



Upute za uporabu

Olerup SSP[®] uključujući Taq polimerazu

© 2023 CareDx, Inc. Svi robni znakovi ili zaštitni znakovi su u vlasništvu ili licencirani od strane tvrtke CareDx, Inc. ili njezinih podružnica. Sva prava pridržana.

1578-LBL v02 Olerup SSP[®] HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Za *in vitro* dijagnostičku uporabu

Revidirano u rujnu 2023



Stranica 1 od 29

Za *in vitro* dijagnostičku uporabu

NAMJENA

Kompleti Olerup SSP® za tipizaciju humanog leukocitnog antigena (engl. human leukocyte antigen, HLA) kvalitativni su *in vitro* dijagnostički kompleti za tipizaciju DNK-a alela iz HLA razreda I i II. Proizvode upotrebljavaju osposobljeni stručnjaci u medicinskom okruženju u svrhu određivanja fenotipa humanog leukocitnog antigena. Izvorni materijal koji se testira je DNK.

SAŽETAK I OBJAŠNENJE

U prošlosti su se antigeni humanog leukocita (HLA) određivali testom citotoksičnosti na limfocitima. Međutim, ovaj je test zamijenjen tehnikama tipizacije DNK na temelju lančane reakcije polimerazom (PCR) zbog njegove stope pogrešaka i nedostatka razlučivosti razine alela. U većini tehnika temeljenih na PCR-u, postupak PCR upotrebljava se samo kao korak umnažanja potrebnog ciljnog DNK te je potreban korak nakon umnažanja za diskriminaciju različitih alela. Za razliku od toga, u PCR-SSP metodi (početnica specifičnih sekvenci engl. *sequence-specific primer*, SSP), diskriminacija između različitih alela odvija se tijekom PCR postupka. To skraćuje i pojednostavljuje korak nakon umnažanja u jednostavni korak detekcije pomoću gel-elektroforeze. Rezultati SSP testa su ili pozitivni ili negativni, zbog čega više nije potrebno komplicirano tumačenje rezultata. Osim toga, razlučivost tipizacije PCR-SSP-a veća je nego za ostale tehnike tipizacije koje se temelje na PCR-u jer svaki temeljni par definira dva sekvence motiva smještena u *cisu*, tj. u istom kromosomu. Također je zahvaljujući sintetičkim svojstvima SSP reagensa poboljšana stabilnost reagensa i smanjena je varijacija od serije do serije.

NAČELO POSTUPKA

PCR-SSP metoda temelji se na načelu da termostabilna DNK polimeraza bez svojstava ispravljanja pogrešaka učinkovitije koristi potpuno ili gotovo potpuno usklađene oligonukleotidne početnice bez neusklađenosti 3' kraja u PCR reakciji od neusklađenih početnica. Temeljni parovi dizajnirani su tako da se podudaraju s pojedinačnim alelima ili skupinama alela, ovisno o stupnju potrebne rezolucije tipizacije. Uz strogo kontrolirane PCR uvjete, podudarni ili gotovo potpuno usklađeni parovi temeljnih premaza omogućuju pojačanje, tj. Pozitivan rezultat, dok neusklađeni parovi temeljnih premaza ne dopuštaju pojačanje, tj. Negativan rezultat.

Nakon PCR procesa, amplificirani fragmenti DNA odvojeni su veličinom, npr. elektroforezom agaroznog gela, vizualizirani bojenjem etidijevim bromidom i izlaganjem ultraljubičastom svjetlu, dokumentirani fotografijom i tumačenjem. Tumačenje rezultata PCR-SSP temelji se na prisutnosti ili odsutnosti specifičnih PCR proizvoda. Relativne veličine specifičnih PCR proizvoda mogu biti korisne u tumačenju rezultata. PCR-SSP metodologiju za HLA je izvorno opisao O. Olerup u 1991 i 1992^{1,2}.

Budući da na PCR proces mogu negativno utjecati različiti čimbenici (npr. pogreške u pipetiranju, preniska koncentracija DNK, loša kvaliteta DNK, prisutnost PCR inhibitora, netočnost toplinskog ciklera), u svaku PCR reakciju uključen je par početnica interne pozitivne kontrole². Interna pozitivna kontrola para početnica odgovara očuvanim

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

regijama ljudskog hormona rasta gena, koji je prisutan u svim uzorcima ljudske DNK. U prisutnosti specifičnog PCR produkta HLA alela, proizvod unutarnjeg pozitivnog kontrolnog pojasa može biti slab ili odsutan. Amplikoni generirani specifičnim parovima prajmera HLA kraći su od amplikona unutarnjeg pozitivnog kontrolnog primera, ali veći od neinkorporiranih početnica (vidi Očekivane vrijednosti).

REAGENSI

A. Identifikacija

Olerup SSP® kompleti za tipizaciju sadrže osušene, unaprijed optimizirane početnice specifične za sekvenciju za PCR pojačavanje HLA alela i gena ljudskog hormona rasta, PCR Master Mix uključujući Taq polimerazu ("Master Mix") i ljepljive PCR brtve.

Temeljne otopine prethodno su alicitirane i osušene u 0,2 ml jažice rezanih, tankih stjenki PCR plitica. Svaka jažica ladice sadrži osušenu otopinu početnice koja se sastoji od specifične mješavine početnica, tj. HLA početnica specifičnih za alel i grupu, kao i para početnica s unutarnjom pozitivnom kontrolom koji odgovaraju ne-alelnim sekvencama i spremni su za dodavanje uzorka DNK, Master Mix i H₂O.

Temeljni premazi su dizajnirani za optimalno PCR pojačanje pri korištenju Master Mix i preporučenog programa DNK ciklusa (vidi Programiranje termociklera).

Tablice specifičnih specifičnosti i interpretacije ili radni list za specifične HLA alele pojačane svakom mješavinom temeljnih premaza mogu se preuzeti s web stranice www.caredx.com.

B. Upozorenja i mjere opreza

1. Za *in vitro* dijagnostičku uporabu.
2. Ovaj se proizvod ne može koristiti kao jedina osnova za donošenje kliničke odluke.
3. Upozorenje na biohazard: Sve krvne proizvode treba tretirati kao potencijalno infektivne. Nijedna poznata metoda ispitivanja ne može pružiti jamstvo da proizvodi dobiveni iz ljudske krvi neće prenositi infektivne agense.
4. Upozorenje na biohazard: Etidijev bromid koji se koristi za bojenje DNA u elektroforezi agaroznog gela je kancerogen. Ručka s odgovarajućom osobnom zaštitnom opremom.
5. Oprez: Nosite zaštitu za oči koja blokira UV zračenje i ne pregledajte izvor UV svjetlosti izravno prilikom gledanja ili fotografiranja gelova.
6. Pipete i druga oprema koja se koristi za manipulacije **nakon** PCR-a **ne smiju** se koristiti za manipulacije **prije** PCR-a.
7. Za detaljne informacije pogledajte Sigurnosni list (www.caredx.com).

C. Upute za uporabu

Pogledajte Upute za uporabu.

D. Upute za pohranu

Komponente kompleta čuvajte u mraku i na temperaturama navedenim na naljepnicama pakiranja.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Koristite prije isteka roka valjanosti otisnutog na naljepnicama pakiranja.

E: Pročišćavanje ili liječenje potrebno za uporabu

Pogledajte Upute za uporabu.

F. Indikacije nestabilnosti

1. Nemojte koristiti klice s pukotinama u bunarima ili oštećenja gornjeg ruba bunara jer to može uzrokovati isparavanje tijekom PCR pojačanja. Nemojte koristiti PCR trake s pukotinama jer to može prouzročiti isparavanje tijekom PCR pojačanja.
2. Peleti u bušotinama trebaju biti crvene boje. Žuta promjena boje peleta može ukazivati na degradaciju.
3. Master Mix bi trebao biti crvene do ljubičaste boje. Žuta do narančasta promjena boje može ukazivati na degradaciju.

ZAHTJEVI ZA INSTRUMENTE**A. Instrument**

Treba koristiti termocikler sa sljedećim minimalnim specifikacijama:

- grijani poklopac s temperaturom od 104° C za rad bez ulja
- blok uzorka (aluminij, srebro ili pozlaćeno srebro) za uporabu s PCR pločom od 96 jažica ili reakcijskim epruvetama s tankim stjenkama od 0,2 ml
- Olerup SSP setovi su potvrđeni na sljedećim ciklerima.
Preporučene stope ubrzanja:
 - GeneAmp 9700: GeneAmp 9700 cikler postavljen na način rada 9600. To odgovara stopi ubrzanja **uzorka** od 1,6° C/s gore i 0,8° C/s dolje.
 - ProFlex 1x96 i blok: ProFlex PCR cikler sa stopom ubrzanja bloka od 3,0° C/s (svaki korak 3.0°C/s). **Stopa ubrzanja bloka** od 3,0° C/s odgovara brzini stope ubrzanja uzorka od 1,52° C/s gore i 1,36° C/s dolje.
 - ProFlex 2x96 i blok: ProFlex PCR cikler sa stopom ubrzanja bloka od 3,0° C/s (svaki korak 3.0°C/s). **Stopa ubrzanja bloka** od 3,0° C/s odgovara stopi ubrzanja uzorka od 1,9° C/s gore i 1,6° C/s dolje.

Napomena: Veće stope ubrzanja od gore opisanih mogu utjecati na rezultate tipizacije. Također imajte na umu da se učinak na tipizaciju može razlikovati između različitih nevalidiranih ciklera ovisno o postavkama.

temperaturni raspon od 4,0° C do 99,9° C

- točnost temperature od ± 0,25° C u rasponu od 35° C do 99,9° C
- ujednačenost temperature bloka uzorka ≤0,75° C u rasponu od 55° C do 95° C
- kalibracija temperature koja se može pratiti prema referentnom standardu (tj. NIST)

Programirajte termocikler pomoću PCR parametara ciklera u odjeljku B u nastavku.

Za specifične informacije o termocikleru pogledajte korisnički priručnik proizvođača. Termociklere treba kalibrirati prema pravilima akreditacije ASHI (Američko društvo za histokompatibilnost i imunogenetiku) ili EFI (Europska federacija imunogenetike).

Programirajte termocikler prije pokretanja Upute za uporabu opisane u nastavku.

B. Parametri PCR ciklusa

1.	1 ciklus	94 °C	2 min	denaturacija
2.	10 ciklusa	94 °C	10 s	denaturacija
		65 °C	60 s	žarenje i proširenje
3.	20 ciklusa	94 °C	10 s	denaturacija
		61 °C	50 s	žarenje
		72°C	30 s	nastavak
4.	Kraj - držite	RT		ako je manje od 8 sati
		4°C		ako je duže od 8 sati

Ukupni volumen reakcije u svakoj jažici, 10 µl .

Isti PCR parametri ciklusa koriste se za sve komplete Olerup SSP® .

PRIKUPLJANJE I PRIPREMA UZORAKA

Ekstrahirana, visoko čista DNK potrebna je za SSP tipizaciju. DNK uzorke koji će se koristiti za PCR-SSP HLA tipizaciju treba ponovno suspendirati u dH₂O. Omjer A_{260/280} trebao bi biti 1.6 - 2.0 pomoću UV spektrofotometrije za optimalnu vizualizaciju opsega tijekom elektroforeze.

Preporučujemo automatsku ekstrakciju DNK pomoću QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. ACD krv treba koristiti kao polazni materijal.

Alternativno, DNK se može ekstrahirati bilo kojom poželjnom metodom koja daje čistu DNK. Kada se koriste alternativne metode, koncentraciju DNA treba podesiti na 30 ng/µl. **Nemojte primjenjivati hepariniziranu krv ovim metodama.**

Preporučena koncentracija DNA pomoću:

EZ1 ekstrahirana DNK, 15 ng/µl.

DNK ekstrahirana drugim metodama, 30 ng/µl.

Koncentracije veće od 50 ng/µl povećat će rizik za nespecifična pojačanja i slabe dodatne opsege, posebno za SSP tipizaciju visoke rezolucije HLA klase I. Ako je potrebno, razrijedite izvađenu DNA u dH₂O.

Uzorci DNK ne smiju se ponovno suspendirati u otopinama koje sadrže kelatne agense kao što je EDTA, koncentracija iznad 0,5 mM.

Uzorci DNK mogu se upotrijebiti odmah nakon ekstrakcije ili čuvati na +4°C do 2 tjedna bez štetnih učinaka na rezultate. Uzorci DNK mogu se pohraniti na -20°C ili hladnije na 9 mjeseci. Čistoću i koncentraciju ekstrahiranih uzoraka DNK koji su pohranjeni dulje vrijeme treba testirati na prihvatljivost prije HLA tipiziranja.

Uzorci DNK trebaju biti isporučeni na +4°C ili hladnije kako bi se očuvao njihov integritet tijekom transporta.

POSTUPAK**A. Materijali pod uvjetom**

1. Olerup SSP® plitice s početnicom.
2. Master Mix (odgovarajući volumen za plitice kompleta). Isti Master Mix koristi se za sve Olerup SSP® komplete.
3. Ljepljive PCR brtve (odgovarajući broj za ladice kompleta).

B. Materijali potrebni, ali nisu predviđeni

1. Komplet/oprema za izolaciju DNK
2. UV spektrofotometar
3. Uređaji za pipetiranje. Preporučujemo elektronički jednokanalni dozator sposoban za izdavanje 10 µl alikvota za dodavanje mješavine DNA-Master Mix-DH₂O u bušotine ladice.
4. Jednokratni nastavci za pipete
5. Polipropilenske epruvete
6. Vortex miješalica
7. Mikrocentrifuga
8. Stalak za PCR ladicu
9. Termocikler s grijanim poklopcem za PCR formata 96 jažica, temperaturnim gradijentom preko grijaćeg bloka ≤ 0,75° C i ladicom/držačem za 0,2 ml tankoslojne reakcijske bušotine
10. Mikrovalna pećnica ili grijaća ploča za grijanje otopina agaroze
11. Agarosa stupnja 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. Etidij bromid kapaljka boca br. Proizvoda 103.301-10 ili GelRed kapaljka boca, br. Proizvoda 103.302-05
14. Uređaj za pipetiranje s gelom. Preporučujemo 8-kanalnu pipetu za punjenje gela, 5-25 µl podesivi volumen
15. Oznaka veličine DNK za pokrivanje raspona od 50 - 1 000 bp, npr. 100 ljestvica baznih parova, oznaka veličine DNK br. 103.202-100 ili marker veličine DNA za kratke cikluse gelova 103.203-100
16. Uređaj za elektroforezu/napajanje
17. UV transiluminator
18. Sustav fotografske ili slikovne dokumentacije

C Postupak korak po korak

Pogledajte Upute za uporabu.

UPUTE ZA UPORABU**A. Priprema uzorka**

1. Pročistite genomsku DNK iz uzorka leukocita metodom izbora, vidi Zbirka i priprema uzoraka gore.
2. Za konkretne informacije o pripremi i skladištenju uzoraka, vidi Prikupljanje i priprema uzoraka gore.
3. Izvođenje PCR amplifikacije na pročišćenog uzorka DNK uz pomoć *Olerup SSP®* plitice za tipizaciju ili pohraniti DNK uzorak dok ne bude spreman za tipizaciju.

B. Priprema reagenta/opreme

1. Programirajte termocikler za pokretanje *Olerup SSP®* PCR programa, pogledajte Zahtjevi za instrumente - PCR parametri ciklusa u prethodnom tekstu.
2. Pripremite gel za elektroforezu, pogledajte dio C —**Priprema gel elektroforeze** u nastavku.

C. Priprema gel elektroforeze

Za *Olerup SSP®* gel sustav 96 (broj proizvoda 103.101-01)

1. Postavljanje
 - Izravnajte komoru za lijevanje za 1 gel (br. Proizvoda 103.101-31) ili komoru za lijevanje za 3 gela (br. Proizvoda 103.101-33) pomoću mjehurića za izravnavanje i tri noge podesive visine.
 - Stavite ladicu (e) za gel u komoru za lijevanje.
2. 2% (w/v) Priprema gela Agarozu
Upotrijebite visokokvalitetnu agarozu za elektroforezu, sposobnu za rješavanje 50 — 2 000 fragmenata baznog para DNK.
 - U 5 ml 10 x TBE (Tris Borate EDTA) pufera dodajte 150 ml destilirane vode i 2 g agaroze u staklenu bocu od 500 ml.
 - Otopiti agarozu kuhanjem u mikrovalnoj pećnici sve dok se ne formira homogena otopina od 100 ml.
 - Ostavite otopljenu otopinu gela da se ohladi na 60°C, npr. u grijaćem ormaru.
 - Obojite gel prije lijevanja etidijevim bromidom (10 mg/ml), 5 µlna 100 ml otopine gela. Za maksimalnu jednostavnost rukovanja koristite naše boce s kapaljkom etidijevog bromida (br. Proizvoda 103.301-10). **Napomena: Etidijev bromid je kancerogen. Ručka s odgovarajućom osobnom zaštitnom opremom.**
 - Ulijte 100 ml otopine gela u posudu za gel u komori za lijevanje. Stavite 6 gelnih češljeva (br. Proizvoda 103.101-21) u utore ladice za gel.
 - Dopustite da se gel postavi 15 minuta.
 - Ulijte 750 ml 0,5 x TBE pufera u spremnik s gelom. Uronite ladicu za gel u kutiju s gelom i pažljivo uklonite 6 gelnih češlja podižući ih prema gore.

Slijedite upute proizvođača za uporabu pri korištenju alternativnih sustava elektroforeze. Da bi se koristili s *Olerup SSP®* HLA setovima za tipizaciju, ovi sustavi moraju biti sposobni rješavati PCR proizvode veličine od 50 do 1100 baznih parova.

D. Postupni postupak

1. Ukloniti iz naznačene temperature skladištenja: odgovarajući broj uzoraka DNK, plitica (plitice) za početnice, volumen Master Mix potreban za odabrane uzorke/posude za početnice. Odmrzavanje na sobnoj temperaturi (20 do 25°C).

Isti Master Mix koristi se za sve Olerup SSP® komplete.

2. Kratko izmiješajte uzorke DNK miješanjem.
3. Stavite ladicu (e) za temeljni premaz u stalak za PCR ladicu.
4. **Kompleti niske i visoke rezolucije**
 - Promiješajte miješalicom Master Mix prije uzimanja alikvota.
 - Koristeći ručnu jednokanalnu pipetu, dodajte Master Mix na sobnoj temperatur i dH₂O u epruvetu od 0,5 ml ili 1,5 ml. (Za odgovarajuće iznose vidjeti tablicu 1. u nastavku.)
 - Zatvorite cijev i miješalicu 5 sekundi. Impulsirajte cijev u mikrocentrifugi kako biste spustili svu tekućinu sa strane cijevi.
 - Koristeći ručnu jednokanalnu pipetu, dodajte 8 µl smjese Master Mix — dH₂O i 2 µl dH₂O u negativnu kontrolnu jažicu, tj. jažicu s negativnim kontrolnim početnicama, ladice za temeljni premaz.
 - Pomoću ručne jednokanalne pipete dodajte uzorak DNK na sobnoj temperaturi u preostalu smjesu Master Mix — dH₂O. (Za odgovarajuće iznose vidjeti tablicu 1. u nastavku.)
 - Zatvorite cijev i miješalicu 5 sekundi. Impulsirajte cijev u mikrocentrifugi kako biste spustili svu tekućinu sa strane cijevi.
 - Korištenje elektroničkog jednokanalnog raspršivača alikvota 10 µl reakcijske smjese uzorka u svaku jažicu, osim negativne kontrolne bušotine, ladice za početnicu.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Tablica 1: Volumeni komponenti potrebnih po testu za različit broj bušotina pri korištenju Master Mix.

Broj jažica po testu	Volumen Master Mixa (µl)	Volumen uzorka DNK (µl)	Volumen dH ₂ O (µl)	Broj jažica po testu	Volumen Master Mixa (µl)	Volumen uzorka DNK (µl)	Volumen dH ₂ O (µl)
2	12	8	20	25	87	58	145
3	15	10	25	26	90	60	150
4	18	12	30	27	93	62	155
5	21	14	35	28	96	64	160
6	24	16	40	29	99	66	165
7	27	18	45	30	102	68	170
8	30	20	50	31	105	70	175
9	33	22	55	32	108	72	180
10	36	24	60	36	126	84	210
11	39	26	65	40	138	92	230
12	42	28	70	44	150	100	250
13	45	30	75	48	162	108	270
14	48	32	80	52	174	116	290
15	51	34	85	56	186	124	310
16	54	36	90	60	198	132	330
17	60	40	100	64	210	140	350
18	63	42	105	68	228	152	380
19	66	44	110	72	240	160	400
20	69	46	115	76	252	168	420
21	72	48	120	80	264	176	440
22	75	50	125	84	276	184	460
23	78	52	130	88	288	192	480
24	81	54	135	92	300	200	500
				96	312	208	520

Gore navedeni preporučeni volumeni uključuju volumen za kompenzaciju varijacija pipete i gubitke tekućine na unutarnjim stjenkama epruvete.

5. Kombinirani kompleti A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ i DQA-DQB-DR Enhanced i HLA-C visoke rezolucije za komplete čestih alela

- Promiješajte Master Mix.
- Koristeći ručnu jednokanalnu pipetu, dodajte na sobnoj temperaturi 520 µl dH₂O u priloženu epruvetu od 1,5 ml koja sadrži 312 µl Master Mixa.
- Zatvorite cijev i miješalicu 5 sekundi. Impulsirajte cijev u mikrocentrifugi kako biste spustili svu tekućinu sa strane epruvete.
- Koristeći ručnu jednokanalnu pipetu, dodajte 8 µl smjese Master Mix i 2 µl dH₂O u jažicu s negativnom kontrolom, tj. jažicu s parovima početnica za negativnu kontrolu.
- Pomoću ručne jednokanalne pipete dodajte uzorak od 206 µl DNK na sobnoj temperaturi u preostalu smjesu Master Mix — dH₂O.
- Zatvorite cijev i miješalicu 5 sekundi. Impulsirajte cijev u mikrocentrifugi kako biste spustili svu tekućinu sa strane epruvete.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

- Koristeći elektronički jednokanalni raspršivač alikvotirajte 10 µl reakcijske smjese uzorka u svaku jažicu, osim negativne kontrolne jažice br. 96 plitice za početnicu.

Važno:

Obavezno nanosite uzorak iznad temeljnih premaza (osušen na dnu svake plitice za jažicu) kako biste izbjegli križnu kontaminaciju između jažica. Dodirnite unutarnju stjenku jažice vrškom pipete kako biste omogućili da uzorak klizi prema dolje do dna bušotine. Provjerite jesu li svi uzorci pali na dno svake jažice. Ako ne, lagano dodirnite ladicu na vrhu klupe kako bi se svi uzorci smjestili na dnu jažice prije nego što započnete PCR.

6. Pokrijte plitice za početnicu priloženim ljepljivim PCR brtvama. Provjerite jesu li sve reakcijske jažice potpuno pokrivena kako bi se spriječio gubitak isparavanja tijekom pojačanja PCR-a. Kompresijska podloga Olerup SSP® (br. Proizvoda 103.505-06) može se nanijeti naljepljive PCR brtve kako bi se spriječilo isparavanje tijekom toplinskog ciklusa.
7. Postavite ladicu (e) za temeljni premaz u termocikler odgovarajućim adapterom za cijevnu ladicu. Ne dopustite više od 5 minuta kašnjenja između postavljanja PCR-a i termičkog ciklusa.
8. Unesite svoj broj programa Olerup^{SSP®}. Navedite reakcijski volumen od 10 µl.
9. Pokrenite PCR program. Program traje oko 1 sat i 20 minuta.
10. Izvadite pliticu(e) početnice iz termociklera. Pregledajte ladicu za PCR kako biste bili sigurni da postoji približno isti volumen tekućine u svakoj PCR jažici. Elektroforeza uzorke, pogledajte odjeljak E - gel elektroforeza ispod. Tumačenje rezultata tipizacije uz pomoć **tablica tumačenja i specifičnosti specifičnih za seriju ili radnog lista**, pogledajte Očekivane vrijednosti u nastavku.

E. Gel elektroforeza

1. Nakon završetka PCR reakcije orijentirati pliticu za početnicu i gel kutiju. Redoslijed jažica je s lijeva na desno i odozgo prema dolje.
2. Nježno uklonite poklopce trake bez prskanja PCR proizvoda.
3. Učitajte PCR proizvode u nizu na 2% agaroznog gela. (Nije potrebno dodavanje pufera za punjenje gela.) Preporučuje se upotreba 8-kanalne pipete za punjenje gelom.
4. Učitajte marker veličine DNK (ljestve od 100 baznih parova, oznaka veličine DNK br. 103.202-100 ili marker veličine DNA za kratke tragove gela 103.203-100) u jednu jažicu po redu.
5. Pokrijte kutiju s gelom s poklopcem kutije za gel.
6. Elektroforezirajte gel u 0,5 x TBE puferu, bez ponovne cirkulacije pufera, 15-20 minuta pri 8-10 V/cm.
7. Prebacite gel ladicu s gelom na UV transiluminator.
8. Fotografirajte gel sa ili bez plitice za gel.
9. Označite fotografiju prema pravilima laboratorija.

KONTROLA KVALITETE

Smjernice za ispitivanje ASHI HLA pokazuju da se negativna bušotina za kontrolu kontaminacije mora uključiti u svako podešavanje PCR-a. (Revidirani standardi za akreditirane laboratorije, Američko društvo za histokompatibilnost i imunogenetiku, odobreno od strane CMS-a: 16. veljače 2021.). Jažica s negativnom kontrolom uključena je u sve komplete, osim HLA-B* 27 — jedinične doze i jažice za pojedinačne komplete HLA-B* 27

Pogledajte Tumačenja gela na stranici 14.

REZULTATI

Za seriju specifičnim listovima za provjeru valjanosti stanične linije i potvrdi o analizi može se pristupiti mrežno na www.caredx.com.

OGRANIČENJA POSTUPKA

1. Proces PCR-SSP zahtijeva visoko kontrolirane uvjete ispitivanja kako bi se osiguralo odgovarajuće diskriminirajuće pojačanje. Postupak opisan u uputama za uporabu mora se strogo pridržavati.
2. Ekstrahirani uzorak DNK je predložak za specifični PCR proces amplifikacije. Pročišćena DNA trebala bi imati omjer $A_{260/280}$ između 1,6 i 2,0 kako bi se dobila optimalna vizualizacija pojasa elektroforezom.
3. Svi instrumenti, npr. termocikler, uređaji za pipetiranje, moraju se kalibrirati prema preporukama proizvođača.
4. Informacije specifične za seriju navedene su u Uputi o proizvodu: Informacije specifične za seriju navedene su i u zapisima o seriji.
5. Na temelju provedenih ispitivanja, sljedeće tvari procijenjene su s tri (3) metode ekstrakcije u navedenim koncentracijama i utvrđeno je da ne utječu na performanse ispitivanja.

Metoda ekstrakcije	Interferirajuća supstancija	Koncentracija interferenta*
EZ1 DSP DNA krvni sustav	Bilirubin	200mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Trigliceridi	30g/L
	Protein	110g/L
QIAamp DSP DNA krvni sustav	Bilirubin	200mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Trigliceridi	18,2 g/L
	Protein	77 - 96g/L
Gentra PureGene metoda	Bilirubin	200mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Trigliceridi	18,2 g/L
	Protein	119 -146g/L

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

6. PCR pločice su fizički kompatibilne s većinom termociklera na tržištu. Pogledajte kompatibilnost termociklera plastike u nastavku.
Napomena: Tablica je namijenjena samo kao vodič. Za validirane ciklere pogledajte odjeljak Zahtjevi za instrumente — Instrument.

Tablica kompatibilnosti	
Proizvođač	Termocikler
Primijenjeni biosustavi	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-jažica
	ProFlex 2x96-jažica
	Veriti 0.2ml 96 i blok
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradijent ciklera
Biometra	Uno, Uno II
	T1 termocikler
	Tgradient/tAdvanced
	TRobot
	TProfessional
Bio-Rad	MJ Mini
	T100
	Icycler, MyCycler
	C1000, S1000
	PTC-2(xx) PTC-100 s blokom od 96 jažica
Eppendorf	Mastercycler gradijent
	Mastercycler EP gradijent, 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 sustav i MBS
	Omnigene, Omn-E
Gene Technologies	GS1, GS4, GSX
Takara	TP 3000

OČEKIVANE VRIJEDNOSTI










A. Analiza podataka

Pažljivo pregledajte fotografiju gela i odredite pozitivne trake.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

1. Brži migrirajući, kraći pojas će se vidjeti u traci gela ako se pojačaju specifični HLA aleli. To ukazuje na pozitivan rezultat testa.
 - a. Zabilježite prisutnost i odsutnost specifičnih PCR proizvoda.
 - b. Korisno je pratiti relativne duljine specifičnih PCR proizvoda kako je navedeno u lot-specifičnim umetcima proizvoda prilikom tumačenja rezultata gela. Nekoliko traka ima dvije ili više mogućih duljina specifičnih PCR proizvoda. Te jažice sadrže više parova početnica koji generiraju PCR proizvode različitih veličina, ovisno o HLA alelima uzorka DNK.
 - c. Uskladite uzorak gel traka sa specifičnim PCR proizvodima s informacijama u tablicama tumačenja i specifičnosti specifičnih za seriju za dobivanje HLA tipizacije DNK uzorka.
2. Unutarnja traka pozitivne kontrole, sporije migrirajući i dulja, trebala bi biti vidljiva u svim gel trakama, osim u gel traci negativne kontrole, kao kontrola uspješnog pojačanja. Traka unutarnje pozitivne kontrole može biti slaba ili odsutna u pozitivnim gel trakama.
 - a. Zabilježite prisutnost i relativne duljine unutarnjih pozitivnih kontrolnih traka. Kontrolne trake različite veličine pomoći će u ispravnoj orijentaciji tipizacije kao i u identifikaciji kompleta.
 - b. Odsutnost interne pozitivne kontrolne trake bez specifičnog PCR proizvoda ukazuje na neuspješnu PCR reakciju.
 - i. Ako se HLA aleli mogu odrediti u prisutnosti neuspjelih PCR reakcija (e) i neuspjele PCR reakcije (e) ne mijenjaju zadatak alela, tada se test ne mora ponoviti.
 - ii. Ako bi, međutim, neuspjele PCR reakcije (e) mogle promijeniti dodjelu alela HLA, tada se tipizacija mora ponoviti.
3. Prisutnost specifičnog PCR proizvoda ili unutarnjeg pozitivnog kontrolnog pojasa u negativnim kontrolnim trakama ukazuje na onečišćenje PCR proizvodom/proizvodima i poništava sve rezultate ispitivanja. U negativnim kontrolnim trakama mogu se uočiti temeljni oligomeri veličine od 40 do 60 baznih parova. To ne predstavlja onečišćenje.

B. Tumačenje gela

	Pozitivna reakcija	Negativna reakcija	Neuspjela PCR reakcija
Jažica			
Traka za unutarnju pozitivnu kontrolu			
Specifična traka			
Traka početnice			

1. Oznaka veličine DNK (ljestve 100 baznih parova, oznaka veličine DNA br. 103.202-100 ili oznaka veličine DNA za kratke tragove gela 103.203-100) treba izvoditi u jednom bunaru po redu gela ili prema lokalnim laboratorijskim smjernicama za akreditaciju.
2. Mogu se dobiti trake dulje od unutarnje kontrolne pozitivne trake, a njih treba zanemariti u tumačenju rezultata tipizacije.
3. Neiskorišteni početnice će formirati difuznu traku kraće trake 50 baznih parova.
4. Može se primijetiti temeljni oligomer artefakti. Oni su duži od temeljnog pojasa, ali kraći od određenih bendova.

SPECIFIČNE KARAKTERISTIKE PERFORMANSI

Komplet za kontrolu kvalitete

Svaka temeljna otopina ispituje se na ploči od 48 uzoraka DNK iz dobro okarakteriziranih staničnih linija IHWC-a, vidi listove specifične za seriju za provjeru valjanosti stanične linije u uputi za proizvod, informacije specifične za seriju.

Studija usporedbe metoda 1

Ovo je multi-centrična studija vrednovanja sporazuma Olerup SSP® DR niske rezolucije HLA kompleta za tipizaciju i One Lambda Micro SSP™ HLA DNK plitice za tipizaciju u tri klinička laboratorija u Sjedinjenim Državama.

Analizirani rezultati tipizacije Olerup SSP® DR niske rezolucije HLA kompleta za tipizaciju i One Lambda Micro SSP™ HLA DNK plitice za tipizaciju pokazali su 98,4% (123/125; 95% CI: 94,3 — 99,8) sporazum kada se dva dvosmislena Olerup rezultata tretiraju kao neskladan. Sporazum je bio 100% (123/123; 95% CI: 97,1

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

— 100) kada Olerup dvosmisleni rezultati nisu bili uključeni u analizu, a kao odraz normalne kliničke prakse.

Studija usporedbe metoda 2

Ova studija je osmišljena da pokaže suglasnost s rezultatima tipizacije niske razlučivosti HLA alela (A, B, C, DQ) dobivenih ispitivanim kompletima za tipizaciju Olerup SSP® HLA i referentnim One Lambda LabType SSO kompletima. ACD uzorci pune krvi prikupljeni su od 95 ispitanika raspoređenih na 3 klinička mjesta u Sjedinjenim Državama. Izvedena je ekstrakcija DNK, a dobivena pročišćena DNK testirana je ispitivanim Olerup SSP® i referentnim One Lambda LabType SSO HLA metodama.

Ukupni dogovor za alele klase I iznosio je 99,6% (278/279; 95% CI: 98,0 - 100). Za alele klase II sporazum je bio 100% (94/94; 95% CI: 96,2 – 100).

Tablica 1
Ukupna suglasnost rezultata Olerup SSP® i
OneLambda SSO za alele klase I i klase II.

HLA Locus	Ukupno	
	nije dostupno	% sporazuma (95% CI)
A	95/95	100 (96,2 – 100%)
B	90 / 90	100 (96,0 – 100)
C	93/94	98,9 (94,2 – 100)
Svi lokusi klase I	278/279	99,6 (98,0 – 100)
Lokusi klase II (DQ)	94/94	100 (96,2 – 100%)

Studija ponovljivosti rezultata kompleta.

Ova studija usporedila je rezultate Olerup SSP® HLA tipizacije između tri laboratorija za testiranje HLA pomoću ploče od 10 dobro okarakteriziranih uzoraka DNK čiji su rezultati konsenzusa uključeni u UCLA HLA DNK banku za HLA klasu I (A, B i C), zajedničke alele klase II (DRB1*, DRB3*/DRB 4*/DRB5* i DQB1*) i rjeđe ispitivani aleli klase II (DQA1*, DPA1* i DPB1*).

Tablica 2: Sažeti opis Rezultati studije ponovljivosti kompleta Olerup SSPHLA

Tip alela HLA	Točnost tipizacije% nije dostupno 95% pouz. Interval (LL, UL)	
	<i>Dvosmislen rezultat tretira kao neskladan</i>	<i>Dvosmisleni rezultat tretiran kao neodređen i isključen iz analize</i>
<i>Klasa I Niska razlučivost (A i B kombinirani)</i>	98,3 (59/60) 91,1, 100	100 (59/59) 93,9, 100
<i>Klasa I visoke rezolucije (A, B i C kombinirani)</i>	94,7 (142/150) 89,8, 97,7	98,6 (142/144) 95,1, 99,8
<i>Klasa II niske rezolucije (DRB1* i DRB3*/DRB4*/DRB5*)</i>	100 (60/60) 94,0, 100	100 (60/60) 94,0, 100
<i>Klasa II visoke rezolucije - Zajednički aleli (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* i DQB1*)</i>	98,3 (118/120) 94,1, 99,8	100 (118/118) 96,9, 100
<i>Klasa II visoke rezolucije Rjeđe ispitivani aleli (DQA1*, DPA1* i DPB1*)</i>	83,3 (75/90) 74,0, 90,4	86,2 (75/87) 77,2, 92,7

Ova studija koristila je ploču od deset (10) uzoraka DNK s dobro okarakteriziranim rezultatima tipkanja HLA.

Niži sporazumi uočeni za rjeđe ispitivane alele klase II visoke rezolucije odražavaju veću nesigurnost u "rezultatima konsenzusa" uzoraka DNK UCLA uzimajući u obzir informacije o nepotpunom slijedu informacija dostupnih za alele DQA1*, DPA1* i DPB1*. Za 9 od 11 neskladnih rezultata opaženih tijekom ispitivanja obnovljivosti (poziv DQA1*0505 od strane Olerup SSP® vs. DQA1* 0501 "konsenzusna tipizacija") sva tri mjesta za testiranje stigla su do istog rezultata što ukazuje na dosljednu izvedbu kompleta Olerup DQA1*.

BIBLIOGRAFIJA

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. Trenutni HLA aleli mogu se naći na www.ebi.ac.uk/imgt/hla

RJEŠAVANJE PROBLEMA

Problem	Razlog	Aktivnost
Nema pojačanja (ni pojačanje fragmenata unutarnje kontrole, niti specifičnih pojačanja).	Premala količina DNK.	Izmjerite koncentraciju DNK i provjerite je li dodana količina točna. Kontaminacija RNK može prouzročiti spektrofotometrijsko precijenjenje koncentracije DNK. Ponovite ekstrakciju DNK pažljivo sa svježe pripremljenim otopinama. Preporučujemo automatsku ekstrakciju DNK pomoću QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA sadrži PCR inhibitore, npr. proteine, etanol (iz koraka taloženja), preostale matrice iz proizvoda za pročišćavanje DNK krute faze.	Izmjerite kvalitetu DNK. Preporučujemo omjer A260/A280 od 1,6 - 2,0 UV spektrofotometrijom. Slijedite točno protokol ekstrakcije DNK dobavljača. Ponovno ekstrahirajte DNK. Preporučujemo automatsku ekstrakciju DNK pomoću QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNK je izvađen iz heparinizirane krvi.	Koristite nehepariniziranu krv ili upotrijebite protokole ekstrakcije DNK za hepariniziranu krv.
	DNK se otopi u puferu koji sadrži EDTA.	Ponovite ekstrakciju DNK i otopite DNK u dH ₂ O.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Problem	Razlog	Aktivnost
Nastavak: Nema pojačanja (ni pojačanje fragmenata unutarnje kontrole, niti specifičnih pojačanja).	Slučajno uvođenje izbjeljivača u test.	Pregledajte područja u kojima bi se izbjeljivač mogao uvesti.
	Kompleti se ne čuvaju na odgovarajućoj temperaturi.	Spremite komplete na -20°C.
	Toplinski cikler ne radi na pravilan način.	Kalibrirajte toplinski cikler i provjerite PCR program. Toplinski cikler koji se koristi za rutinsku PCR-SSP tipizaciju treba kalibrirati svakih 6-12 mjeseci.
	Neadekvatan kontakt između toplinskog bloka grijanja i SSP plitice za tipizaciju.	Koristite ispravnu ladicu/držač za 0,2 ml tankoslojne reakcijske bušotine, pogledajte priručnik za termalni cikler.
Slučajni neuspjeh pojačanja (ispadanja).	PCR brtve/poklopci PCR cijevi koje nisu čvrsto zatvorene dovest će do isparavanja i naknadnog kvara pojačanja.	Provjerite jesu li PCR brtve/svi poklopci čvrsto zatvoreni. Kompresijska podloga Olerup SSP® (br. Proizvoda 103.505-06) može se nanijeti na ljepljive PCR brtve kako bi se spriječilo isparavanje tijekom toplinskog ciklusa.
	Pogreške u učitavanju gela.	Provjerite je li točan broj bušotina napunjen i da svaka jažica sadrži približno isti volumen PCR smjese.
	Korištenje nekalibriranih pipeta.	Rutinski kalibrirajte sve pipete u skladu s preporukama dobavljača.
	Pogreške pipetiranja.	Pažljivije vršite pipetiranje.
	Master Mix i uzorak DNK nisu pravilno izmiješani prije upotrebe.	Prije upotrebe kratko promiješajte. Preporučujemo miješanje nakon svakog reda.
	U jažice je dodan neujednačen volumen smjese DNK- Master Mix.	Pažljivije vršite pipetiranje.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Problem	Razlog	Aktivnost
Slabi fragmenti unutarnje kontrole.	Nečista DNK.	Izmjerite kvalitetu DNK. Omjer A ₂₆₀ /A ₂₈₀ trebao bi biti od 1,6 do 2,0 UV spektrofotometrijom. Kontaminacija RNK može prouzročiti spektrofotometrijsko precijenjenje koncentracije DNK. Degradirana DNK dovodi do razmazivanja u gelnim trakama. Ponovite ekstrakciju DNK pažljivo sa svježe pripremljenim otopinama. Preporučujemo automatsku ekstrakciju DNK pomoću QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Premala količina DNK.	Izmjerite koncentraciju DNK i prilagodite se na 30 ng/μl ili na 15 ng/μl za DNK ekstrahirane QIAGEN EZ1 DSP krvnim sustavom DNK. Kontaminacija RNK može prouzročiti spektrofotometrijsko precijenjenje koncentracije DNK. Degradirana DNK dovodi do razmazivanja u gelnim trakama. Ponovite ekstrakciju DNK pažljivo sa svježe pripremljenim otopinama. Preporučujemo automatsku ekstrakciju DNK uz pomoć QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Problem	Razlog	Aktivnost
Nastavak: Slabi fragmenti unutarnje kontrole.	Previsoka temperatura žarenja, toplinski cikler nije kalibriran.	Kalibrirajte toplinski cikler i provjerite PCR program. Toplinski cikler koji se koristi za rutinsku PCR-SSP tipizaciju treba kalibrirati svakih 6-12 mjeseci.
	PCR Master Mix čuva se na +4°C dulje od 2 tjedna.	Pravilno pohranite PCR Master Mix.
Nespecifično pojačanje (ljestve ili razmazi).	Korištenje viška uzorka DNK.	Izmjerite koncentraciju DNK i prilagodite se na 30 ng/μl ili na 15 ng/μl za DNK ekstrahirane uz pomoć QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Neke otopine početnice imaju veću tendenciju stvaranja nespecifičnog pojačanja, pogledajte napomene u svakoj tablici specifičnosti specifičnoj za svaku seriju.
	Nečista DNK.	Svi fragmenti veći od fragmenta unutarnje kontrole treba zanemariti prilikom tumačenja dobivenih rezultata. Provjerite kvalitetu DNK. Ponovite ekstrakciju DNK. Preporučujemo automatsku ekstrakciju DNK pomoću QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Neke otopine početnice imaju veću tendenciju stvaranja nespecifičnog pojačanja, pogledajte napomene u svakoj tablici specifičnosti specifičnoj za svaku seriju.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Problem	Razlog	Aktivnost
Slabiji i slabiji signali pojačanja tijekom vremena.	Otopina bojenja gela etidijevog bromida agaroze je stara.	Pripremite svježiu otopinu etidijevog bromida kako biste postigli bolje bojenje agaroznog gela i bolji signal. Oblaci temeljnog premaza lako se prepoznaju je li bojenje agaroznog gela normalno.
	Jedna od UV svjetiljki je slomljena.	Provjerite opremu za UV svjetlo. Oblaci početnice lako se prepoznaju ako je UV svjetlo normalno.
	Koristi se premalo DNK uzorka.	Izmjerite koncentraciju DNK i prilagodite se na 30 ng/μl ili na 15 ng/μl za DNK ekstrahirane QIAGEN EZ1 DSP krvnim sustavom DNK.
	Previsoka temperatura žarenja, toplinski cikler nije kalibriran.	Kalibrirajte toplinski cikler i provjerite PCR program. Toplinski cikler koji se koristi za rutinsku PCR-SSP tipizaciju treba kalibrirati svakih 6-12 mjeseci.
Čudni uzorci pojačanja.	Koristi se netočna tablica/radni list specifičan za tumačenje.	Provjerite broj serije korištenog proizvoda i korišteni radni list Tablice tumačenja.
	Neispravan redoslijed u učitavanju gela.	Provjerite poravnanje mješavina i gel traka.
	Uzorak pojačanja sadrži lažno pozitivno.	Pogledajte u nastavku.
	Uzorak pojačanja sadrži lažno negativni nalaz.	Pogledajte u nastavku.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Problem	Razlog	Aktivnost
Lažno pozitivna pojačanja.	Kontaminacija DNK.	Koristite rukavice, nastavke za pipete koji sadrže barijere (čepovi za filtriranje) i odvojene prostorije za rukovanje prije PCR-a i rukovanje nakon PCR-a. Osigurajte precizno rukovanje svim uzorcima, u svim koracima. Provjerite kontaminaciju pomoću kompleta <i>Overup SSP® Wipe Test</i> .
	Nečista DNK.	Izmjerite kvalitetu DNK. Slijedite točno protokol ekstrakcije dobavljača DNK. Pokušajte s drugim sustavima za ekstrakciju DNK. Ponovno ekstrahirajte DNK. Preporučujemo automatsku ekstrakciju DNK pomoću QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Korištenje viška uzorka DNK.	Izmjerite koncentraciju DNK i prilagodite se na 30 ng/μl ili na 15 ng/μl za DNK ekstrahirane QIAGEN EZ1 DSP krvnim sustavom DNK.
	Preniska temperatura žarenja.	Kalibrirajte toplinski cikler i provjerite PCR program. Toplinski cikler koji se koristi za rutinsko PCR-SSP tipizaciju treba kalibrirati svakih 6 do 12 mjeseci.
	Opsežno kašnjenje između postavljanja PCR-a i početka termičkog ciklusa.	Prije termičkog ciklusa ne smije se dopustiti više od 5 minuta kašnjenja.
	Kašnjenje između postavljanja tipizacije	Koristite prethodno zagrijani toplinski cikler.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Problem	Razlog	Aktivnost
Nastavak: Lažno pozitivna pojačanja.	plitica u termalni cikler i početka ciklusa.	
	Korištenje viška etidijevog bromida.	Koristite preporučenu količinu etidijevog bromida.
	Neispravno tumačenje artefakta kao specifične trake.	Provjerite specifičnu tablicu tumačenja/radni list i tablicu specifičnosti za ispravnu veličinu pojasa i napomene.
	Uzorak pojačanja sadrži lažno pozitivno.	Provjerite jesu li sva specifična pojačanja ispravne veličine ili je li artefakt (preusmjeravanje, dimer početnice) pogrešno protumačen kao pojačanje.
	Neispravan redoslijed u učitavanju gela.	Provjerite poravnanje mješavina i gel traka.
Lažno negativna pojačanja.	Toplinski cikler nije pravilno kalibriran.	Kalibrirajte toplinski cikler i provjerite PCR program. Toplinski cikler koji se koristi za rutinsku PCR-SSP tipizaciju treba kalibrirati svakih 6-12 mjeseci. Ako se ne korigira ponovnim kalibracijom, ponovno upišite test s referentnim uzorkom iste specifičnosti. Ako je potvrđeno negativno, kontaktirajte korisničku podršku.
	Neispravan redoslijed u učitavanju gela.	Provjerite poravnanje mješavina i gel traka.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Problem	Razlog	Aktivnost
Ukupni problemi s gelom (zamućeni gelovi i/ili razmazane trake).	Degradirani uzorak DNK.	Pojavljuje se kao razmaz u gelnim trakama. Izolirajte DNK iz svježeg uzorka.
	Teška pruga u slučajnim jažicama.	Neravnomjerne suspenzije DNK. Provjerite je li uzorak DNK otopljen prije uzimanja alikvota. Promiješajte razrijeđeni uzorak DNK.
	PCR proizvod isplivao je iz jažice.	Pažljivo poravnajte vrhove pipete s gelnim jažicama i polako ih rasporedite.
	Pufer za elektroforezu je možda pretopao.	Pripremite novi TBE tampon. Pokrenite na nižem naponu.
	Koristi se netočan postotak agaroznog gela.	Pobrinite se da se koristi preporučeni 2% agarozni gel.
	Agarozna nije potpuno otopljena.	Ponovno kratko prokuhajte da se otopi agarozna.
	Neispravna koncentracija TBE.	Upotrijebite preporučenu koncentraciju 0,5 x TBE.
	Gelovi previše novo lijevani.	Gelovi nisu spremni za upotrebu do 15 minuta nakon lijevanja.
	Gelovi su prestari.	Nemojte bacati gelove predaleko unaprijed.
	Gel češalj koji se koristi ima previše debele utore.	Koristite tanke češljeve (4 x 1 mm).
	Plitica za gel nije UV prozirna.	Uklonite gel iz plitice za gel prije gledanja.
	Gel slika presvijetla.	Prekomjerna uporaba etidijevog bromida. Provjerite postavke fotoaparata.
	Gel slika previše tamna.	Koristite preporučenu količinu etidijevog bromida. Provjerite postavke fotoaparata.

Problem	Razlog	Aktivnost
Opći problemi s lažnim negativnim pojačanjem ili ovisnim problemima takve prirode	Postavka brzine rampe previsoka.	Olerup SSP setovi potvrđuju se pomoću GeneAmp 9700 ciklera postavljenog na način rada 9600 i ProFlex sa stopom ubrzanja od 3° C/s. Veće stope rampe od gore opisanih mogu utjecati na rezultate tipizacije.

ZAŠTITNI ZNAKOVI KORIŠTENI U OVOM DOKUMENTU/PROIZVODU

Olerup SSP® je registrirani zaštitni znak tvrtke CareDX AB.

Qiagen™ je zaštitni znak tvrtke QIAGEN.

JAMSTVO

CaredX AB jamči svoje proizvode izvornom kupcu protiv nedostataka u materijalima i izradi pod normalnom uporabom i primjenom. Jedina obveza tvrtke CaredX AB prema ovom jamstvu bit će zamjena, bez naknade, bilo kojeg proizvoda koji ne zadovoljava standarde izvedbe navedene na listu sa specifikacijama proizvoda.

Ovo jamstvo odnosi se samo na proizvode koji su obrađeni i pohranjeni u skladu s preporukama tvrtke CaredX AB i ne odnosi se na proizvode koji su bili predmet izmjene, zlouporabe ili zlouporabe.

Svi zahtjevi u okviru ovog jamstva moraju biti upućeni CaredX AB u pisanom obliku i moraju biti popraćeni kopijom računa kupca. Ovo jamstvo je umjesto svih drugih jamstava, izraženih ili podrazumijevanih, uključujući jamstva za prodaju i prikladnost za određenu svrhu. Ni u kojem slučaju CaredX AB nije odgovoran za slučajnu ili posljedičnu štetu.

Ovaj proizvod se ne smije preformulirati, prepakirati ili preprodavati u bilo kojem obliku bez pisane suglasnosti tvrtke CaredX AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švedska.

Rukovati svim uzorcima kao da mogu prenijeti bolest. Svi radovi trebaju biti izvedeni u rukavicama i odgovarajućoj zaštiti.

JAMSTVO

CaredX AB jamči da temeljni premazi u pliticama za upisivanje Olerup SSP® imaju specifičnosti navedene u radnom listu, specifičnosti specifičnoj za svaku seriju i Tablicama tumačenja upute o proizvodu.

ADRESE:

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu

Proizvođač:

CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švedska

Tel: +46-8-508 939 00

Faks: +46-8-717 88 18

E-pošta: orders-se@caredx.com

Mrežno mjesto: www.caredx.com

Distribuirana:

CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švedska

Tel: +46-8-508 939 00

Faks: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Mrežno mjesto: 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

Mrežno mjesto: www.caredx.com

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

Tel: +61 8 9336 4212

E-pošta: orders-aus@caredx.com

Mrežno mjesto: www.caredx.com

Ovlašteni zastupnik:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Za informacije o distributerima CaredX širom svijeta obratite se CaredX AB.

1578-LBL v02 je preveden s English master 0192-LBL v07 Olerup SSP® HLA kompleta za tipizaciju uključujući Taq polimerazu.

Promjene u reviziji 0192-LBL v07 u usporedbi s 0192-LBL v06:

1. Dodan švicarski ovlašteni zastupnik.
2. Dodan GelRed na odjeljak B. Materijali potrebni, ali nisu predviđeni.

Upute za uporabu
Olerup SSP® HLA kompleti za tipizaciju uključujući Taq polimerazu