotiek/μl) potrebný pre vybrané vzorky DNA/zásobníky s primérom. Rozmrazujte pri izbovej teplote (20 až 25 °C)

Vo všetkých súpravách Olerup SSP® sa používa rovnaká hlavná zmes.

2. Vo vírivom mixéri krátko premiešajte vzorku DNA.
3. Do stojana na zásobník PCR vložte zásobníky s primérom.
4. **Súpravy s nízkym a vysokým rozlíšením**
  - Pred vytvorením alikvotov premiešajte hlavnú zmes vo vírivom mixéri.
  - Pomocou manuálnej jednokanálovej pipety pridajte hlavnú zmes, Taq polymerázu (5 jednotiek/μl) a dH<sub>2</sub>O (s izbovou teplotou) do 0,5 ml alebo 1,5 ml skúmavky. (Príslušné množstvá nájdete v tabuľke 1.)
  - Uzavríte skúmavku a 5 sekúnd miešajte jej obsah vo vírivom mixéri. Pulzným spôsobom otáčajte skúmavku v mikroadstredivke, aby všetka kvapalina stiekla zo stien skúmavky.
  - Pomocou manuálnej jednokanálovej pipety pridajte 8 μl zmesi „hlavná zmes – dH<sub>2</sub>O“ a 2 μl dH<sub>2</sub>O do kalíška na negatívnu kontrolu, t. j. do kalíška s páromi priméru negatívnej kontroly, v zásobníku s primérom.
  - Pomocou manuálnej jednokanálovej pipety pridajte pri izbovej teplote vzorku DNA do zvyšnej zmesi „hlavná zmes – dH<sub>2</sub>O“. (Príslušné množstvá nájdete v tabuľke 1.)
  - Uzavríte skúmavku a 5 sekúnd miešajte jej obsah vo vírivom mixéri. Pulzným spôsobom otáčajte skúmavku v mikroadstredivke, aby všetka kvapalina stiekla zo stien skúmavky.
  - Použitím elektronického jednokanáloveho dávkovača pridajte 10 μl reakčnej zmesi vzorky do každého kalíška okrem kalíška s negatívnou kontrolou v zásobníku s primérom.

**Tabuľka 1: Objemy komponentov potrebných na test pre rôzne počty kalíškov pri použití hlavnej zmesi bez Taq polymerázy.**

Počet kalíškov na test	Objem hlavnej zmesi (μl)	Objem vzorky DNA (μl)	Objem dH <sub>2</sub> O (μl)	Objem Taq polymerázy (μl)	Počet kalíškov na test	Objem hlavnej zmesi (μl)	Objem vzorky DNA (μl)	Objem dH <sub>2</sub> O (μl)	Objem Taq polymerázy (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

Vyššie uvedené odporúčané objemy zahŕňajú objem na kompenzáciu odchýlok pipiet a strát kvapaliny na vnútorných stenách skúmaviek.

### 5. Kombinované súpravy A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ a DQA-DQB-DR Enhanced a HLA-C s vysokým rozlíšením pre súpravu najčastejšie sa vyskytujúcich alel

- Premiešajte hlavnú zmes vo vírivom mixéri.
- Pomocou manuálnej jednokanálovej pipety pridajte pri izbovej teplote 8,3 μl Taq polymerázy (5 jednotiek/μl) a 511,7 μl dH<sub>2</sub>O do poskytnutej 1,5 ml skúmavky obsahujúcej 312 μl hlavnej zmesi.
- Uzavrite skúmavku a 5 sekúnd miešajte jej obsah vo vírivom mixéri. Pulzným spôsobom otáčajte skúmavku v mikroadstredivke, aby všetka kvapalina stiekla zo stien skúmavky.
- Pomocou manuálnej jednokanálovej pipety pridajte 8 μl zmesi „hlavná zmes – Taq polymeráza – dH<sub>2</sub>O“ a 2 μl dH<sub>2</sub>O do kalíška na negatívnu kontrolu č. 96, t. j. do kalíška s páromi priméru negatívnej kontroly.
- Pomocou manuálnej jednokanálovej pipety pridajte pri izbovej teplote 206 μl DNA do zvyšnej zmesi „hlavná zmes – Taq polymeráza – dH<sub>2</sub>O“.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

- Uzavrite skúmavku a 5 sekúnd miešajte jej obsah vo vírivom mixéri. Pulzným spôsobom otáčajte skúmavku v mikroadstredivke, aby všetka kvapalina stiekla zo stien skúmavky.
- Použitím elektronického jednonanálového dávkovača pridajte 10 µl reakčnej zmesi vzorky do každého kalíška okrem kalíška s negatívnou kontrolou č. 96 v zásobníku s primérom.

**Dôležité:**

Nezabudnite aplikovať vzorku nad priméromi (vysušenými na dne každého kalíška zásobníka s primérom), aby nedošlo ku krížovej kontaminácii medzi kalíškami. Dotknite sa vnútornej steny kalíška špičkou pipety, aby vzorka mohla stiecť na dno kalíška. Skontrolujte, či všetky vzorky stiekli na dno každého kalíška. Ak nie, jemne poklepte na zásobník na hornej časti stola tak, aby sa všetky vzorky usadili v spodnej časti kalíška ešte predtým, ako začnete s PCR.

5. Zakryte zásobníky s primérom dodanými adhezívnymi uzávermi PCR. Skontrolujte, či sú všetky reakčné kalíšky úplne zakryté, aby sa zabránilo stratám v dôsledku odparovania počas amplifikácie PCR. Kompresnú podložku *Olerup SSP® Compression Pad* (č. produktu 103.505-06) je možné použiť na hornú časť adhezívnych uzáverov PCR, aby počas tepelného cyklovania nedošlo k stratám spôsobeným odparovaním.
6. Vložte zásobníky s primérom do tepelného cyklovača spolu s vhodným adaptérom zásobníka na skúmavky. Dbajte na to, aby medzi nastavením PCR a tepelným cyklovaním neuplynulo viac ako 5 minút.
7. Zadajte číslo programu *Olerup SSP®*. Zadajte reakčný objem 10 µl.
8. Spustite program PCR. Program trvá približne 1 hodinu a 20 minút.
9. Vytiahnite zásobníky s primérom z tepelného cyklovača. Skontrolujte zásobník PCR a overte, či sa v každom kalíšku PCR nachádza približne rovnaký objem kvapaliny. Vykonajte elektroforézu vzoriek, pozri časť E – Gélová elektroforéza nižšie. Výsledky typizácie interpretujte pomocou **tabuliek interpretácie a špecificity, ktoré sú špecifické pre danú šaržu, alebo pomocou pracovného hárka**, pozri časť Predpokladané hodnoty nižšie.

## E. Gélová elektroforéza

1. Po dokončení reakcie PCR nastavte orientáciu zásobníka s primérom a gélovej škatule. Poradie kalíškov je zľava doprava a zhora nadol.
2. Opatrne odpojte pásik s viečkami bez rozstreknutia produktov PCR.
3. Postupne naplňajte produkty PCR do 2 % agarózového gélu. (Pridávanie gélového plniaceho pufru sa nevyžaduje.) Na aplikáciu gélu sa odporúča použitie 8-kanálovej pipety.
4. Vložte marker veľkosti DNA (stupnica 100 bázických párov, číslo produktu markera veľkosti DNA 103.202-100, alebo marker veľkosti DNA pre krátke gélové cykly 103.203-100) do jedného kalíška v každom riadku.
5. Gélovú škatuľu zakryte vekom gélovej škatule.
6. Vykonajte elektroforézu gélu v pufre 0,5 x TBE bez opätovnej cirkulácie pufru po dobu 15 – 20 minút pri 8 – 10 V/cm.
7. Preneste gélový zásobník do UV transiluminátora.
8. Gél odfotografujte s gélovým zásobníkom alebo bez neho.
9. Fotografiu označte podľa pravidiel laboratória.

## KONTROLA KVALITY

Pokyny na testovanie ASHI HLA uvádzajú, že každé nastavenie PCR musí zahŕňať kalíšok s negatívnou (kontaminačnou) kontrolou. (Revidované štandardy pre akreditované laboratóriá, Americká spoločnosť pre histokompatibilitu a imunogenetiku, záverečné revidované normy schválené CMS: 16. februára 2021). Kalíšok s negatívnou kontrolou tvorí súčasť všetkých súprav okrem súprav HLA-B\*27 – jednotková dávka a súprav HLA-B\*27 s jedným kalíškom.

Pozri časť Interpretácia gélu na strane 14.

## VÝSLEDKY

Validačné hárky bunkových radov a analytický certifikát sú dostupné online na adrese [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

## OBMEDZENIA POSTUPU

1. Proces PCR-SSP vyžaduje striktné kontrolované testovacie podmienky, aby sa zaistila primeraná diskriminačná amplifikácia. Je nevyhnutné striktné postupovať podľa postupu uvádzanom v návode na použitie.
2. Extrahovaná vzorka DNA je šablónou pre špecifický proces amplifikácie PCR. Purifikovaná DNA by mala mať pomer  $A_{260/280}$  medzi 1,6 a 2,0, aby sa dosiahla optimálna vizualizácia pásma elektroforézou.
3. Všetky prístroje, napríklad tepelný cyklovač a pipetovacie zariadenia, musia byť kalibrované podľa odporúčaní výrobcu.
4. Informácie špecifické pre jednotlivé šarže sú uvedené v produktovom letáku: Informácie špecifické pre šarže a pracovný hárok špecifický pre šaržu.
5. Na základe vykonaného testovania boli nasledujúce látky hodnotené troma (3) metódami extrakcie pri stanovených koncentráciách a zistilo sa, že nenarúšajú funkčnosť/účinnosť testu.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

Metóda extrakcie	Rušivá látka	Koncentrácia rušenia*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubín	200 mg/l
	Hemoglobín	200 g/l
	Triglycerid	30 g/l
	Bielkovina	110 g/l
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubín	200 mg/l
	Hemoglobín	200 g/l
	Triglycerid	18,2 g/l
	Bielkovina	77 – 96 g/l
Metóda Gentra PureGene	Bilirubín	200 mg/l
	Hemoglobín	200 g/l
	Triglycerid	18,2 g/l
	Bielkovina	119 – 146 g/l

6. Dosky PCR sú fyzicky kompatibilné s väčšinou tepelných cyklovačov dostupných na trhu. Pozri tabuľku kompatibility tepelných cyklovačov s plastmi nižšie.

*Poznámka: Táto tabuľka má iba orientačný charakter. Zoznam schválených cyklovačov nájdete v časti Požiadavky na prístroje – prístroj.*

<b>Tabuľka kompatibility</b>	
Výrobca	Tepelný cyklovač
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-well
	ProFlex 2x96-well
	Veriti 0.2ml 96-well Block
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
	TProfessional
Bio-Rad	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
Eppendorf	PTC-100 with 96-well block
	Mastercycler Gradient
	Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

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. Účinnosť tejto súpravy používajúcej hlavnú zmes bez Taq polymerázy bola overená iba pomocou produktu Roche Taq DNA Polymerase, GMP Grade (katalógové číslo 03 734 927 001 alebo 03 734 935 001). Účinnosť analýzy použitím akýchkoľvek iných enzýmov nie je známa a musí ju stanoviť a overiť používateľ.










**OČAKÁVANÉ HODNOTY****A. Analýza údajov**

Starostlivo preskúmajte gélovú fotografiu a stanovte pozitívne pruhy.

1. Rýchlejšie migrujúce kratšie pásmo bude vidieť v gélovej dráhe vtedy, ak boli amplifikované špecifické alely HLA. To indikuje pozitívny výsledok testu.
  - a. Zaznamenajte prítomnosť a neprítomnosť špecifických produktov PCR.
  - b. Pri interpretácii výsledkov gélu je užitočné monitorovať relatívne dĺžky špecifických produktov PCR uvedené v produktových letákoch špecifických pre šaržu. Niekoľko dráh má dve alebo viac možných dĺžok špecifických produktov PCR. Tieto kalíšky obsahujú viacero párov primérov generujúcich produkty PCR rôznych veľkostí v závislosti od alel HLA DNA vzorky.
  - c. Porovnajzte vzor gélových dráh so špecifickými produktmi PCR s informáciami v tabuľkách interpretácie a špecificity špecifických pre danú šaržu, aby ste získali typizáciu HLA DNA vzorky.
2. Interné pozitívne kontrolné pásmo, ktoré pomalšie migruje a je dlhšie, by malo byť viditeľné vo všetkých gélových dráhach okrem gélovej dráhy negatívnej kontroly, ako kontrola úspešnej amplifikácie. Interné pozitívne kontrolné pásmo môže byť slabé alebo v pozitívnych gélových dráhach chýba.
  - a. Zaznamenajte prítomnosť a relatívne dĺžky interných pozitívnych kontrolných pásiem. Kontrolné pásma odlišných veľkostí pomôžu pri správnej orientácii typizácie, ako aj pri identifikácii súpravy.
  - b. Neprítomnosť interného pozitívneho kontrolného pásma bez špecifického produktu PCR indikuje neúspešnú reakciu PCR.
    - i. Ak je možné určiť alely HLA za prítomnosti neúspešnej reakcie PCR a neúspešná reakcia PCR nezmení priradenie alel, test nie je potrebné opakovať.
    - ii. Ak by však neúspešné reakcie PCR zmenili priradenie alel HLA, typizáciu je potrebné opakovať.
3. Prítomnosť špecifického produktu PCR alebo interného pozitívneho kontrolného pásma v negatívnych kontrolných dráhach indikuje kontamináciu produktmi PCR, čo znamená, že všetky výsledky testu sú neplatné. Oligoméry priméru veľkosťou od 40 do 60 bázických párov môžu byť pozorované v negatívnych kontrolných dráhach. To však nepredstavuje kontamináciu.



## B. Interpretácia gélu

	<b>Pozitívna reakcia</b>	<b>Negatívna reakcia</b>	<b>Neúspešná reakcia PCR</b>
Kalíšok			
Interné pozitívne kontrolné pásmo			
Špecifické pásmo			
Pásmo priméru			

1. Marker veľkosti DNA (stupnica 100 bázických párov, číslo produktu markera veľkosti DNA 103.202-100 alebo marker veľkosti DNA pre krátke gélové cykly 103.203-100) by mal byť spracovaný v jednom kalíšku na jeden riadok gélu alebo podľa akreditačných pokynov miestneho laboratória.
2. Pásma dlhšie ako interné pozitívne kontrolné pásmo je možné získať, tieto pásma by sa však v rámci interpretácie výsledkov typizácie nemali zohľadňovať.
3. Nepoužitý priméry vytvoria kratšie difúzne pásmo s hodnotou 50 bázických párov.
4. Je možné, že spozorujete artefakty oligoméru priméru. Sú dlhšie ako pásmo priméru, ale kratšie než špecifické pásma.

## ŠPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

### Kontrola kvality šarže súpravy

Každý roztok priméru sa testuje v porovnaní s panelom 48 vzoriek DNA z dobre charakterizovaných bunkových radov IHWC, pozri validačné hárky bunkového radu špecifické pre šaržu v produktovom letáku, časť Informácie špecifické pre šaržu.

### Porovnanie metód

Uskutočnila sa štúdia zameraná na porovnanie typizačných súprav Olerup SSP® HLA s Taq polymerázou a bez nej, ktorá tvorí súčasť hlavnej zmesi PCR. Účelom štúdie bolo preukázať, že manuálne pridávanie neovplyvňuje výsledky analýzy a že výsledky odlišných šarží Taq polymerázy sú rovnaké. Štúdia zahŕňala typizáciu HLA-A, -B (trieda I) a -DRB (trieda II) s nízkym rozlíšením 15 vzoriek DNA so známym genotypom HLA získaným zo zbierky International Histokompatibility Workshop Collection. Vzorky boli pripravené a kódované pracovníkmi inými než sú pracovníci,

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

ktorí vykonávajú testovanie; testovací personál nepoznal typy HLA vzoriek. Každá vzorka bola testovaná paralelne s kombinovaným zásobníkom Olerup SSP® HLA-A-B-DR s hlavnou zmesou PCR bez Taq polymerázy („test“) a kombinovaným zásobníkom Olerup SSP® HLA-A-B-DR s hlavnou zmesou PCR s obsahom Taq polymerázy („kontrola“) v súlade s pokynmi na príbalovom letáku ku každej analýze. Všetky testy sa uskutočnili v laboratóriu CareDx AB v Štokholme vo Švédsku s použitím jednej šarže súpravy a dvoch šarží Taq polymerázy. V tejto štúdii bola použitá DNA polymeráza Roche Taq triedy GMP. Testovanie každej vzorky pozostávalo z typizácie s nízkym rozlíšením použitím kombinovaného zásobníka Olerup SSP® HLA-A-B-DR, pričom sa použili nasledujúce produkty: 1) Hlavná zmes PCR vrátane Taq polymerázy (analýza podľa úradu FDA) (kontrolná analýza), 2) hlavná zmes PCR plus Roche Taq DNA polymeráza, produkt triedy GMP, 5 U/μl, šarža č. 1 (šarža testu č. 1) a 3) hlavná zmes PCR plus Roche Taq DNA polymeráza, produkt triedy GMP, 5 U/μl, šarža č. 2 (šarža testu č. 2). Po dokončení PCR sa uskutočnila detekcia pomocou gélovej elektroforézy. Súhrn výsledkov je uvedený nižšie.

Porovnanie	Zhoda			% zhody (95 % interval spoľahlivosti <sup>a</sup> )
	Výsledky typizácie triedy I (počet zhôd/celkom)		Výsledky typizácie triedy II (počet zhôd/celkom)	
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Šarža testu č. 1/kontrolná šarža	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 – 100,0 %)
Šarža testu č. 1/konsenzus <sup>b</sup>	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 – 100,0 %)
Šarža testu č. 2/kontrolná šarža	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 – 100,0 %)
Šarža testu č. 2/konsenzus	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 – 100,0 %)
Šarža testu č. 1/šarža testu č. 2	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 – 100,0 %)

<sup>a</sup> Metóda skóre

<sup>b</sup>Konsenzuálny výsledok z medzinárodnej zbierky International Histocompatibility Workshop Collection

### POUŽITÁ LITERATÚRA

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. Aktuálne alely HLA nájdete na adrese [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

## RIEŠENIE PROBLÉMOV

Problém	Príčina	Nápravný krok
<b>Žiadna amplifikácia (amplifikácia fragmentov internej kontroly ani špecifické amplifikácie).</b>	Príliš nízke množstvo DNA.	Zmerajte koncentráciu DNA a zistite, či je pridané množstvo správne. Kontaminácia RNA môže spôsobiť spektrofotometrické nadhodnotenie koncentrácie DNA. Opatrne opakujte extrakciu DNA s čerstvo pripravenými roztokmi. Odporúčame použiť automatizovanú extrakciu DNA pomocou systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA obsahuje inhibítory PCR, napr. bielkoviny, etanol (z krokov zrážania), zvyšné matrice z produktov purifikácie pevnej fázy DNA.	Odmerajte kvalitu DNA. Podľa UV spektrofotometrie odporúčame pomer A260/A280 v hodnote 1,6 – 2,0. Postupujte presne podľa protokolu extrakcie DNA od dodávateľa. Znova extrahujte DNA. Odporúčame použiť automatizovanú extrakciu DNA pomocou systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA bola extrahovaná z heparinizovanej krvi.	Použite neheparinizovanú krv alebo použite extrakčné protokoly DNA pre heparinizovanú krv.
	DNA sa rozpustí v pufrí obsahujúcom EDTA.	Opakujte extrakciu DNA a rozpustite DNA v dH <sub>2</sub> O.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravny krok</b>
<b>Pokračovanie:</b> <b>Žiadna amplifikácia</b> <b>(amplifikácia fragmentov</b> <b>internej kontroly ani</b> <b>špecifické amplifikácie).</b>	Náhodné preniknutie bielidla do testu.	Preskúmajte oblasti, do ktorých mohlo bielidlo preniknúť.
	Súpravy nie sú skladované v prostredí s primeranou teplotou.	Súpravy skladujte pri teplote -20 °C.
	Tepelný cyklovač nefunguje správnym spôsobom.	Kalibrujte tepelný cyklovač a skontrolujte program PCR. Tepelný cyklovač používaný na bežnú typizáciu PCR-SSP by sa mal kalibrovať každých 6 – 12 mesiacov.
	Nedostatočný kontakt medzi ohrievacím blokom tepelného cyklovača a typizačným zásobníkom SSP.	Použite správny zásobník/držiak na 0,2 ml tenkostenné reakčné kalíšky, prečítajte si príručku k tepelnému cyklovaču.
<b>Náhodné zlyhanie amplifikácie (výpadky).</b>	Uzávery PCR/uzávery skúmaviek PCR, ktoré nie sú riadne uzavreté, vedú k odparovaniu a následnému zlyhaniu amplifikácie.	Dbajte na to, aby boli uzávery PCR/všetky uzávery riadne uzavreté. Kompresnú podložku Olerup SSP® Compression Pad (č. produktu 103.505-06) je možné použiť na hornú časť adhezívnych uzáverov PCR, aby počas tepelného cyklovania nedochádzalo k odparovaniu.
	Chyby pri plnení gélu.	Overte, či bol naplnený správny počet kalíškov a či každý kalíšok obsahuje približne rovnaký objem zmesi PCR.
	Použitie nekalibrovaných pipiet.	Kalibrujte všetky pipety bežným spôsobom podľa pokynov dodávateľa.
	Chyby pipetovania.	Pipetovanie vykonávajte opatrnejšie.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravný krok</b>
<b>Pokračovanie:</b> <b>Náhodné zlyhanie amplifikácie (výpadky).</b>	Hlavná zmes a vzorka DNA neboli pred použitím správne premiešané.	Pred použitím tieto produkty krátko premiešajte vo vírivom mixéri. Premiešanie pomocou vírivého mixéra sa odporúča vykonať po každom riadku.
	Do kalíškov bol pridaný nerovnomerný objem zmesi DNA – hlavná zmes.	Pipetovanie vykonávajte opatrnejšie.
<b>Slabé fragmenty internej kontroly.</b>	Nečistá DNA.	Odmerajte kvalitu DNA. Podľa UV spektrofotometrie by pomer A260/A280 mal dosahovať hodnotu 1,6 – 2,0. Kontaminácia RNA môže spôsobiť spektrofotometrické nadhodnotenie koncentrácie DNA. DNA nižšej kvality spôsobuje výskyt šmúh v gélových dráhach. Opatrne opakujte extrakciu DNA s čerstvo pripravenými roztokmi. Odporúčame použiť automatizovanú extrakciu DNA pomocou systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Príliš nízke množstvo DNA.	Odmerajte koncentráciu DNA a upravte ju na 30 ng/μl alebo na 15 ng/μl v prípade DNA extrahovanej systémom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Kontaminácia RNA môže spôsobiť spektrofotometrické nadhodnotenie koncentrácie DNA.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravný krok</b>
<b>Pokračovanie:</b> <b>Slabé fragmenty internej kontroly.</b>		DNA nižšej kvality spôsobuje výskyt šmúh v gélových dráhach. Opatrne opakujte extrakciu DNA s čerstvo pripravenými roztokmi. Odporúčame použiť automatizovanú extrakciu DNA pomocou systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Príliš vysoká teplota žihania, tepelný cyklovač nie je kalibrovaný.	Kalibrujte tepelný cyklovač a skontrolujte program PCR. Tepelný cyklovač používaný na bežnú typizáciu PCR-SSP by sa mal kalibrovať každých 6 – 12 mesiacov.
	Hlavná zmes PCR bola uchovávaná pri teplote +4 °C dlhšie ako 2 týždne.	Hlavnú zmes PCR uchovávajte v správnych podmienkach.
<b>Nešpecifická amplifikácia (stupnice alebo šmuhy).</b>	Použitie nadmerného objemu vzorky DNA.	Odmerajte koncentráciu DNA a upravte ju na 30 ng/μl alebo na 15 ng/μl v prípade DNA extrahovanej systémom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Niektoré roztoky priméru majú vyššiu tendenciu viesť k nešpecifickej amplifikácii, pozri poznámky pod čiarou v každej tabuľke špecificity špecifickej pre danú šaržu.
	Nečistá DNA.	Keď interpretujete získané výsledky, žiadne fragmenty väčšie než fragment internej kontroly by sa nemali zohľadňovať. Skontrolujte kvalitu DNA. Opakujte extrakciu DNA.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravny krok</b>
<b>Pokračovanie:</b> <b>Nešpecifická amplifikácia</b> <b>(stupnice alebo šmuhy).</b>		Odporúčame použiť automatizovanú extrakciu DNA pomocou systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Niektoré roztoky priméru majú vyššiu tendenciu viesť k nešpecifickej amplifikácii, pozri poznámky pod čiarou v každej tabuľke špecificity špecifickej pre danú šaržu.
<b>Stále slabšie amplifikačné signály v čase.</b>	Roztok na farbenie etídiumbromidového agarózového gélu je starý.	Pripravte čerstvý roztok etídiumbromidu na dosiahnutie lepšieho zafarbenia agarózového gélu a lepšieho signálu. Ak je zafarbenie agarózového gélu normálne, jednoducho môžete spozorovať zhľuky priméru.
	Niektorá z UV lúčov je pokazená.	Skontrolujte zariadenia na generovanie UV svetla. Ak je UV svetlo v poriadku, jednoducho môžete spozorovať zhľuky priméru.
	Použila sa vzorka DNA s príliš malým objemom.	Odmerajte koncentráciu DNA a upravte ju na 30 ng/μl alebo na 15 ng/μl v prípade DNA extrahovanej systémom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Príliš vysoká teplota žihania, tepelný cyklovač nie je kalibrovaný.	Kalibrujte tepelný cyklovač a skontrolujte program PCR. Tepelný cyklovač používaný na bežnú typizáciu PCR-SSP by sa mal kalibrovat' každých 6 – 12 mesiacov.



**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravny krok</b>
<b>Neštandardné vzory amplifikácie.</b>	Použili ste nesprávnu interpretačnú tabuľku/pracovný hárok špecifický pre danú šaržu.	Skontrolujte číslo šarže použitého produktu a použitú interpretačnú tabuľku/pracovný hárok.
	Nesprávne poradie pri plnení gélu.	Skontrolujte zarovnanie zmesí a gélových dráh.
	Amplifikačný vzor obsahuje falošne pozitívny výsledok.	Pozri nižšie.
	Amplifikačný vzor obsahuje falošne negatívny výsledok.	Pozri nižšie.
<b>Falošne pozitívne amplifikácie.</b>	Kontaminácia DNA.	Používajte rukavice, špičky pipiet obsahujúce bariéry (filtračné zátky) a osobitné miestnosti na manipuláciu pred PCR a manipuláciu po PCR. Dodržiavajte striktné presnú manipuláciu so všetkými vzorkami v rámci všetkých krokov. Skontrolujte kontamináciu pomocou súpravy Olerup SSP® Wipe Test.
	Nečistá DNA.	Odmerajte kvalitu DNA. Postupujte presne podľa protokolu extrakcie DNA od dodávateľa. Vyskúšajte použiť iné systémy extrakcie DNA. Znova extrahujte DNA. Odporúčame použiť automatizovanú extrakciu DNA pomocou systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Použitie nadmerného objemu vzorky DNA.	Odmerajte koncentráciu DNA a upravte ju na 30 ng/μl alebo na 15 ng/μl v prípade DNA extrahovanej systémom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Príliš nízka teplota žihania.	Kalibrujte tepelný cyklovač a skontrolujte

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravny krok</b>
<b>Pokračovanie:</b> <b>Falošne pozitívne amplifikácie.</b>		program PCR. Tepelný cyklovač používaný na bežnú typizáciu PCR-SSP by sa mal kalibrovať každých 6 – 12 mesiacov.
	Výrazné oneskorenie medzi nastavením PCR a začiatkom tepelného cyklu.	Maximálne oneskorenie pred začatím tepelného cyklovania je 5 minút.
	Oneskorenie medzi umiestnením typizačných zásobníkov do tepelného cyklovača a začiatkom cyklu.	Použite vopred nahriaty tepelný cyklovač.
	Použitie nadbytočného množstva etídiumbromidu.	Použite odporúčané množstvo etídiumbromidu.
	Nesprávna interpretácia artefaktu ako špecifického pásma.	Prezrite si interpretačnú tabuľku/pracovný hárok špecifický pre šaržu, ako aj tabuľku špecificity, v ktorých nájdete informácie o správnej veľkosti pásma (prečítajte si aj poznámky pod čiarou).
	Amplifikačný vzor obsahuje falošne pozitívny výsledok.	Skontrolujte, či sú všetky špecifické amplifikácie správne z hľadiska veľkosti alebo či artefakt (prenos, dimér priméru) nebol nesprávne interpretovaný ako amplifikácia.
	Nesprávne poradie pri plnení gélu.	Skontrolujte zarovnanie zmesí a gélových dráh.
<b>Falošne negatívne amplifikácie.</b>	Tepelný cyklovač nie je správne kalibrovaný.	Kalibrujte tepelný cyklovač a skontrolujte program PCR. Tepelný cyklovač používaný na bežnú typizáciu PCR-SSP by sa mal kalibrovať každých 6 – 12 mesiacov. Ak opakovaná kalibrácia nepovedie k náprave,

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravny krok</b>
<b>Pokračovanie:</b> <b>Falošne negatívne</b> <b>amplifikácie.</b>		opakujte typizáciu testu s referenčnou vzorkou rovnakej špecificity. Ak sa potvrdí negatívny výsledok, obráťte sa na oddelenie podpory pre zákazníkov.
	Nesprávne poradie pri plnení gélu.	Skontrolujte zarovnanie zmesí a gélových dráh.
<b>Všeobecné problémy s</b> <b>gélom (difúzne gély</b> <b>alebo rozmazané pruhy).</b>	Vzorka DNA nedostatočnej kvality.	V gélových dráhach sa zobrazuje ako šmuha. Izolujte DNA z čerstvej vzorky.
	Výrazné pruhovanie v náhodných kalíškoch.	Nerovnomerná suspenzia DNA. Pred vytváraním alikvotov overte, či je vzorka DNA rozpustená. Zriedenú vzorku DNA premiešajte vo vírivom mixéri.
	Produkt PCR vyplával z kalíška.	Špičky pipety opatrne zarovnajte s gélovými kalíškami a dávkovanie vykonávajte pomaly.
	Pufer na elektroforézu môže byť príliš horúci.	Pripravte si nový pufer TBE. Kroky vykonávajte s nižším napätím.
	Použili ste nesprávne percento agarózového gélu.	Overte, či sa používa odporúčaný 2 % agarózový gél.
	Agaróza nie je úplne rozpustená.	Krátkym varením roztopte agarózu.
	Nesprávna koncentrácia TBE.	Použite odporúčanú koncentráciu 0,5 x TBE.
	Príliš skoré použitie gélov po odliatí.	Gély sú pripravené na použitie najskôr 15 minút po odliatí.
	Gély sú príliš staré.	Gély neodlievajte príliš vopred.
	Použitý gélový hrebeň má príliš široké štrbiny.	Použite tenké hrebene (4 x 1 mm).
	Gélový zásobník nie je priehľadný pre UV svetlo.	Pred zobrazením odstráňte gél z gélového zásobníka.

**Návod na použitie**  
**Typizačné súpravy Olerup SSP® HLA bez Taq polymerázy**

<b>Problém</b>	<b>Príčina</b>	<b>Nápravný krok</b>
<b>Pokračovanie:</b> <b>Všeobecné problémy s gélom (difúzne gély alebo rozmazané pruhy).</b>	Obraz gélu je príliš svetlý.	Nadmerné použitie etídiumbromidu. Skontrolujte nastavenia fotoaparátu.
	Obraz gélu je príliš tmavý.	Použite odporúčané množstvo etídiumbromidu. Skontrolujte nastavenia fotoaparátu.
<b>Všeobecné problémy s falošne negatívnou amplifikáciou alebo problémami závislými od jednotlivých cyklov podobného charakteru</b>	Príliš vysoké nastavenie miery tepelnej strmosti.	Súpravy Olerup SSP sú overované pomocou cyklovača GeneAmp 9700 nastaveného do režimu 9600 a ProFlex s mierou tepelnej strmosti 3 °C/s. Vyššie miery tepelnej strmosti než ekvivalentné s uvedenou hodnotou môžu ovplyvňovať výsledky typizácie.

## OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTE/PRODUKTE

*Olerup SSP*<sup>®</sup> je registrovaná ochranná známka spoločnosti *CareDx AB*.  
*Qiagen*<sup>™</sup> je ochranná známka spoločnosti *QIAGEN*.

**OZNÁMENIE PRE KUPUJÚCEHO:** Súpravy *Olerup SSP*<sup>®</sup> bez Taq polymerázy – tento produkt je optimalizovaný na použitie s polymerázou Roche Taq triedy GMP (katalógové číslo 03 734 927 001 alebo 03 734 935 001) v procese polymerázovej reťazovej reakcie („PCR“), na ktorú sa môžu vzťahovať patenty spoločností Roche Molecular Systems, Inc. a F. Hoffmann-La Roche Ltd. („Roche“). Laboratórium je zodpovedné za kontakt so spoločnosťou Roche Molecular Systems, Inc. na zistenie, či sa na základe týchto patentov vyžaduje licencia.

## ZÁRUKA

Spoločnosť *CareDx AB* poskytuje pôvodnému kupujúcemu záruku na svoje produkty a na to, že v podmienkach bežného používania nebudú obsahovať chyby materiálu a spracovania. Jedinou povinnosťou spoločnosti *CareDx AB* rámci tejto záruky je bezplatná výmena akéhokoľvek produktu, ktorý nespĺňa normy funkčnosti uvedené v hárku so špecifikáciami produktu.

Táto záruka sa vzťahuje iba na produkty, s ktorými sa manipulovalo a ktoré boli skladované v súlade s odporúčaniami spoločnosti *CareDx AB* a nevzťahuje sa na produkty, ktoré boli zmenené, nesprávne používané alebo zneužívané.

Všetky nároky v rámci tejto záruky musia byť písomne adresované spoločnosti *CareDx AB* a súčasťou takéhoto písomného oznámenia musí byť kópia faktúry kupujúceho. Táto záruka nahrádza všetky ostatné záruky, vyslovené alebo implicitné vrátane záruk predajnosti a vhodnosti na konkrétny účel. Spoločnosť *CareDx AB* nebude v žiadnom prípade zodpovedná za náhodné alebo následné škody.

Tento produkt nesmie byť zmenený, prebalený ani znova predávaný v akejkoľvek podobe bez písomného súhlasu spoločnosti *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Štokholm, Švédsko.

So všetkými vzorkami manipulujte ako so vzorkami schopnými prenášať infekčné ochorenie. Všetky práce by sa mali vykonávať v rukaviciach a použitím vhodných ochranných prostriedkov.

## ZÁRUKA

Spoločnosť *CareDx AB* poskytuje záruku na to, že priméry v typizačných zásobníkoch *Olerup SSP*<sup>®</sup> vykazujú špecifitu uvádzanú v pracovnom hárku a v tabuľkách špecifity a interpretácie špecifických pre šaržu v príbalovom letáku.

**ADRESY:**

**Výrobca:**

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Štokholm, Švédsko

**Tel.:** +46 8 508 939 00

**Fax:** +46 8 717 88 18

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

**Webová stránka:** www.caredx.com

**Distribútor:**

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Štokholm, Švédsko

**Tel.:** +46 8 508 939 00

**Fax:** +46 8 717 88 18

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

**Webová stránka:** 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

**Webová stránka:** www.caredx.com

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

**Tel.:** +61 8 9336 4212

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

**Webová stránka:** www.caredx.com

**Splnomocnený zástupca:**

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Informácie o distribútoroch spoločnosti CareDx na celom svete získate od spoločnosti CareDx AB.

1596-LBL v02 predstavuje preklad anglickej predlohy 0193-LBL v07 Typizačné súpravy *Olerup SSP*<sup>®</sup> HLA bez Taq polymerázy.

Zmeny v revízii 0193-LBL v07 v porovnaní s verziou 0193-LBL v06:

1. Pridanie švajčiarskeho splnomocneného zástupcu.
2. Pridanie GelRed do sekcie B. Požadované materiály, ktoré netvoria súčasť dodávky.