



# Navodila za uporabo

## Olerup SSP<sup>®</sup> brez Taq polimeraze

© 2023 CareDx, Inc. Vse storitvene znamke ali blagovne znamke so v lasti ali pod licenco družbe CareDx, Inc. ali njenih podružnic. Vse pravice pridržane.

Kompleti za tipiziranje 1595-LBL v02 Olerup SSP<sup>®</sup> HLA brez Taq polimeraze

Za *In Vitro* diagnostično uporabo

Revizija septembra 2023



Stran 1 od 28

## Za *in vitro* diagnostično uporabo

### PREDVIDENA UPORABA

Kompleti za tipizacijo Olerup SSP® HLA so kvalitativni *in vitro* diagnostični kompleti za tipizacijo DNK alelov HLA razreda I in HLA razreda II. Izdelke uporabljajo usposobljeni strokovnjaki v zdravstvenih okoljih za namen določanja fenotipa HLA. Izvorni testiran material je DNK.

### POVZETEK IN POJASNILA

Humane levkocitne antigene (HLA) so včasih določali s testom limfocitotoksičnosti. Vendar pa je bil ta test zaradi stopnje napak in pomanjkanja ločljivosti na ravni alelov nadomeščen s tehnikami tipizacije DNK na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR). V večini tehnik, ki temeljijo na PCR, se postopek PCR uporablja le kot korak amplifikacije potrebne ciljne DNK, potreben pa je tudi korak po amplifikaciji za razlikovanje med različnimi aleli. Nasprotno pa pri metodologiji PCR-SSP (sekvenčno-specifični začetni oligonukleotid – SSP) diskriminacija med različnimi aleli poteka med postopkom PCR. To skrajša in poenostavi korak po amplifikaciji na preprost korak zaznavanja z gelsko elektroforezo. Rezultati testov SSP so pozitivni ali negativni, kar odpravi potrebo po zapleteni interpretaciji rezultatov. Poleg tega je ločljivost tipiziranja PCR-SSP višja kot pri drugih tehnikah tipiziranja, ki temeljijo na PCR, saj vsak par začetnih oligonukleotidov definira dva motiva zaporedja, ki se nahajata v *cis*, tj. na istem kromosomu. Poleg tega se je zaradi sintetične narave reagentov SSP izboljšala stabilnost in zmanjšala variacija od serije do serije.

### NAČELO POSTOPKA

Metodologija PCR-SSP temelji na načelu, da se popolnoma ali skoraj popolnoma ujemajoči se začetni oligonukleotidi brez 3' končnih neujemanj učinkoviteje uporabljajo v reakciji PCR kot neusklajeni začetni oligonukleotidi s termo stabilnimi DNK polimerazami brez lastnosti preverjanja. Pari začetnih oligonukleotidov so zasnovani tako, da se ujemajo z enojnimi aleli ali skupinami alelov, odvisno od stopnje zahtevane ločljivosti tipiziranja. S strogo nadzorovanimi PCR pogoji, ujemajoči ali skoraj popolnoma ujemajoči pari začetnih oligonukleotidov omogočajo, da pride do amplifikacije, to je pozitiven rezultat, medtem ko neusklajeni pari začetnih oligonukleotidov ne omogočajo, da bi prišlo do amplifikacije, to je negativen rezultat.

Po postopku PCR se amplificirani fragmenti DNA ločijo po velikosti, npr. z elektroforezo v agaroznem gelu, vizualizirani z barvanjem z etidijevim bromidom in izpostavljenostjo ultravijolični svetlobi, dokumentirani s fotografiranjem in interpretirani. Interpretacija rezultatov PCR-SSP temelji na prisotnosti ali odsotnosti specifičnih produktov PCR. Relativne velikosti specifičnih produktov PCR so lahko koristne pri razlagi rezultatov. Metodologijo PCR-SSP za HLA je prvotno opisal O. Olerup leta 1991 in 1992<sup>1,2</sup>.

Ker lahko na postopek PCR negativno vplivajo razni dejavniki (npr. napake pri pipetiranju, prenizka koncentracija DNK, slaba kakovost DNK, prisotnost zaviralcev PCR, netočnost cikličnega termostata), je v vsako reakcijo PCR vključen notranji par začetnih oligonukleotidov pozitivne kontrole<sup>2</sup>. Par začetnih oligonukleotidov notranje pozitivne kontrole se ujema z ohranjenimi regijami gena za človeški rastni hormon, ki je

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

prisoten v vseh vzorcih človeške DNK. V prisotnosti specifičnega produkta PCR alela(-ov) HLA je produkt pasu notranje pozitivne kontrole lahko šibek ali ga sploh ni. Amplikoni, ki jih ustvarijo specifični pari začetnih oligonukleotidov HLA, so krajši od ampliconov para začetnih oligonukleotidov notranje pozitivne kontrole, vendar večji od nevgrajenih začetnih oligonukleotidov (glejte Pričakovane vrednosti).

## REAGENTI

### A. Identifikacija

Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® vsebujejo posušene, vnaprej optimizirane temeljne začetne oligonukleotide, specifične za zaporedje, za PCR ojačanje alelov HLA in gena človeškega ravnega hormona, mešanico reagentov PCR, brez Taq polimeraze (»mešanica reagentov«), in lepilne tesnilne folije PCR.

Raztopine začetnih oligonukleotidov so predhodno alikvotirane in posušene v 0,2 ml vdolbinah izrezanih pladnjev za PCR s tankimi stenami. Vsaka vdolbina na pladnju vsebuje posušeno raztopino začetnih oligonukleotidov, ki je sestavljena iz specifične mešanice začetnih oligonukleotidov, tj. začetnih oligonukleotidov HLA, specifičnih za alele in skupino, ter par začetnih oligonukleotidov notranje pozitivne kontrole, ki se ujema z nealelnimi zaporedji, in so pripravljene za dodajanje vzorca DNK, mešanice reagentov in H<sub>2</sub>O.

Temeljni začetni oligonukleotidi so zasnovani za optimalno amplifikacijo PCR pri uporabi mešanice reagentov in priporočenega cikličnega programa DNK (glejte Programiranje cikličnega termostata).

Tabele specifičnosti in interpretacijali delovni list za določene alele HLA, ojačane z vsako mešanico temeljnih začetnih oligonukleotidov, in ki so specifične za vsako serijo, je mogoče pridobiti na spletnem mestu [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### B. Opozorila in previdnostni ukrepi

1. Za *in vitro* diagnostično uporabo.
2. Tega izdelka se ne sme uporabljati kot edine podlage za klinično odločitev.
3. **Opozorilo o biološki nevarnosti:** Vse krvne pripravke je treba obravnavati kot potencialno nalezljive. Nobena znana(-e) preskusna(-e) metoda(-e) ne more zagotoviti, da proizvodi, pridobljeni iz človeške krvi, ne prenašajo povzročiteljev okužb.
4. **Opozorilo o biološki nevarnosti:** Etidijev bromid, ki se uporablja za barvanje DNK pri elektroforezi v agaroznem gelu, je rakotvoren. Uporabljajte ustrezno osebno zaščitno opremo.
5. **Pozor:** Nosite zaščito za oči, ki ščiti pred UV žarki, in ne glejte neposredno v vir UV svetlobe, ko gledate ali fotografirate gele.
6. Pipet in druge opreme, ki se uporabljajo za manipulacije **po** metodi PCR, se **ne** sme uporabljati za manipulacije **pred** uporabo metode PCR.
7. Za podrobnejše informacije glejte Varnostni list ([www.caredx.com](http://www.caredx.com)).

### C. Navodila za uporabo

Glejte Navodila za uporabo.

**D. Navodila za shranjevanje**

Sestavne dele kompleta shranjujte v temnem prostoru in pri temperaturah, navedenih na etiketah embalaže.

Uporabite pred iztekom roka uporabnosti, ki je natisnjen na nalepkah na embalaži.

**E: Čiščenje ali obdelava, potrebna za uporabo**

Glejte Navodila za uporabo.

**F. Indikacije nestabilnosti**

1. Ne uporabljajte pladnejv začetnih oligonukleotidov z razpokami v vdolbinah ali poškodbami zgornjega roba vdolbin, saj lahko to povzroči izhlapevanje med amplifikacijo PCR. Ne uporabljajte trakov pokrova PCR z razpokami, saj lahko to povzroči izhlapevanje med amplifikacijo PCR.
2. Peleti v vdolbinicah morajo biti rdeči. Rumeno obarvani peleti lahko nakazujejo razgradnjo.
3. Mešanica reagentov mora biti rdeča do vijolična. Rumeno do oranžno razbarvanje lahko nakazuje razgradnjo.

**ZAHTEVE ZA INSTRUMENTE****A. Instrument**

Uporabiti morate ciklični termostat z naslednjimi minimalnimi specifikacijami:

- ogrevan pokrov s temperaturo 104 °C za delovanje brez prisotnosti olja
  - blok za vzorce (aluminij, srebro ali pozlačeno srebro) za uporabo bodisi s PCR ploščo s 96 vdolbinami ali 0,2 ml tankostenskiimi reakcijskimi epruvetami
  - Kompleti *Olerup SSP* so potrjeni na naslednjih cikličnih termostatih. Priporočene stopnje segrevanja in ohlajanja:
    - GeneAmp 9700: Ciklični termostat GeneAmp 9700 nastavljen na način 9600. To ustreza **stopnji segrevanja in ohlajanja** za 1,6 °C/s navzgor in 0,8 °C/s navzdol.
    - Blok z vdolbinami ProFlex 1x96: Ciklični termostat ProFlex PCR s hitrostjo segrevanja in ohlajanja bloka 3,0 °C/s (vsak korak 3,0 °C/s). **Stopnja segrevanja in ohlajanja bloka** 3,0 °C/s ustreza stopnji segrevanja in ohlajanja vzorca 1,52 °C/s navzgor in 1,36 °C/s navzdol.
    - Blok z vdolbinami ProFlex 2x96: Ciklični termostat ProFlex PCR s hitrostjo segrevanja in ohlajanja bloka 3,0 °C/s (vsak korak 3,0 °C/s). **Stopnja segrevanja in ohlajanja bloka** 3,0 °C/s ustreza stopnji segrevanja in ohlajanja vzorca 1,9 °C/s navzgor in 1,6 °C/s navzdol.
- Opomba: Višje stopnje segrevanja in ohlajanja od zgoraj opisanih lahko vplivajo na rezultate tipiziranja. Upoštevajte tudi, da se lahko učinek na tipiziranje razlikuje med različnimi nevalidiranimi cikličnimi termostati glede na nastavitve.**
- temperaturno območje od 4,0 °C do 99,9 °C
  - temperaturna natančnost ± 0,25 °C v območju od 35 °C do 99,9 °C
  - enotnost temperature bloka vzorca ≤ 0,75 °C v območju od 55 °C do 95 °C
  - temperatura umerjanja, ki je sledljiva glede na referenčni standard (tj. NIST)

Programirajte ciklični termostat s parametri cikla PCR v spodnjem razdelku B.

Za posebne informacije cikličnega termostata glejte navodila proizvajalca. Ciklične termostate morate umeriti v skladu s pravili akreditacije ASHI (Ameriško združenje za histokompatibilnost in imunogenetiko) ali EFI (Evropska zveza za imunogenetiko).

Programirajte ciklični termostat pred začetkom izvajanja spodaj opisanih navodil za uporabo.

**B. Parametri PCR cikliranja**

1.	1 cikel	94 °C	2 minuti	denaturacija
2.	10 ciklov	94 °C	10 sekund	denaturacija
		65 °C	60sekund	toplotna obdelava in podaljševanje
3.	20 ciklov	94 °C	10 sekund	denaturacija
		61 °C	50 sekund	toplotna obdelava
		72 °C	30 sekund	podaljševanje
4.	Konec - zadržanje		RT	če je manj kot 8 ur
		4 °C		če je več kot 8 ur

Skupni reakcijski volumen v vsaki vdolbini, 10 µl.

Isti parametri cikla PCR se uporabljajo za vse komplete *Olerup SSP*®.

**ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV**

Za tipizacijo SSP je potrebna ekstrahirana, zelo čista DNK. Vzorce DNK, ki bodo uporabljeni za tipizacijo PCR-SSP HLA, morate ponovno suspendirati v dH<sub>2</sub>O. Razmerje A<sub>260/280</sub> mora biti 1,6 – 2,0 z UV spektrofotometrijo za optimalno vizualizacijo trakov med elektroforezo.

Priporočamo avtomatizirano ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. ACD kri je treba uporabiti kot izhodni material.

Druga možnost je, da lahko DNK ekstrahiramo s katero koli prednostno metodo, pri čemer dobimo čisto DNK. Pri uporabi alternativnih metod je treba koncentracijo DNK prilagoditi na 30 ng/µl. **S temi metodami ne uporabljajte heparinizirane krvi.**

Priporočena koncentracija DNK z:

EZ1 ekstrahirana DNK, 15 ng/µl.

DNK, ekstrahirana z drugimi metodami, 30 ng/µl.

Koncentracije, ki presegajo 50 ng/µl, bodo povečale tveganje za nespecifične amplifikacije in šibke dodatne pasove, zlasti za HLA razreda I tipizacije SSP visoke ločljivosti. Po potrebi razredčite ekstrahirano DNK v dH<sub>2</sub>O.

**Vzorcev DNK ne smete ponovno suspendirati v raztopinah, ki vsebujejo kelatne agente, kot je EDTA, koncentracije nad 0,5 mM.**

Vzorci DNK lahko uporabimo takoj po ekstrakciji ali jih hranimo pri +4 °C do 2 tedna brez škodljivih učinkov na rezultate. Vzorce DNK lahko shranimo pri -20 °C ali nižji temperaturi za obdobje 9 mesecev. Čistost in koncentracijo ekstrahiranih vzorcev DNK, ki so bili shranjeni dlje časa, morate testirati za sprejemljivost pred tipizacijo HLA.

Vzorci DNK morate pošiljati pri +4 °C ali manj, da se ohrani njihova celovitost med prevozom.

**POSTOPEK****A. Priloženi materiali**

1. *Olerup SSP*® pladnji začetnih oligonukleotidov.
2. Mešanica reagentov brez *Taq* polimeraze (ustrezen volumen za pladnje kompleta). Ista mešanica reagentov se uporablja za vse komplete *Olerup SSP*®.
3. Lepilne tesnilne folije PCR (ustrezno število za pladnje kompleta).

**B. Materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi**

1. Komplet/oprema za izoliranje DNK
2. UV spektrofotometer
3. Pripomočki za pipetiranje. Priporočamo elektronsko enokanalno pipeto, ki lahko razdeli 10 µl alikvotov za dodajanje mešanice reagentov-DNKdH<sub>2</sub>O mešanice v vdolbine pladnja.
4. Konice za pipete za enkratno uporabo
5. Polipropilenske epruvete
6. Vortex mešalnik
7. Mikrocentrifuga
8. Stojalo za pladenj PCR
9. Ciklični termostat z ogrevanim pokrovom za PCR s formatom s 96 vdolbinami, temperaturnim gradientom čez grelni blok ≤ 0,75 °C in pladnjem/zadrževalnikom za 0,2 ml tankostenske reakcijske vdolbine
10. Mikrovalovna pečica ali kuhalna plošča za ogrevanje raztopin agaroze
11. Agarosa razreda elektroforeze, npr. FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE pufer; 1 x TBE pufer je 89 mM tris-borat, 2 mM dinatrijev EDTA, pH 8,0
13. Steklениčka s kapalko za etidijev bromid št. izdelka 103.301-10 ali steklenička s kapalko za GelRed št. izdelka 103.302-05
14. Pripomoček za pipetiranje gela. Priporočamo 8-kanalno pipeto za polnjenje z gelom, z nastavljivo prostornino 5-25 µl
15. Oznakavelikosti DNK, ki pokriva območje 50 - 1 000 bp, npr. lestev 100 osnovnih parov, oznaka velikosti DNK št. izdelka 103.202-100 ali oznaka velikosti DNK za kratke uporabe gela 103.203-100
16. Naprava za elektroforezo/napajanje
17. UV transiluminator
18. Sistem dokumentacije fotografij ali slik
19. Roche *Taq* DNK polimeraza, GMP razred. [Katalog št. 03 734 927 001 (1000 U) ali št. 03 734 935 001 (5000 U)].

**C. Postopek po korakih**

Glejte Navodila za uporabo.

**NAVODILA ZA UPORABO****A. Priprava vzorca**

1. Očistite genomsko DNK iz vzorca levkocitov po izbrani metodi, glejte Zbiranje in priprava vzorca zgoraj.
2. Za posebne informacije o pripravi in shranjevanju vzorcev glejte Zbiranje in priprava vzorca zgoraj.
3. Opravite amplifikacijo PCR na očiščenem vzorcu DNK s pladnjem za tipiziranje *Olerup SSP*®, ali shranite vzorec DNK, dokler ni pripravljen za tipizacijo.

**B. Priprava reagenta/opreme**

1. Programirajte ciklični termostat za zagon programa *Olerup SSP*® PCR, glejte Zahteve za instrumente - Parametri PCR cikliranja.
2. Imejte na voljo *Taq* polimerazo (5 enot/μl), hranite pri -20°C.
3. Pripravite gel za elektroforezo, glejte poglavje C – **Priprava gelske elektroforeze** spodaj.

**C. Priprava gelske elektroforeze**

Za sistem *Olerup SSP*® Gel System 96 (št. izdelka 103.101-01)

**1. Nastavitev**

- Izravnajte komoro za ulivanje za en gel (št. izdelka 103.101-31) ali komoro za ulivanje za tri gele (št. izdelka 103.101-33) z izravnalnim mehurčkom in tremi po višini nastavljivimi nogami.
- Pladenj(-e) za gel položite v komoro za ulivanje.

**2. 2 % (m/v) Priprava gela Agaroze**

Uporabite visokokakovostno agarozo za elektroforezo, ki lahko razloči od 50 do 2000 fragmentov baznega para DNK.

- V 5 ml 10 x TBE (tris borat EDTA) pufra dodajte 150 ml destilirane vode in 2 g agaroze v 500 ml steklenici.
- Agarozo raztopite s kuhanjem v mikrovalovni pečici, dokler ne nastane 100 ml homogene raztopine.
- Pustite, da se raztopljena raztopina gela ohladi na 60°C, npr. v grelni omarici.
- Gel pred ulivanjem obarvajte z etidijevim bromidom (10 mg/ml), 5 μl na 100 ml raztopine gela. Za maksimalno enostavno rokovanje uporabite naše stekleničke s kapalko etidijevega bromida (št. izdelka 103.301-10). **Opomba: Etidijev bromid je rakotvorna snov. Uporablajte ustrezno osebno zaščitno opremo.**
- V pladenj za gel v komori za ulivanje vlijte 100 ml raztopine gela. Postavite 6 glavničkov za gel (izdelek št. 103.101-21) v reže na pladnju z gelom.
- Pustite, da gel 15 minut počiva.
- V posodo za gel vlijte 750 ml 0,5 x pufra TBE. Potopite pladenj za gel v škatlo za gel in previdno odstranite 6 glavničkov za gel, tako da jih dvignete navzgor.



**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP*® HLA brez Taq polimeraze**

Pri uporabi alternativnih sistemov elektroforeze upoštevajte navodila za uporabo proizvajalca. Za uporabo s kompleti za tipiziranje HLA *Olerup SSP*® morajo biti ti sistemi sposobni ločevati produkte PCR velikosti od 50 do 1100 baznih parov.

**D. Postopek po korakih**

1. Odstranite z navedene temperature shranjevanja: ustrezno število vzorcev DNK, pladenj(e) začetnih oligonukleotidov in količino mešanice reagentov in Taq polimeraze (5 enot/ $\mu$ l), ki je potrebna za izbran(e) vzorec(ce) DNK/pladenj(e) začetnih oligonukleotidov. Odtajajte pri sobni temperaturi (20 do 25 °C).

Ista mešanica reagentov se uporablja za vse komplete *Olerup SSP*®.

2. Vzorce DNK na kratko premešajte z vrtinčenjem.
3. Postavite pladenj(e) začetnih oligonukleotidov v stojalo za pladnje za PCR.
4. **Kompleti z nizko in visoko ločljivostjo**
  - Preden vzamete alikvot, premešajte mešanico reagentov.
  - Z ročno enokanalno pipeto dodajte mešanico reagentov pri sobni temperaturi Taq polimerazo (5 enot/ $\mu$ l) in dH<sub>2</sub>O v 0,5 ml ali 1,5 ml epruveto. (Za ustrezne količine glej preglednico 1 spodaj.)
  - Zaprite epruveto in vrtinčite 5 sekund. Epruveto zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruvete.
  - Z ročno enokanalno pipeto dodajte 8  $\mu$ l mešanica reagentov-dH<sub>2</sub>O mešanice in 2  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O v vdolbino za negativno kontrolo, tj. vdolbina s pari začetnih oligonukleotidov negativne kontrole pladnja začetnih oligonukleotidov.
  - Z ročno enokanalno pipeto dodajte vzorec DNK pri sobni temperaturi v preostalo mešanica reagentov-dH<sub>2</sub>O mešanico. (Za ustrezne količine glej preglednico 1 spodaj.)
  - Zaprite epruveto in vrtinčite 5 sekund. Epruveto zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruvete.
  - Z elektronsko enokanalno pipeto alikvotirajte 10  $\mu$ l vzorčne reakcijske zmesi v vsako vdolbino, razen v vdolbino za negativno kontrolo, pladnja začetnih oligonukleotidov.

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

**Tabela 1: Količine sestavin, potrebnih na test za različno število vdolbin pri uporabi mešanice reagentov brez Taq polimeraze.**

Št. vdolbin na test	Volumen mešanice reagentov (μl)	Volumen vzorca DNK (μl)	Volumen dH <sub>2</sub> O (μl)	Volumen Taq polimeraze (μl)	Št. vdolbin na test	Volumen mešanice reagentov (μl)	Volumen vzorca DNK (μl)	Volumen dH <sub>2</sub> O (μl)	Volumen Taq polimeraze (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

Zgoraj navedene priporočene količine vključujejo volumen za kompenzacijo variacij pipete in izgube tekočine na notranjih stenah epruvet.

### 5. Kombinirani kompleti A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ in DQA-DQB-DR Enhanced in HLA-C visoka ločljivost za pogoste alele

- Vrtinčite mešanico reagentov v vrtinčnem mešalniku.
- Z ročno enokanalno pipeto dodajte 8,3 μl Taq polimeraze (5 enot/μl) in 511,7 μl dH<sub>2</sub>O pri sobni temperaturi v priloženo 1,5 ml epruveto, ki vsebuje 312 μl mešanice reagentov.
- Zaprite epruveto in vrtinčite 5 sekund. Epruveto zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruvete.
- Z ročno enokanalno pipeto dodajte 8 μl mešanica reagentov – Taq polimeraze – dH<sub>2</sub>O mešanice in 2 μl dH<sub>2</sub>O v vdolbino za negativno kontrolo št. 96, tj. vdolbina s pari začetnih oligonukleotidov negativne kontrole.
- Z ročno enokanalno pipeto dodajte 206 μl DNK vzorca pri sobni temperaturi v preostalo mešanica reagentov – Taq polimeraze – dH<sub>2</sub>O mešanico.
- Zaprite epruveto in vrtinčite 5 sekund. Epruveto zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruvete.

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

- Z elektronsko enokanalno pipeto alikvotirajte 10 µl vzorčne reakcijske mešanice v vsako vdolbino, razen v vdolbino za negativno kontrolo št. 96, pladnja začetnih oligonukleotidov.

**Pomembno:**

Prepričajte se, da vzorec nanese nad začetne oligonukleotide (posušene na dnu vsake vdolbine pladnja za začetne oligonukleotide), da preprečite navzkrižno kontaminacijo med vdolbinami. Dotaknite se notranje stene vdolbine s konico pipete, da lahko vzorec zdrsne navzdol na dno vdolbine. Preverite, ali so se vsi vzorci usedli na dno vsake vdolbine. Če ne, s pladnjem nežno udarite po vrhu mize, da se vsi vzorci usedejo na dno vdolbine, preden začnete s PCR.

5. Pladenj(-e) začetnih oligonukleotidov pokrijte s priloženimi lepilnimi tesnilnimi folijami PCR. Preverite, ali so vse reakcijske vdolbine popolnoma pokrite, da preprečite izgubo izhlapevanja med amplifikacijo PCR. Kompresijsko blazinico *Olerup SSP®* (št. izdelka 103.505-06) lahko nanese na lepilne tesnilne folije PCR, da preprečite izhlapevanje med termičnim cikliranjem.
6. Pladenj(-e) začetnih oligonukleotidov postavite v ciklični termostat z ustreznim adapterjem med epruveto in pladnjem. Ne dovolite več kot 5 minut zamika med nastavitvijo PCR in termičnim cikliranjem.
7. Vnesite številko programa *Olerup SSP®*. Določite reakcijski volumen 10 µl.
8. Zaženite program PCR. Program traja približno 1 uro in 20 minut.
9. Odstranite pladenj začetnih oligonukleotidov iz cikličnega termostata. Preglejte pladenj za PCR, da se prepričate, da je v vsaki vdolbini PCR približno enaka količina tekočine. Elektroforezirajte vzorce, glejte poglavje E — Gelska elektroforeza spodaj. Rezultate tipiziranja interpretirajte s ***tabelami interpretacij in specifičnosti ali delovnim listom za serijo***, glejte Pričakovane vrednosti spodaj.

**E. Gelska elektroforeza**

1. Po končanem PCR reakcijo usmerite pladenj začetnih oligonukleotidov in posodo z gelom. Vrstni red vdolbin je od leve proti desni in od zgoraj navzdol.
2. Nežno odstranite pokrove trakov, ne da bi pljuskali produkte PCR.
3. Produkta PCR v zaporedju naložite na 2-odstotni agarozni gel. (Dodatek pufra za polnjenje gela ni potreben.) Priporoča se uporaba 8-kanalne pipete za polnjenje gela.
4. Naložite oznako velikosti DNK (lestev 100 baznih parov, oznaka velikosti DNK št. izdelka 103.202-100 ali oznaka velikosti DNA za kratke postopke z gelom 103.203-100) v eno vdolbino na vrsto.
5. Posodo z gelom pokrijte s pokrovom posode za gel.
6. Gel elektroforezirajte v 0,5 x pufri TBE, brez ponovnega kroženja pufra, 15–20 minut pri 8–10 V/cm.
7. Pladenj z gelom prenesite na UV transiluminator.
8. Gel fotografirajte s pladnjem za gel ali brez.
9. Označite fotografijo v skladu s pravili laboratorija.

**KONTROLA KAKOVOSTI**

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

Smernice ASHI za testiranje HLA kažejo, da je treba v vsako nastavitev PCR vključiti vdolbino za negativno (kontaminacijsko) kontrolo. (Revidirani standardi za akreditirane laboratorije, Ameriško združenje za histokompatibilnost in imunogenetiko, končni revidirani standard, ki ga je odobril CMS: 16. februarja 2021). Vdolbina z negativno kontrolo je vključena v vse komplete, z izjemo HLA-B\*27 – enote odmerka in kompletov HLA-B\*27 z eno vdolbino.

Glejte razlago gela na strani 14.

## REZULTATI

Do listov za validacijo celične linije in potrdila o analizi, specifičnih za serijo, je mogoče dostopati na spletu, [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

## OMEJITVE POSTOPKA

1. Postopek PCR-SSP zahteva visoko nadzorovane testne pogoje, da se zagotovi ustrezna diskriminatorna amplifikacija. Dosledno je treba upoštevati postopek, opisan v navodilih za uporabo.
2. Ekstrahiran vzorec DNK je predloga za specifični postopek amplifikacije PCR. Očiščena DNK mora imeti razmerje  $A_{260/280}$  med 1,6 in 2,0, da dosežete optimalno vizualizacijo traku z elektroforezo.
3. Vsi instrumenti, npr. ciklični termostat, pripomočki za pipetiranje, morajo biti umerjeni v skladu s priporočili proizvajalca.
4. Podatki, specifični za serijo, so podani v vložku izdelka: Podatki, specifični za serijo, in v delovnem listu, specifičnem za serijo.
5. Na podlagi opravljenega testiranja so bile naslednje snovi ovrednotene s tremi (3) metodami ekstrakcije pri navedenih koncentracijah in ugotovljeno je bilo, da ne vplivajo na uspešnost testa.

Metoda ekstrakcije	Moteče snovi	Moteča koncentracija*
Sistem EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubin	200 mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Trigliceridi	30 g/L
	Beljakovine	110 g/L
Sistem QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubin	200 mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Trigliceridi	18,2 g/L
	Beljakovine	77–96 g/L
Metoda Gentra PureGene	Bilirubin	200 mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Trigliceridi	18,2 g/L
	Beljakovine	119–146 g/L

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

6. PCR plošče so fizično združljive z večino cikličnih termostatov na trgu. Glejte spodnjo tabelo združljivosti s plastiko cikličnega termostata.  
*Opomba: Tabela je namenjena samo kot smernica. Za validirane ciklične termostate glejte poglavje Zahteve za instrumente — Instrument.*

<b>Tabela združljivosti</b>	
<b>Proizvajalec</b>	<b>Ciklični termostat</b>
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96 vdolbin
	ProFlex 2x96 vdolbin
	Blok Veriti 0,2 ml 96 vdolbin
	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)
	PTC-100 z blokom s 96 vdolbinami
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. Učinkovitost tega kompleta z mešanico reagentov brez Taq polimeraze je bila potrjena samo z Roche Taq DNK polimerazo, razred GMP (katalog št. 03 734 927 001 ali št. 03 734 935 001). Učinkovitost testa z uporabo drugih encimov ni znana in jo mora določiti in potrditi uporabnik.

**PRIČAKOVANE VREDNOSTI****A. Analiza podatkov**

Previdno pregledajte fotografijo gela in določite pozitivne steze.

1. Hitrejšje pomikajoči in krajši trak bo viden v stezi gela, če so bili specifični aleli HLA amplificirani. To kaže na pozitiven rezultat testa.
  - a. Zabeležite prisotnost in odsotnost specifičnih produktov PCR.
  - b. Pri razlagi rezultatov gela je koristno spremljati relativne dolžine specifičnih produktov PCR, kot je navedeno v vložkih za posamezne serije. Več stez ima dve ali več možnih dolžin specifičnih produktov PCR. Te vdolbine vsebujejo več parov začetnih oligonukleotidov, ki ustvarjajo produkte PCR različnih velikosti, odvisno od alela(-ov) HLA vzorčne DNK.
  - c. Vzorec stez gela, ki vsebujejo specifične produkte PCR, povežite z informacijami v tabelah razlage in specifičnosti, specifičnih za serijo, da dobite HLA tipizacijo vzorčne DNK.
2. Notranji trak pozitivne kontrole, ki se počasneje premika in je daljši, mora biti viden v vseh stezah gela, razen v stezi z gelom negativne kontrole, kot kontrola uspešne amplifikacije. Notranji trak pozitivne kontrole je lahko šibek ali pa ga ni v pozitivnih stezah gela.
  - a. Zabeležite prisotnost in relativno dolžino trakov notranje pozitivne kontrole. Kontrolni trakovi različnih velikosti bodo pomagali pri pravilni usmeritvi tipizacije in identifikaciji kompleta.
  - b. Odsotnost traku notranje pozitivne kontrole brez specifičnega produkta PCR kaže na neuspešno reakcijo PCR.
    - i. Če je alele HLA mogoče določiti v prisotnosti neuspešnih reakcij PCR in neuspele reakcije PCR ne spremenijo dodelitve alelov, potem testa ni treba ponoviti.
    - ii. Če pa bi neuspele reakcije PCR lahko spremenile dodelitev alela HLA, je treba tipizacijo ponoviti.
3. Prisotnost specifičnega produkta PCR ali traku notranje pozitivne kontrole v stezi(-ah) negativne kontrole kaže na kontaminacijo s produktom(-i) PCR in razveljavi vse rezultate testa. V stezah negativne kontrole je mogoče opaziti oligomere začetnih oligonukleotidov velikosti od 40 do 60 baznih parov. To ne predstavlja kontaminacije.

## B. Razlaga gela

	Pozitivna reakcija	Negativna reakcija	Neuspešna reakcija PCR
Vdolbina			
Interni trak pozitivne kontrole			
Poseben trak			
Trak začetnih oligonukleotidov			

1. Označevalec velikosti DNK (lestev 100 baznih parov, oznaka velikosti DNK št. 103.202-100 ali oznaka velikosti DNK za kratke postopke z gelom 103.203-100) je treba zagnati v eni vdolbini na vrsto gela ali v skladu z lokalnimi laboratorijskimi smernicami za akreditacijo.
2. Lahko se dobijo trakovi, daljši od traku notranje pozitivne kontrole, ki jih je treba zanemariti pri razlagi rezultatov tipizacije.
3. Neuporabljeni začetni oligonukleotidi bodo oblikovali razpršen trak krajših trakov 50 baznih parov.
4. Opaziti je mogoče artefakte oligomera začetnih oligonukleotidov. Te so daljši od traku začetnih oligonukleotidov, vendar krajši od posebnih trakov.

## POSEBNE ZNAČILNOSTI UČINKOVITOSTI

### Nadzor kakovosti serije kompleta

Vsaka raztopina začetnih oligonukleotidov je preizkušena s skupino 48 vzorcev DNK iz dobro opredeljenih celičnih linij IHWC, glejte validacijski list(e) za posamezno serijo celičnih linij v navodilu za izdelek, informacije, specifične za serijo.

### Primerjava metod

Izvedena je bila študija za primerjavo kompletov za tipiziranje *Olerup SSP*<sup>®</sup> HLA s *Taq* polimerazo priloženo mešanici reagentov PCR in brez *Taq* polimeraze priložene mešanici reagentov PCR.. Namen študije je bil dokazati, da ročno dodajanje ne vpliva na rezultate testov in da različne serije *Taq* polimeraze dajo enake rezultate. Študija je vključevala nizkoločljivo tipiziranje HLA-A, -B (razred I) in -DRB (razred II) 15 vzorcev DNK z znanim genotipom HLA, pridobljenih iz mednarodne zbirke histokompatibilnih delavnic. Vzorce je pripravilo in kodiralo osebje, ki ni izvajalo testiranja; osebje za testiranje ni bilo seznanjeno s tipi vzorcev HLA. Vsak vzorec je

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

bil testiran vzporedno s kombiniranim pladnjem Olerup SSP® HLA-A-B-DR z mešanico reagentov PCR brez Taq polimeraze (»test«) in kombiniranim pladnjem Olerup SSP® HLA-A-B-DR z mešanico reagentov PCR, vključno s Taq polimerazo (»kontrola«), v skladu z navodili na vložku izdelka za vsako analizo. Vsa testiranja so bila izvedena v laboratoriju CareDx AB v Stockholmu na Švedskem z uporabo ene serije kompleta in dveh serij Taq polimeraze. V študiji je bila uporabljena DNK polimeraza Roche Taq, razred GMP. Testiranje na vsakem vzorcu je obsegalo tipiziranje z nizko ločljivostjo s kombiniranim pladnjem Olerup SSP® HLA-A-B-DR, opravljeno z: 1) mešanico reagentov PCR, vključno s Taq polimerazo (analiza, ki jo je odobrila FDA) (kontrolni test), 2) mešanico reagentov PCR plus DNK Taq polimeraza Roche, izdelek razreda GMP, 5 U/μL; serija št. 1 (testna serija št. 1) in 3) mešanico reagentov PCR plus DNK Taq polimeraza Roche, izdelek razreda GMP, 5 U/μL; serija št. 2 (testna serija št. 2). Po PCR je bilo zaznavanje izvedeno z gelsko elektroforezo. Rezultati so povzeti spodaj.

Primerjava	Ujemanje			% ujemanja (95 % interval zaupanja <sup>a</sup> )
	Rezultati tipiziranja razred I (št. ujemanja/skupek)		Rezultati tipiziranja razred II (št. ujemanja/skupek)	
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Testna serija št. 1/Kontrolna serija	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0)
Testna serija št. 1/Konsenz <sup>b</sup>	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0)
Testna serija št. 2/Kontrolna serija	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0)
Testna serija št. 2/Konsenz	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0)
Testna serija št. 1/Testna serija št. 2	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0)

<sup>a</sup> Metoda določanja rezultata

<sup>b</sup> Rezultat konsenza iz mednarodne zbirke histokompatibilnih delavnic



## LITERATURA

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. Trenutne alele HLA lahko najdete na [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

### ODPRAVLJANJE TEŽAV

Težava	Razlog	Ukrepanje
<b>Brez amplifikacije (niti amplifikacije notranjih kontrolnih fragmentov niti specifičnih amplifikacij).</b>	Premajhna količina DNK.	Izmerite koncentracijo DNK in preverite, ali je dodana pravilna količina. Kontaminacija RNK lahko povzroči spektrofotometrično precenjevanje koncentracije DNK. Pazljivo ponovite ekstrakcijo DNK s sveže pripravljenimi raztopinami. Priporočamo avtomatizirano ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNK vsebuje inhibitorje PCR, npr. proteine, etanol (iz korakov posedanja), preostale matrice izdelkov za prečiščevanje DNK v trdni fazi.	Izmerite kakovost DNK. Priporočamo razmerje A260/A280 1,6–2,0 z UV spektrofotometrijo. Dosledno upoštevajte protokol dobavitelja za ekstrakcijo DNK. Ponovno ekstrahirajte DNK. Priporočamo avtomatizirano ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNK je bila ekstrahirana iz heparinizirane krvi.	Uporabite neheparinizirano kri ali pa uporabite protokole za ekstrakcijo DNK za heparinizirano kri.
	DNK je raztopljen v pufru z vsebnostjo EDTA.	Ponovite ekstrakcijo DNK in raztopite DNK v dH <sub>2</sub> O.

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP*<sup>®</sup> HLA brez Taq polimeraze**

<b>Težava</b>	<b>Razlog</b>	<b>Ukrepanje</b>
<b>Nadaljevanje:</b> <b>Brez amplifikacije (niti amplifikacije notranjih kontrolnih fragmentov niti specifičnih amplifikacij).</b>	Nenameren vnos belila v test.	Preglejte področja, kjer bi lahko prišlo do vnosa belila.
	Kompleti niso shranjeni na primerni temperaturi.	Komplete shranjujte pri -20 °C.
	Ciklični termostat ne deluje pravilno.	Umerite ciklični termostat in preverite program PCR. Ciklični termostat, ki se uporablja za rutinsko tipiziranje PCR-SSP, morate umeriti vsakih 6-12 mesecev.
	Neustrezen stik med grelnim blokom cikličnega termostata in pladnjem za tipiziranje SSP.	Uporabite pravilen pladenj/držalo za 0,2 ml tankostenske reakcijske vdolbine, glejte priročnik cikličnega termostata.
<b>Naključna napaka amplifikacije (izpadi).</b>	Tesnila PCR/pokrovi epruвет PCR, ki niso tesno zaprti, povzročijo izhlapevanje in posledično neuspeh amplifikacije.	Prepričajte se, da so tesnila PCR/vsi pokrovčki tesno zaprti. <i>Olerup SSP</i> <sup>®</sup> kompresijsko blazinico (št. izdelka 103.505-06) lahko nanese na lepilne tesnilne folije PCR, da preprečite izhlapevanje med termičnim ciklom.
	Napake pri polnjenju gela.	Preverite, ali je bilo napolnjeno pravo število vdolbin in ali vsaka vdolbina vsebuje približno enako količino mešanice PCR.
	Uporaba nekalibriranih pipet.	Redno umerite vse pipete v skladu s priporočili proizvajalca.
	Napake pri pipetiranju.	Bodite bolj previdni pri pipetiranju.
	Mešanica reagentov in vzorčna DNK pred uporabo nista bili dobro zmešani.	Pred uporabo na kratko premešajte z vrtinčenjem. Priporočamo vrtinčenje po vsaki vrstici.

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

<b>Težava</b>	<b>Razlog</b>	<b>Ukrepanje</b>
<b>Nadaljevanje:</b> <b>Naključna napaka</b> <b>amplifikacije (izpadi).</b>	V vdolbine so bile dodane neenake količine DNK-mešanica reagentov mešanice.	Bodite bolj previdni pri pipetiranju.
<b>Šibki notranji kontrolni fragmenti.</b>	Nečista DNK.	Izmerite kakovost DNK. Razmerje A260/A280 mora biti 1,6–2,0 z UV spektrofotometrijo. Kontaminacija RNK lahko povzroči spektrofotometrično precenjevanje koncentracije DNK. Razgrajena DNK povzroči razmaz v stezah gela. Pazljivo ponovite ekstrakcijo DNK s sveže pripravljenimi raztopinami. Priporočamo avtomatizirano ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Premajhna količina DNK.	Izmerite koncentracijo DNK in prilagodite na 30 ng/μl ali na 15 ng/μl za DNK, pridobljeno s krvnim sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Kontaminacija RNK lahko povzroči spektrofotometrično precenjevanje koncentracije DNK. Razgrajena DNK povzroči razmaz v stezah gela. Pazljivo ponovite ekstrakcijo DNK s sveže pripravljenimi raztopinami. Priporočamo avtomatizirano

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

<b>Težava</b>	<b>Razlog</b>	<b>Ukrepanje</b>
<b>Nadaljevanje:</b> <b>Šibki notranji kontrolni fragmenti.</b>		ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Previsoka temperatura toplotne obdelave, ciklični termostat ni umerjen.	Umerite ciklični termostat in preverite program PCR. Ciklični termostat, ki se uporablja za rutinsko tipiziranje PCR-SSP, morate umeriti vsakih 6-12 mesecev.
	Mešanica reagentov PCR je bila shranjena pri +4 °C dlje kot 2 tedna.	Pravilno shranite mešanico reagentov PCR.
<b>Nespecifična amplifikacija (lestve ali razmazi).</b>	Uporaba prevelikega vzorca DNK.	Izmerite koncentracijo DNK in prilagodite na 30 ng/μl ali na 15 ng/μl za DNK, pridobljeno s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Nekateri raztopine začetnih oligonukleotidov imajo večjo nagnjenost k nespecifični amplifikaciji, glejte opombe v vsaki tabeli specifičnosti za posamezno serijo.
	Nečista DNK.	Pri interpretaciji dobljenih rezultatov je treba zanemariti vse fragmente, ki so večji od fragmenta notranje kontrole. Preverite kakovost DNK. Ponovite ekstrakcijo DNK. Priporočamo avtomatizirano ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Nekateri raztopine začetnih oligonukleotidov imajo večjo nagnjenost k nespecifični amplifikaciji, glejte opombe v vsaki

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

<b>Težava</b>	<b>Razlog</b>	<b>Ukrepanje</b>
<b>Nadaljevanje: Nespecifična amplifikacija (lestve ali razmazi).</b>		tabeli specifičnosti za posamezno serijo.
<b>Sčasoma vedno šibkejši signali amplifikacije.</b>	Raztopina etidijevega bromida za barvanje agaroznega gela je stara.	Pripravite svežo raztopino etidijevega bromida, da dosežete boljše obarvanje agaroznega gela in boljši signal. Oblake začetnih oligonukleotidov je enostavno zaznati, če je obarvanje agaroznega gela normalno.
	Ena od UV žarnic je pokvarjena.	Preverite opremo za UV svetlobo. Oblake začetnih oligonukleotidov je enostavno zaznati, če je UV-svetloba normalna.
	Uporabljeno je bilo premalo vzorca DNK.	Izmerite koncentracijo DNK in prilagodite na 30 ng/μl ali na 15 ng/μl za DNK, pridobljeno s krvnim sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Previsoka temperatura toplotne obdelave, ciklični termostat ni umerjen.	Umerite ciklični termostat in preverite program PCR. Ciklični termostat, ki se uporablja za rutinsko tipiziranje PCR-SSP, morate umeriti vsakih 6-12 mesecev.
<b>Neobičajni vzorci amplifikacije.</b>	Uporabljena je napačna tabela razlage specifična za serijo/delovni list specifičen za serijo.	Preverite številko serije uporabljenega izdelka in uporabljeno tabelo razlage/delovni list.
	Nepravilen vrstni red pri polnjenju gela.	Preverite poravnavo mešanic in stez gela.
	Vzorec ojačanja vsebuje lažno pozitivno vrednost.	Glejte spodaj.
	Vzorec ojačanja vsebuje lažno negativno vrednost.	Glejte spodaj.

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP*<sup>®</sup> HLA brez Taq polimeraze**

<b>Težava</b>	<b>Razlog</b>	<b>Ukrepanje</b>
<b>Lažna pozitivna amplifikacija.</b>	Kontaminacija DNK.	Uporabite rokavice, konice pipet s pregradami (filtrirnimi čepi) ter ločene prostore za obravnavo pred PCR in obravnavo po PCR. V vseh korakih zagotovite natančno ravnanje z vsemi vzorci. Preverite kontaminacijo s kompletom <i>Olerup SSP</i> <sup>®</sup> Wipe Test.
	Nečista DNK.	Izmerite kakovost DNK. Dosledno upoštevajte protokol dobavitelja za ekstrakcijo DNK. Poskusite druge sisteme za ekstrakcijo DNK. Ponovno ekstrahirajte DNK. Priporočamo avtomatizirano ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Uporaba prevelikega vzorca DNK.	Izmerite koncentracijo DNK in prilagodite na 30 ng/μl ali na 15 ng/μl za DNK, pridobljeno s krvnim sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Prenizka temperatura toplotne obdelave.	Umerite ciklični termostat in preverite program PCR. Ciklični termostat, ki se uporablja za rutinsko tipiziranje PCR-SSP, morate umeriti vsakih 6 do 12 mesecev.
	Obsežen zamik med nastavitvijo PCR in začetkom termičnega cikliranja.	Pred termičnim cikliranjem ne smete dopustiti več kot 5-minutnega zamika.
	Zakasnitev med namestitvijo pladnjev za tipiziranje v ciklični	Uporabite predhodno segret ciklični termostat.

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

<b>Težava</b>	<b>Razlog</b>	<b>Ukrepanje</b>
<b>Nadaljevanje: Lažna pozitivna amplifikacija.</b>	termostat in začetkom cikliranja.	
	Uporaba prevelike količine etidijevega bromida.	Uporabite priporočeno količino etidijevega bromida.
	Nepravilna interpretacija artefakta kot specifičnega traku.	Preverite tabelo razlage/delovni list in tabelo specifičnosti za določeno serijo za pravilno velikost traku in opombe.
	Vzorec ojačanja vsebuje lažno pozitivno vrednost.	Preverite, ali so vse specifične amplifikacije pravilne velikosti ali pa je bil artefakt (prenos, dimer začetnih oligonukleotidov) napačno interpretiran kot amplifikacija.
	Nepravilen vrstni red pri polnjenju gela.	Preverite poravnavo mešanic in stez gela.
<b>Lažna negativna amplifikacija.</b>	Ciklični termostat ni pravilno kalibriran.	Umerite ciklični termostat in preverite program PCR. Ciklični termostat, ki se uporablja za rutinsko tipiziranje PCR-SSP, morate umeriti vsakih 6-12 mesecev. Če ni popravljeno s ponovnim umerjanjem, ponovno vnesite test z referenčnim vzorcem enake specifičnosti. Če je potrjeno negativno, se obrnite na podporo strankam.
	Nepravilen vrstni red pri polnjenju gela.	Preverite poravnavo mešanic in stez gela.



**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**

<b>Težava</b>	<b>Razlog</b>	<b>Ukrepanje</b>
<b>Splošne težave z gelom (motni geli in/ali zamazane steze).</b>	Razgrajen vzorec DNK.	Pojavi se kot bris v stezah gela. Izolirajte DNK iz svežega vzorca.
	Močne proge v naključnih vdolbinah.	Neenakomerne suspenzije DNK. Pred odvzemom alikvota se prepričajte, da se vzorčna DNK raztopi. Razredčen vzorec DNK premešajte z vrtinčnim mešalnikom.
	Produkt PCR je izplaval iz vdolbine.	Konice pipete previdno poravnajte z vdolbinami gela in jih počasi odmerite.
	Pufer za elektroforezo je morda preveč topel.	Pripravite nov pufer TBE. Zaženite pri nižji napetosti.
	Uporabljen je napačen odstotek agaroznega gela.	Prepričajte se, da je uporabljen priporočeni 2-odstotni agarozni gel.
	Agarozna ni popolnoma raztopljena.	Na kratko ponovno zavrite, da se agarozna raztopi.
	Nepravilna koncentracija TBE.	Uporabite priporočeno koncentracijo 0,5 x TBE.
	Geli so na novo odliti.	Geli so pripravljene za uporabo šele 15 minut po ulivanju.
	Prestari geli.	Ne ulivajte gelov prehitro vnaprej.
	Uporabljeni glavniček za gel ima predebele reže.	Uporabite tanke glavničke (4 x 1 mm).
	Pladenj za gel ni UV prozoren.	Pred ogledom odstranite gel iz pladnja za gel.
	Slika gela je presvetla.	Prekomerna uporaba etidijevega bromida. Preverite nastavitve kamere.
	Slika gela je pretemna.	Uporabite priporočeno količino etidijevega bromida. Preverite nastavitve kamere.

Težava	Razlog	Ukrepanje
<b>Splošne težave z lažno negativno amplifikacijo ali tovrstne težave, odvisne od posamičnega postopka</b>	Nastavitev hitrosti segrevanja in ohlajanja je previsoka.	Kompleti <i>Olerup SSP</i> so potrjeni s cikličnim termostatom GeneAmp 9700, nastavljenim na način 9600, in ProFlex s hitrostjo segrevanja in ohlajanja 3 °C/s. Višje stopnje segrevanja in ohlajanja kot ekvivalentne tem lahko vplivajo na rezultate tipiziranja.

### **BLAGOVNE ZNAMKE, UPORABLJENE V TEM DOKUMENTU/IZDELKU**

*Olerup SSP*<sup>®</sup> je registrirana blagovna znamka *CareDx AB*.  
Qiagen<sup>™</sup> je blagovna znamka družbe QIAGEN.

**OBVESTILO KUPCU:** Kompleti *Olerup SSP*<sup>®</sup> brez Taq polimeraze – Ta izdelek je optimiziran za uporabo s Taq polimerazo Roche, razred GMP (katalog št. 03 734 927 001 ali št. 03 734 935 001) v postopku verižne reakcije s polimerazo (»PCR«), ki je lahko zajet v patentih Roche Molecular Systems, Inc. in F. Hoffmann-La Roche Ltd. (»Roche«). Laboratorij je odgovoren za stik z Roche Molecular Systems, Inc., da ugotovi, ali je potrebna licenca v okviru teh patentov.

### **GARANCIJA**

*CareDx AB* jamči za svoje izdelke prvotnemu kupcu, da nimajo napak v materialih in izdelavi ob običajni uporabi. Edina obveznost družbe *CareDx AB* v okviru te garancije je, da brezplačno zamenja kateri koli izdelek, ki ne izpolnjuje standardov delovanja, navedenih na listu s specifikacijami izdelka.

Ta garancija velja samo za izdelke, ki so bili obdelani in shranjeni v skladu s priporočili podjetja *CareDx AB*, in ne velja za izdelke, ki so bili spremenjeni, napačno uporabljeni ali zlorabljeni.

Vsi zahtevki po tej garanciji morajo biti v pisni obliki naslovljeni na *CareDx AB* in jim mora biti priložena kopija računa kupca. Ta garancija je namesto vseh drugih, izraženih ali nakazanih garancij, vključno z garancijami o prodajnosti in primernosti za določen namen. *CareDx AB* v nobenem primeru ne odgovarja za naključno ali posledično škodo.

Izdelka ni mogoče preoblikovati, ponovno pakirati ali prodati v kakršni koli obliki brez pisnega soglasja podjetja *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švedska.

Z vsemi vzorci ravnajte, kot da bi lahko prenašali bolezen. Vsa dela je treba izvajati z rokavicami in ustrezno zaščitno opremo.

## JAMSTVO

Družba *CareDx AB* zagotavlja, da imajo začetni oligonukleotidi v pladnjih za tipiziranje *Olerup SSP*<sup>®</sup> specifičnosti, podane v delovnem listu, v tabelah specifičnosti in razlage za posamezno serijo na vložku izdelka.

## NASLOVI:

### Proizvajalec:

**CareDx AB**, Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švedska

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

**Faks:** +46-8-717 88 18

**E-pošta:** orders-se@caredx.com

**Spletna stran:** www.caredx.com

### Distributer:

**CareDx AB**, Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švedska

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

**Faks:** +46-8-717 88 18

**E-pošta:** orders-se@caredx.com

**Spletna stran:** www.caredx.com

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

**Tel:** 1-877-653-7871

**Faks:** 610-344-7989

**E-pošta:** orders-us@caredx.com

**Spletna stran:** www.caredx.com

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

**Tel:** +61 8 9336 4212

**E-pošta:** orders-aus@caredx.com

**Spletna stran:** www.caredx.com

### Pooblašчени predstavnik:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Za informacije o distributerjih podjetja *CareDx* po vsem svetu se obrnite na *CareDx AB*.

1595-LBL v02 je preveden iz glavne angleške različice 0193-LBL v07 *Olerup SSP*<sup>®</sup> HLA kompleti za tipiziranje HLA, brez Taq polimeraze.

Spremembe revizije 0193-LBL v07 v primerjavi z 0193-LBL v06:

1. Dodatek švicarskega pooblaščenega predstavnika
2. Dodatek GelRed v razdelek B. Materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi.

**Navodila za uporabo**  
**Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA brez Taq polimeraze**