



Návod k použití

Olerup SSP[®] včetně Taq polymerázy

© 2023 CareDx, Inc. Všechny servisní značky nebo ochranné známky jsou vlastněny nebo licencovány společností CareDx, Inc. nebo jejími přidruženými společnostmi. Všechna práva vyhrazena.

1575-LBL v02 Olerup SSP[®] HLA psací sady včetně Taq polymerázy

Pro diagnostické použití *In Vitro*

Revidováno září 2023



Strana 1 ze 28

K diagnostickému použití *in vitro*

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Olerup SSP® HLA Typing Kits jsou kvalitativní diagnostické soupravy *in vitro* pro typování DNA alel HLA třídy I a HLA třídy II. Výrobky jsou používány vyškolenými odborníky v lékařském prostředí za účelem stanovení fenotypu HLA. Testovaným zdrojovým materiálem je DNA.

SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Lidské leukocytární antigeny (HLA) se dříve stanovovaly pomocí testu lymfocytotoxicity. Tento test však byl nahrazen technikou typizace DNA založenou na polymerázové řetězové reakci (PCR) z důvodu chybovosti a nedostatečné rozlišovací schopnosti na úrovni alel. Ve většině technik založených na PCR se proces PCR používá pouze jako krok amplifikace potřebné cílové DNA a k rozlišení různých alel je nutný postamplifikační krok. Naproti tomu v metodice PCR-SSP (sekvenčně specifický primer - SSP) dochází k rozlišení různých alel během procesu PCR. To zkracuje a zjednodušuje postamplifikační krok na jednoduchý krok detekce gelovou elektroforézou. Výsledky testu SSP jsou buď pozitivní, nebo negativní, čímž odpadá nutnost složité interpretace výsledků. Kromě toho je rozlišení typizace PCR-SSP vyšší než u jiných typizačních technik založených na PCR, protože každý pár primerů definuje dva sekvenční motivy umístěné *in cis*, tj. na stejném chromozomu. Kromě toho se díky syntetické povaze činidel SSP zlepšila stabilita a snížily se odchylky mezi jednotlivými šaržemi.

ZÁSADA POSTUPU

Metodika PCR-SSP je založena na principu, že zcela nebo téměř zcela shodné oligonukleotidové primery bez 3'-koncových neshod jsou v PCR reakci využívány účinněji než neshodné primery termostabilními DNA polymerázami bez vlastností proof-readingu. Páry primerů jsou navrženy tak, aby byly spárovány s jednotlivými alelami nebo skupinami alel v závislosti na požadovaném stupni rozlišení typizace. Při přísně kontrolovaných podmínkách PCR umožňují shodné nebo téměř zcela shodné páry primerů amplifikaci, tj. pozitivní výsledek, zatímco neshodné páry primerů neumožňují amplifikaci, tj. negativní výsledek.

Po procesu PCR se amplifikované fragmenty DNA rozdělí podle velikosti, např. elektroforézou v agarózovém gelu, vizualizují se barvením ethidium bromidem a vystavením ultrafialovému světlu, zdokumentují se fotografií a interpretují. Interpretace výsledků PCR-SSP je založena na přítomnosti nebo nepřítomnosti specifických produktů PCR. Při interpretaci výsledků mohou být užitečné relativní velikosti specifických produktů PCR. Metodiku PCR-SSP pro HLA původně popsal O. Olerup v letech 1991 a 1992^{1,2}.

Vzhledem k tomu, že proces PCR může být nepříznivě ovlivněn různými faktory (např. chybami při pipetování, příliš nízkou koncentrací DNA, špatnou kvalitou DNA, přítomností inhibitorů PCR, nepřesností termálního cyklu), je do každé reakce PCR zahrnut interní pozitivní kontrolní pár primerů². Vnitřní pozitivní kontrolní pár primerů odpovídá konzervovanému oblastem genu pro lidský růstový hormon, který je přítomen ve všech vzorcích lidské DNA. V přítomnosti specifického produktu PCR alely (alel)

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

HLA může být produkt vnitřního pozitivního kontrolního pásu slabý nebo může chybět. Amplikony generované specifickými páry primerů HLA jsou kratší než amplikony interního pozitivního kontrolního páru primerů, ale větší než neinkorporované primery (viz Očekávané hodnoty).

ČINIDLA

A. Identifikace

Typizační sady Olerup SSP® obsahují sušené, předem optimalizované sekvenčně specifické primery pro PCR amplifikaci alel HLA a genu pro lidský růstový hormon, PCR Master Mix včetně Taq polymerázy („Master Mix“) a lepicí PCR plomby.

Roztoky primerů jsou předem připraveny a vysušeny v 0,2 ml jamkách nařezaných tenkostěnných zásobnících PCR. Každá jamka zásobníku obsahuje vysušený roztok primerů sestávající ze specifické směsi primerů, tj. alelově a skupinově specifických primerů HLA, a také interního pozitivního kontrolního páru primerů odpovídajících nealelickým sekvencím a je připravena pro přidání vzorku DNA, směsi Master Mix a H₂O.

Primery jsou navrženy pro optimální amplifikaci PCR při použití Master Mixu a doporučeného programu cyklování DNA (viz Programování termocykléru).

Tabulky specifčnosti a interpretace specifických šarží nebo pracovní list pro specifické alely HLA amplifikované každou směsí primerů lze získat na webové stránce www.caredx.com.

B. Varování a preventivní opatření

1. Pro diagnostické použití *in vitro*.
2. Tento produkt nelze použít jako jediný podklad pro klinické rozhodnutí.
3. **Varování před biologickým nebezpečím:** Všechny krevní produkty by měly být považovány za potenciálně infekční. Žádná známá zkušební metoda nemůže zaručit, že produkty získané z lidské krve nebudou přenášet infekční agens.
4. **Varování před biologickým nebezpečím:** Bromid ethidia používaný k barvení DNA při elektroforéze v agarosovém gelu je karcinogenní. Při manipulaci používejte vhodné osobní ochranné prostředky.
5. **Upozornění:** Používejte ochranu očí blokující UV záření a při prohlížení nebo fotografování gelů se nedívejte přímo na zdroj UV světla.
6. Pipety a další vybavení používané pro post-PCR manipulace by se neměly používat pro pre-PCR manipulace.
7. Podrobné informace naleznete v bezpečnostním listu (www.caredx.com).

C. Návod k použití

Viz návod k použití.

D. Pokyny pro skladování

Součásti soupravy skladujte ve tmě a při teplotách uvedených na obalu. Spotřebujte před uplynutím doby použitelnosti uvedené na štítku na obalu.

E: Čištění nebo ošetření nutné pro použití

Viz návod k použití.

F. Indikace nestability

1. Nepoužívejte zásobníky primerů s prasklinami v jamkách nebo s poškozeným horním okrajem jamek, protože to může způsobit odpařování během amplifikace PCR. Nepoužívejte proužky s uzávěrem PCR s prasklinami, protože by mohlo dojít k odpařování během amplifikace PCR.
2. Pelety v jamkách by měly mít červenou barvu. Žluté zbarvení pelet může znamenat degradaci.
3. Master Mix by měl mít červenou až fialovou barvu. Žluté až oranžové zbarvení může znamenat degradaci.

POŽADAVKY NA NÁSTROJE**A. Nástroj**

Měl by být použit termocykler s následujícími minimálními specifikacemi:

- vyhřívané víko s teplotou 104 °C pro bezolejový provoz
 - blok na vzorky (hliníkový, stříbrný nebo pozlacený stříbrný) pro použití s 96jamkovou PCR destičkou nebo 0,2 ml tenkostěnnými reakčními zkumavkami.
 - Sady Olerup SSP jsou validovány na následujících cyklech.
Doporučené nájezdové rychlosti:
 - GeneAMP 9700: Cyklér GeneAmp 9700 nastaven na režim 9600. To odpovídá **rychlosti náběhu vzorku** 1,6°C/s nahoru a 0,8°C/s dolů.
 - ProFlex 1x96-jamkový blok: PCR cyklér ProFlex s rychlostí náběhu bloku 3,0 °C/s (každý krok 3,0°C/s). **Rychlost náběhu bloku** 3,0 °C/s odpovídá rychlosti náběhu vzorku 1,52 °C/s nahoru a 1,36 °C/s dolů.
 - ProFlex 2x96-jamkový blok: PCR cyklér ProFlex s rychlostí náběhu bloku 3,0 °C/s (každý krok 3,0°C/s). **Rychlost náběhu bloku** 3,0 °C/s odpovídá rychlosti náběhu vzorku 1,9 °C/s nahoru a 1,6 °C/s dolů.
- Poznámka: Vyšší nájezdové rychlosti, než jsou popsány výše, mohou mít vliv na výsledky typizace. Vezměte prosím také na vědomí, že vliv na psaní se může u různých nevalidovaných cyklérů lišit v závislosti na nastavení.**
- teplotní rozsah 4,0° C až 99,9° C
 - přesnost teploty ± 0,25° C v rozmezí 35° C až 99,9° C
 - rovnoměrnost teploty bloku vzorku ≤ 0,75 °C v rozmezí 55 °C až 95 °C.
 - teplotní kalibrace navázaná na referenční standard (např. NIST).

Naprogramujte termocykler pomocí parametrů cyklování PCR v části B níže.

Konkrétní informace o termocykleru naleznete v uživatelské příručce výrobce. Termocyklery by měly být kalibrovány podle akreditačních pravidel ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) nebo EFI (European Federation of Immunogenetics).

Před spuštěním termocykleru naprogramujte níže popsaný návod k použití.

B. Parametry cyklování PCR

1.	1 cyklus	94 °C	2 min	denaturace
2.	10 cyklů	94 °C	10 sekund	denaturace
		65 °C	60 sekund	žihání a prodloužení
3.	20 cyklů	94 °C	10 sekund	denaturace
		61 °C	50 sekund	žihání
		72 °C	30 sekund	prodloužení
4.	Konec – podržen	RT 4 °C		pokud je kratší než 8 hodin pokud je delší než 8 hodin í

Celkový reakční objem v každé jamce, 10 µl .

Pro všechny soupravy Olerup SSP® se používají stejné parametry cyklování PCR.

ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro typizaci SSP je zapotřebí extrahovaná, vysoce čistá DNA. Vzorky DNA, které mají být použity pro PCR-SSP HLA typizaci, by měly být znovu suspendovány v dH₂O. Poměr A_{260/280} by měl být 1,6 — 2,0 podle UV spektrofotometrie pro optimální vizualizaci pásů během elektroforézy.

Doporučujeme automatickou extrakci DNA pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Jako výchozí materiál by měla být použita krev ACD.

Alternativně lze DNA extrahovat jakoukoli preferovanou metodou, která poskytuje čistou DNA. Při použití alternativních metod by měla být koncentrace DNA upravena na 30 ng/µl. **Při těchto metodách nepoužívejte heparinizovanou krev.**

Doporučená koncentrace DNA pomocí:

DNA extrahované z EZ1, 15 ng/µl.

DNA extrahované jinými metodami, 30 ng/µl.

Koncentrace přesahující 50 ng/µl zvyšují riziko nespecifických amplifikací a slabých extra pásů, zejména u typizací HLA třídy I s vysokým rozlišením SSP. V případě potřeby zředte extrahovanou DNA v dH₂O.

Vzorky DNA by neměly být resuspendovány v roztocích obsahujících chelatační činidla, jako je EDTA, o koncentraci vyšší než 0,5 mM.

Vzorky DNA lze použít ihned po extrakci nebo je lze skladovat při teplotě +4°C po dobu až 2 týdnů, aniž by to mělo nepříznivý vliv na výsledky. Vzorky DNA lze skladovat při teplotě -20 °C nebo nižší po dobu 9 měsíců. Čistota a koncentrace extrahovaných vzorků DNA, které byly delší dobu skladovány, by měla být před typizací HLA testována na přijatelnost.

Vzorky DNA by měly být přepravovány při teplotě +4°C nebo nižší, aby se během přepravy zachovala jejich integrita.

POSTUP**A. Poskytnuté materiály**

1. Olerup SSP® zásobníky s primery.
2. Master Mix (odpovídající objem pro zásobníky soupravy). Stejný Master Mix se používá pro všechny sady Olerup SSP®.
3. Samolepicí těsnění PCR (odpovídající počet pro zásobníky soupravy).

B. Požadované, ale neposkytované materiály

1. Souprava/zařízení pro izolaci DNA
2. UV spektrofotometr
3. Pipetovací zařízení. Pro přidání směsi DNA-Master Mix-dH₂O do jamek zásobníku doporučujeme elektronický jednobáňový dávkovač schopný dávkovat alikvoty o objemu 10 µl.
4. Jednorázové pipetovací špičky
5. Polypropylenové zkumavky
6. Vortexový mixér
7. Mikrocentrifuga
8. Stojan na PCR
9. Termocykler s vyhříváním víkem pro PCR s 96jamkovým formátem, teplotním gradientem přes vyhřívací blok ≤ 0,75 °C a zásobníkem/držákem na 0,2 ml tenkostěnné reakční jamky.
10. Mikrovlnná trouba nebo horký talíř pro ohřev roztoků agarózy
11. Agaróza třídy elektroforézy, např. FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE pufr; 1 x TBE pufr je 89 mM Tris-borát, 2 mM disodná EDTA, pH 8,0.
13. Láhev s kapátkem na etidium bromid Číslo výrobku 103.301-10 nebo láhev s kapátkem GelRed Číslo výrobku 103.302-05
14. Gelové pipetovací zařízení. Pro vkládání gelu doporučujeme 8-kanálovou pipetu, nastavitelný objem 5 – 25 µl
15. Značkovač velikosti DNA pokrývající rozsah 50 – 1 000 bp, např. žebříček o 100 párech bází, DNA Size Marker produkt č. 103.202-100 nebo DNA Size Marker pro krátké gely 103.203-100
16. Elektroforézní přístroje/napájecí zdroj
17. UV tranziluminátor
18. Systém fotografické nebo obrazové dokumentace

C. Postup krok za krokem

Viz návod k použití.

NÁVOD K POUŽITÍ**A. Příprava vzorků**

1. Purifikujte genomovou DNA ze vzorku leukocytů zvolenou metodou, viz výše Odběr a příprava vzorku.
2. Konkrétní informace o přípravě a skladování vzorků naleznete výše v části Odběr a příprava vzorků.
3. Proveďte amplifikaci PCR na přečištěném vzorku DNA pomocí typizačního zásobníku Olerup SSP® nebo vzorek DNA uložte, dokud nebude připraven k typizaci.

B. Příprava činidla/zařízení

1. Naprogramujte termocykler pro spuštění programu Olerup SSP® PCR, viz výše Požadavky na přístroj - Parametry cyklování PCR.
2. Připravte gel pro elektroforézu, viz část C: **Příprava gelu pro elektroforézu** níže.

C. Příprava gelové elektroforézy

Pro gelový systém Olerup SSP® 96 (Produkt č. 103.101-01)

1. Nastavení

- Vyrovnajte odlévací komoru pro 1 gel (výrobek č. 103.101-31) nebo odlévací komoru pro 3 gely (výrobek č. 103.101-33) pomocí vyrovnávací bubliny a tří výškově nastavitelných nožiček.
- Umístěte zásobník(y) na gel do odlévací komory.

2. 2 % (w/v) Příprava agarózového gelu

Použijte vysoce kvalitní agarózu pro elektroforézu, která je schopna rozlišit fragmenty DNA o velikosti 50 – 000 párů bází.

- Do 5 ml 10 x TBE (Tris Borate EDTA) pufru přidejte 150 ml destilované vody a 2 g agarózy v 500 ml skleněné lahvi.
- Rozpusťte agarózu vařením v mikrovlnné troubě, dokud nevznikne homogenní roztok o objemu 100 ml.
- Rozpuštěný roztok gelu nechte vychladnout na 60 °C, např. ve vyhřívací skříni.
- Gel před odlitím obarvěte ethidium bromidem (10 mg/ml), 5 µl na 100 ml gelového roztoku. Pro maximálně snadnou manipulaci používejte naše lahvičky s kapátkem na ethidium bromid (výrobek č. 103.301-10). **Poznámka: Ethidium bromid je karcinogen. Při manipulaci používejte vhodné osobní ochranné prostředky.**
- Do zásobníku na gel v odlévací komoře nalijte 100 ml gelového roztoku. Vložte 6 gelových hřebenů (produkt č. 103.101-21) do otvorů zásobníku na gel.
- Nechte gel 15 minut ztuhnout.
- Do nádržky na gel nalijte 750 ml 0,5 x TBE pufru. Ponořte zásobník na gel do krabičky na gel a opatrně vyjměte 6 gelových hřebenů jejich nadzvednutím.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Při použití alternativních elektroforézních systémů postupujte podle pokynů výrobce. Aby mohly být použity typovacími soupravami Olerup SSP® HLA, musí být tyto systémy schopny rozlišit produkty PCR o velikosti od 50 do 1100 párů bází.

D. Postupný postup

1. Z uvedených skladovacích teplot vyjměte: příslušný počet vzorků DNA, zásobník(y) primerů a objem Master Mixu potřebný pro vybraný(é) vzorek(y)/zásobník(y) primerů. Rozmrazte při pokojové teplotě (20 až 25°C).

Pro všechny soupravy Olerup SSP® se používá stejná směs Master Mix.

2. Vzorek (vzorky) DNA krátce promíchejte vířením.
3. Umístěte zásobník(y) primerů do stojanu na zásobníky PCR.
4. **Soupravy s nízkým a vysokým rozlišením**
 - Před odebráním alikvotních částí směs Master Mix vortexujte.
 - Pomocí ruční jednobáňové pipety přidejte při pokojové teplotě Master Mix a dH₂O do 0,5 ml nebo 1,5 ml zkumavky. (Příslušné částky jsou uvedeny v tabulce 1 níže.)
 - Zkumavku uzavřete a 5 sekund vířete. Pulzně roztočte zkumavku v mikrocentrifuze, aby se veškerá tekutina dostala dolů ze stran zkumavky.
 - Pomocí ruční jednobáňové pipety přidejte 8 µl směsi Master Mix -dH₂O a 2 µl dH₂O do jamky negativní kontroly, tj. jamky s negativními kontrolními páry primerů, v zásobníku primerů.
 - Pomocí ruční jednobáňové pipety přidejte při pokojové teplotě vzorek DNA do zbývající směsi Master Mix – dH₂O. (Příslušné částky jsou uvedeny v tabulce 1 níže.)
 - Zkumavku uzavřete a 5 sekund vířete. Pulzně roztočte zkumavku v mikrocentrifuze, aby se veškerá tekutina dostala dolů ze stran zkumavky.
 - Pomocí elektronického jednobáňového dávkovače alikvotujte 10 µl reakční směsi vzorku do každé jamky zásobníku primerů s výjimkou jamky negativní kontroly.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Tabulka 1: Objem složek potřebných na jeden test pro různé počty jamek při použití Master Mix.

Počet jamek na zkoušku	Objem Master Mix (μl)	Objem vzorku DNA (μl)	Objem dH ₂ O (μl)	Počet jamek na zkoušku	Objem Master Mix (μl)	Objem vzorku DNA (μl)	Objem 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

Výše uvedené doporučené objemy zahrnují objem kompenzující odchylky pipet a ztráty kapaliny na vnitřních stěnách zkumavek.

5. Kombinované soupravy A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ a DQA-DQB-DR Enhanced a HLA-C s vysokým rozlišením pro časté alely

- Vortex Master Mix.
- Pomocí ruční jednonálové pipety přidejte při pokojové teplotě 520 μl dH₂O do dodané 1,5 ml zkumavky obsahující 312 μl Master Mix.
- Zkumavku uzavřete a 5 sekund vířete. Pulzně roztočte zkumavku v mikrocentrifuze, aby se veškerá tekutina dostala dolů ze stran zkumavky.
- Pomocí ruční jednonálové pipety přidejte 8 μl směsi Master Mix - dH₂O a 2 μl dH₂O do jamky č. 96 pro negativní kontrolu, tj. jamky s negativními kontrolními páry primerů.
- Pomocí ruční jednonálové pipety přidejte při pokojové teplotě 206 μl vzorku DNA do zbývající směsi Master Mix – dH₂O.
- Zkumavku uzavřete a 5 sekund vířete. Pulzně roztočte zkumavku v mikrocentrifuze, aby se veškerá tekutina dostala dolů ze stran zkumavky.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

- Pomocí elektronického jednobanového dávkovače alikvotujte 10 µl reakční směsi vzorku do každé jamky, s výjimkou jamky č. 96 pro negativní kontrolu, v zásobníku primerů.

Důležité:

Dbejte na to, abyste vzorek nanесли nad primery (zaschlé na dně každé jamky zásobníku primerů), aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Dotkněte se vnitřní stěny jamky špičkou pipety, aby vzorek sklouzl na dno jamky. Zkontrolujte, zda všechny vzorky klesly na dno každé jamky. Pokud tomu tak není, jemně poklepejte zásobníkem o desku stolu, aby se všechny vzorky usadily na dně jamky před zahájením PCR.

6. Zakryjte zásobník(y) na základní nátěr dodanými samolepicími těsněními PCR. Zkontrolujte, zda jsou všechny reakční jamky zcela zakryté, aby nedocházelo k odpařování během amplifikace PCR. Kompresní podložku *Olerup SSP®* (výrobek č. 103.505-06) lze aplikovat nalepicí těsnění PCR, aby se zabránilo odpařování během tepelného cyklování.
7. Umístěte zásobník(y) primerů do termocykleru s vhodným adaptérem pro zkumavky. Mezi nastavením PCR a tepelným cyklováním nedovolte prodlevu delší než 5 minut.
8. Zadejte svoje číslo programu *Olerup SSP®*. Zadejte reakční objem 10 µl.
9. Spusťte program PCR. Program trvá přibližně 1 hodinu a 20 minut.
10. Odstraňte zásobník (y) základního nátěru z termocykleru. Zkontrolujte zásobník PCR a ujistěte se, že je v každé jamce PCR přibližně stejný objem tekutiny. Provedte elektroforézu vzorků, viz oddíl E – Gelová elektroforéza níže. Interpretujte výsledky typizace pomocí **tabulek pro interpretaci a specifičnost specifických pro danou šarži nebo pracovního listu**, viz Očekávané hodnoty níže.

E. Gelová elektroforéza

1. Po dokončení PCR reakce orientujte zásobník primerů a gelový box. Pořadí jamek je zleva doprava a shora dolů.
2. Opatrně odstraňte víčka proužků, aniž by došlo k potřísnění produktů PCR.
3. Na 2 % agarózový gel vložte sekvenčně uspořádané produkty PCR. (Není nutné přidávat žádný nakládací pufr do gelu.) Pro vkládání gelu se doporučuje použít 8-kanálovou pipetu.
4. Vložte marker velikosti DNA (žebříček o velikosti 100 párů bází, DNA Size Marker produkt č. 103.202-100 nebo DNA Size Marker pro krátké gely 103.203-100) do jedné jamky v každém řádku.
5. Přikryjte krabičku s gelem víkem krabičky s gelem.
6. Provedte elektroforézu gelu v 0,5 x TBE pufru bez recirkulace pufru po dobu 15 – 20 minut při 8 – 10 V/cm.
7. Přeneste zásobník s gelem do UV transiluminátoru.
8. Vyfoťte gel se zásobníkem na gel nebo bez něj.
9. Označte fotografii podle pravidel laboratoře.

KONTROLA KVALITY

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Podle pokynů ASHI pro testování HLA musí být v každé sestavě PCR zahrnuta negativní (kontaminační) kontrolní jamka. (Revidované standardy pro akreditované laboratoře, Americká společnost pro histokompatibilitu a imunogenetiku, schváleno CMS: 16. února 2021). S výjimkou souprav HLA-B*27 – jednotková dávka a souprav HLA-B*27 s jednou jamkou je součástí všech souprav negativní kontrolní jamka.

Viz Interpretace gelu na straně 14.

VÝSLEDKY

Validační listy pro jednotlivé šarže buněčných linií a certifikát o analýze jsou k dispozici online na adrese www.caredx.com.

OMEZENÍ POSTUPU

1. Proces PCR-SSP vyžaduje vysoce kontrolované testovací podmínky, aby byla zajištěna odpovídající diskriminační amplifikace. Je třeba přesně dodržovat postup popsany v návodu k použití.
2. Extrahovaný vzorek DNA je templátem pro specifický proces amplifikace PCR. Přečištěná DNA by měla mít poměr $A_{260/280}$ mezi 1,6 a 2,0, aby se dosáhlo optimální vizualizace pásů elektroforézou.
3. Všechny přístroje, např. termocykler, pipetovací zařízení, musí být kalibrovány podle doporučení výrobce.
4. Informace o jednotlivých šaržích jsou uvedeny v příbalové informaci: Informace o konkrétní šarži a v pracovním listu pro konkrétní šarži.
5. Na základě provedených zkoušek byly následující látky hodnoceny třemi (3) extrakčními metodami v uvedených koncentracích a bylo zjištěno, že nemají vliv na výsledky zkoušek.

Metoda extrakce	Interferující látka	Interferentní koncentrace*
Krevní systém EZ1 DSP DNA	Bilirubin	200 mg/l
	Hemoglobin	200 g/l
	Triglycerid	30 g/l
	Bílkovina	110 g/l
Souprava QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubin	200 mg/l
	Hemoglobin	200 g/l
	Triglycerid	18,2 g/l
	Bílkovina	77 – 96 g/l
Metoda Genra PureGene	Bilirubin	200 mg/l
	Hemoglobin	200 g/l
	Triglycerid	18,2 g/l
	Bílkovina	119 – 146 g/l

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

6. Destičky PCR jsou fyzicky kompatibilní s většinou termocyklerů na trhu. Viz tabulka kompatibility plastů termocykleru níže. termocyklery na trhu.
Poznámka: Tabulka je určena pouze jako vodítko. Ohledně validovaných cyklérů viz část Požadavky na přístroje – Přístroje.

Tabulka kompatibility	
Výrobce	Termocyklér
Aplikované biosystémy	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-jamkový
	ProFlex 2x96-jamkový
	Veriti 0,2 ml 96-jamkový blok
Agilent (Stratagene)	GeneAmp 2700, 2720, 9600
	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	Termocykler T1
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
	TProfessional
Bio-Rad	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
	PTC-2(xx) PTC-100 s 96-jamkovým blokem
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

OČEKÁVANÉ HODNOTY

A. Analýza dat










Pečlivě si prohlédněte fotografii gelu a určete pozitivní dráhy.

1. Pokud byla amplifikována specifická alela (alely) HLA, v pruhu gelu se objeví rychleji migrující, kratší pás. To znamená pozitivní výsledek testu.

Návod k použití**Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy**

- a. Zaznamenejte přítomnost a nepřítomnost specifických produktů PCR.
 - b. Při interpretaci výsledků z gelu je užitečné sledovat relativní délky specifických produktů PCR, které jsou uvedeny v produktových vložkách specifických pro danou šarži. Některé dráhy mají dvě nebo více možných délek specifických produktů PCR. Tyto jamky obsahují více párů primerů generujících produkty PCR různých velikostí v závislosti na alelách HLA ve vzorku DNA.
 - c. Porovnejte vzor gelových drah se specifickými produkty PCR s informacemi v tabulkách interpretace a specifčnosti specifických pro danou šarži, abyste získali typizaci HLA DNA vzorku.
2. Jako kontrola úspěšné amplifikace by měl být ve všech pruzích gelu viditelný vnitřní pozitivní kontrolní pás, který je pomalejší a delší, s výjimkou negativního kontrolního pásu. Vnitřní pozitivní kontrolní pás může být v pozitivních gelových pruzích slabý nebo může chybět.
- a. Zaznamenejte přítomnost a relativní délku interních pozitivních kontrolních pásů. Různě velké kontrolní pásy pomohou při správné orientaci při psaní i při identifikaci soupravy.
 - b. Absence interního pozitivního kontrolního pásu bez specifického PCR produktu znamená neúspěšnou PCR reakci.
 - i. Pokud lze alely HLA stanovit v přítomnosti neúspěšné reakce (reakcí) PCR a neúspěšná reakce (reakce) PCR nezmění přiřazení alel, test se nemusí opakovat.
 - ii. Pokud by však neúspěšná reakce PCR mohla změnit přiřazení alel HLA, je třeba typizaci opakovat.
3. Přítomnost specifického produktu PCR nebo interního pozitivního kontrolního pásu v negativním kontrolním pruhu (pruzích) znamená kontaminaci produktem (produkty) PCR a znehodnocuje všechny výsledky testu. V negativním kontrolním pruhu (pruzích) mohou být pozorovány oligomery primerů o velikosti 40 až 60 párů bází. To nepředstavuje kontaminaci.

B. Interpretace gelu

	Pozitivní reakce	Negativní reakce	Neúspěšná reakce PCR
Jamka			
Vnitřní pozitivní kontrolní pásmo			
Specifické pásmo			
Pásmo primerů			

1. Marker velikosti DNA (žebříček o velikosti 100 párů bází, produkt DNA Size Marker č. 103.202-100 nebo DNA Size Marker pro krátké gely 103.203-100) by se měl použít v jedné jamce v každém řádku gelu nebo podle místních akreditačních směrnic laboratoře.
2. Mohou být získány pásy delší než vnitřní pozitivní kontrolní pás, které by se při interpretaci výsledků typizace neměly brát v úvahu.
3. Nepoužité primery vytvoří difuzní pás kratší než 50 párů bází.
4. Mohou být pozorovány artefakty primerových oligomerů. Ty jsou delší než primerový pás, ale kratší než specifické pásy.

SPECIFICKÉ VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Kontrola kvality šarže sady

Každý roztok primerů je testován na panelu 48 vzorků DNA z dobře charakterizovaných buněčných linií IHWC, viz list(y) pro validaci buněčné linie specifické pro danou šarži v příbalové informaci k produktu, informace specifické pro danou šarži.

Srovnávací studie metod 1

Jednalo se o multicentrickou studii hodnotící shodu soupravy Olerup SSP® DR Low Resolution HLA Typing Kit a soupravy One Lambda Micro SSP™ HLA DNA Typing Tray ve třech klinických laboratořích ve Spojených státech.

Analyzované výsledky typizace soupravy Olerup SSP® DR Low Resolution HLA Typing Kit a soupravy One Lambda Micro SSP™ HLA DNA Typing Tray ukázaly 98,4 % (123/125; 95 % CI: 94,3 – 99,8) shoda, když jsou dva nejednoznačné výsledky Olerup považovány za nesouhlasné. Shoda byla 100 % (123/123;

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

95 % CI: 97,1 – 100), pokud do analýzy nebyly zahrnuty nejednoznačné výsledky Olerup, které odrážejí běžnou klinickou praxi.

Srovnávací studie metod 2

Cílem této studie bylo prokázat shodu výsledků typizace alel HLA (A, B, C, DQ) s nízkým rozlišením získaných pomocí zkoumaných souprav Olerup SSP® HLA Typing Kits a referenčních souprav One Lambda LABType SSO. Vzorky plné krve ACD byly odebrány 95 subjektům na 3 klinických pracovištích ve Spojených státech. Byla provedena extrakce DNA a výsledná přečištěná DNA byla testována pomocí zkoumané metody Olerup SSP® a referenční metody One Lambda LabType SSO HLA.

Celková shoda pro alely I. třídy byla 99,6 % (278 /279; 95 % CI: 98,0 – 100). U alel II. třídy byla shoda 100 % (94/94; 95 % CI): 96,2 – 100).

Tabulka 1
Celková shoda výsledků Olerup SSP® a OneLambda SSO pro alely třídy I a třídy II.

HLA lokus	Celkem	
	n/N	% Shoda (95 % CI)
A	95/95	100 (96,2 – 100)
B	90/90	100 (96,0 – 100)
C	93/94	98,9 (94,2 – 100)
Všechny lokusy třídy I	278/279	99.6 (98,0 – 100)
Class II Loci (DQ)	94/94	100 (96,2 – 100)

Studie reprodukovatelnosti výsledků soupravy.

Tato studie porovnávala výsledky HLA typizace Olerup SSP® mezi třemi laboratořemi pro testování HLA s použitím panelu 10 dobře charakterizovaných vzorků DNA, jejichž konsenzuální výsledky jsou zahrnuty v UCLA HLA DNA Bank pro HLA třídy I (A, B a C), běžné alely třídy II (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* a DQB1*) a méně často vyšetřované alely třídy II (DQA1*, DPA1* a DPB1*).

Tabulka 2: Shrnutí výsledků studie reprodukovatelnosti soupravy Olerup SSP® HLA

Typ alely HLA	Přesnost typizace % n/N	
	95 % Konf. Interval (LL, UL)	
	Nejednoznačný výsledek se považuje za nesouhlasný	Nejednoznačný výsledek se považuje za neurčitý a je vyloučen z analýzy
<i>Třída I Nízké rozlišení (kombinace A a B)</i>	98,3 (59/60) 91,1, 100	100 (59/59) 93,9, 100
<i>Vysoké rozlišení třídy I (kombinace A, B a C)</i>	94,7 (142/150) 89,8, 97,7	(98,6) (142/144) 95,1, 99,8
<i>Třída II s nízkým rozlišením (DRB1* a DRB3*/DRB4*/DRB5*)</i>	100 (60/60) 94,0, 100	100 (60/60) 94,0, 100
<i>Třída II s vysokým rozlišením – běžné alely (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* a DQB1*)</i>	98,3 (118/120) 94,1, 99,8	100 (118/118) 96,9, 100
<i>Vysoké rozlišení třídy II Méně často zkoumané alely (DQA1*, DPA1* a DPB1*)</i>	83,3 (75/90) 74,0, 90,4	86,2 (75/87) 77,2, 92,7

V této studii byl použit panel deseti (10) vzorků DNA s dobře charakterizovanými výsledky typizace HLA.

Nižší shoda pozorovaná u méně často zkoumaných alel třídy II s vysokým rozlišením odráží větší nejistotu "konsenzuálních výsledků" vzorků DNA UCLA s ohledem na neúplné sekvenční informace dostupné pro alely DQA1*, DPA1* a DPB1*. U 9 z 11 neshodných výsledků zjištěných během studie reprodukovatelnosti (volání DQA1*0505 pomocí Olerup SSP® vs. DQA1*0501 "konsenzuální typizace") dospěla všechna tři testovací místa ke stejnému výsledku, což svědčí o konzistentním výkonu soupravy Olerup DQA1*.

BIBLIOGRAFIE

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tkářové antigeny* 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. *Tkářové antigeny* 1992: **39**: 225 – 235.
3. Aktuální alely HLA lze nalézt na www.ebi.ac.uk/imgt/hla

ODSTRAŇOVÁNÍ PROBLÉMŮ

Problém	Příčina	Opatření
Žádná amplifikace (ani amplifikace vnitřních kontrolních fragmentů, ani specifická amplifikace).	Příliš malé množství DNA.	Změřte koncentraci DNA a zjistěte, zda je přidané množství správné. Kontaminace RNA může způsobit nadhodnocení spektrofotometrické koncentrace DNA. Extrakci DNA opatrně opakujte s čerstvě připravenými roztoky. Doporučujeme automatickou extrakci DNA pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA obsahuje inhibitory PCR, např. proteiny, etanol (z precipitačních kroků), zbytkové matrice z produktů purifikace DNA na pevné fázi.	Změřte kvalitu DNA. Doporučujeme poměr A260/A280 1,6 — 2,0 pomocí UV spektrofotometrie. Řiďte se přesně protokolem dodavatele pro extrakci DNA. Znovu extrahujte DNA. Doporučujeme automatickou extrakci DNA pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA byla extrahována z heparinizované krve.	Použijte neheparinizovanou krev nebo použijte protokoly pro extrakci DNA z heparinizované krve.
	DNA je rozpuštěna v pufru obsahujícím EDTA.	Opakujte extrakci DNA a rozpust'te ji v dH ₂ O.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Problém	Příčina	Opatření
Pokračování: Žádná amplifikace (ani amplifikace vnitřních kontrolních fragmentů, ani specifická amplifikace).	Náhodné vnesení bělidla do testu.	Zkontrolujte oblasti, do kterých by se mohlo dostat bělidlo.
	Sady nejsou skladovány při odpovídající teplotě.	Sady skladujte při teplotě -20°C.
	Termální cyklér nepracuje správně.	Zkalibrujte termální cyklér a zkontrolujte program PCR. Termocykler používaný pro rutinní typizaci PCR-SSP by měl být kalibrován každých 6 – 12 měsíců.
	Nedostatečný kontakt mezi vyhřívacím blokem termálního cyklu a typizačním zásobníkem SSP.	Použijte správný zásobník pro 0,2 ml tenkostěnné reakční jamky, viz příručka k termocyklu.
Náhodné selhání zesílení (výpadky).	PCR těsnění/uzávěry zkumavek, které nejsou pevně uzavřeny, vedou k odpařování a následnému selhání amplifikace.	Ujistěte se, že jsou těsnění PCR/všechny uzavěry pevně uzavřeny. Kompresní podložku <i>Olerup SSP®</i> (výrobek č. 103.505-06) lze aplikovat na lepicí těsnění PCR, aby se zabránilo odpařování během termálního cyklování.
	Chyby při vkládání gelu.	Zkontrolujte, zda byl vložen správný počet jamek a zda každá jamka obsahuje přibližně stejný objem směsi PCR.
	Použití nekalibrovaných pipet.	Všechny pipety pravidelně kalibrujte podle doporučení dodavatele.
	Chyby při pipetování.	Pipetování provádějte pečlivěji.
	Hlavní směs a vzorek DNA nebyly před použitím řádně promíchány.	Před použitím krátce vírově promíchejte. Doporučujeme vírově promíchat po každém řádku.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Problém	Příčina	Opatření
	Do jamek byl přidán nerovnoměrný objem směsi DNA a hlavní směsi.	Pipetování provádějte pečlivěji.
Slabé prvky vnitřní kontroly.	Nečistá DNA.	Změřte kvalitu DNA. Poměr $A_{260/280}$ by měl být 1,6 – 2,0 podle UV spektrofotometrie. Kontaminace RNA může způsobit nadhodnocení spektrofotometrické koncentrace DNA. Degradovaná DNA vytváří v gelových pruzích šmouhy. Extrakci DNA opatrně opakujte s čerstvě připravenými roztoky. Doporučujeme automatickou extrakci DNA pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Příliš malé množství DNA.	Změřte koncentraci DNA a upravte ji na 30 ng/μl nebo na 15 ng/μl v případě DNA extrahované pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Kontaminace RNA může způsobit nadhodnocení spektrofotometrické koncentrace DNA. Degradovaná DNA vytváří v gelových pruzích šmouhy. Extrakci DNA opatrně opakujte s čerstvě připravenými roztoky. Doporučujeme automatickou extrakci DNA pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Problém	Příčina	Opatření
Pokračování: Slabé prvky vnitřní kontroly.	Příliš vysoká teplota žíhání, termální cyklér není kalibrovaný.	Zkalibrujte termální cyklér a zkontrolujte program PCR. Termocykler používaný pro rutinní typizaci PCR-SSP by měl být kalibrován každých 6 – 12 měsíců.
	PCR Master Mix byl skladován při teplotě +4 °C déle než 2 týdny.	Správně skladujte PCR Master Mix.
Nespecifická amplifikace (žebříčky nebo nátěry).	Použití přebytečného vzorku DNA.	Změřte koncentraci DNA a upravte ji na 30 ng/μl nebo na 15 ng/μl v případě DNA extrahované pomocí systému QIAGEN to15 DSP DNA Blood System. Některé roztoky primerů mají vyšší tendenci k nespecifické amplifikaci, viz poznámky pod čarou v tabulce specifičnosti jednotlivých šarží.
	Nečistá DNA.	Při interpretaci získaných výsledků by se nemělo přihlížet ke všem fragmentům větším než fragment vnitřní kontroly. Zkontrolujte kvalitu DNA. Opakujte extrakci DNA. Doporučujeme automatickou extrakci DNA pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Některé roztoky primerů mají vyšší tendenci k nespecifické amplifikaci, viz poznámky pod čarou v tabulce specifičnosti jednotlivých šarží.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Problém	Příčina	Opatření
Slabší a slabší signály zesílení v průběhu času.	Roztok pro barvení agarózového gelu ethidium bromidem je starý.	Připravte si čerstvý roztok ethidium bromidu, abyste dosáhli lepšího obarvení agarózového gelu a lepšího signálu. Mraky primerů lze snadno zjistit, pokud je zbarvení agarózového gelu normální.
	Jedna z UV lamp je rozbitá.	Zkontrolujte zařízení UV záření. Pokud je UV světlo normální, lze mraky primeru snadno zjistit.
	Použito příliš málo vzorku DNA.	Změřte koncentraci DNA a upravte ji na 30 ng/μl nebo na 15 ng/μl v případě DNA extrahované pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Příliš vysoká teplota žíhání, termální cyklér není kalibrován.	Zkalibrujte termální cyklér a zkontrolujte program PCR. Termocyklér používaný pro rutinní typizaci PCR-SSP by měl být kalibrován každých 6 – 12 měsíců.
Podivné vzorce zesílení.	Používá se nesprávná tabulka/pracovní list pro interpretaci specifické šarže.	Zkontrolujte číslo šarže použitého výrobku a použitou interpretační tabulku/pracovní list.
	Nesprávné pořadí při nakládání gelu.	Zkontrolujte zarovnání směsí a gelových drah.
	Vzor amplifikace obsahuje falešně pozitivní výsledek.	Viz níže.
	Vzor amplifikace obsahuje falešně negativní výsledek.	Viz níže.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Problém	Příčina	Opatření
Falešně pozitivní amplifikace.	Kontaminace DNA.	Pro manipulaci před PCR a po PCR používejte rukavice, pipetovací špičky obsahující bariéry (filtrační vložky) a samostatné místnosti. Ve všech krocích zajistěte přesnou manipulaci se všemi vzorky. Zkontrolujte kontaminaci pomocí testovací sady <i>Olerup SSP® Wipe Test</i> .
	Nečistá DNA.	Změřte kvalitu DNA. Řiďte se přesně protokolem dodavatele pro extrakci DNA. Zkuste jiné systémy extrakce DNA. Znovu extrahujte DNA. Doporučujeme automatickou extrakci DNA pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Použití přebytečného vzorku DNA.	Změřte koncentraci DNA a upravte ji na 30 ng/μl nebo na 15 ng/μl v případě DNA extrahované pomocí systému QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Příliš nízká teplota žihání.	Zkalibrujte termální cyklér a zkontrolujte program PCR. Termocykler používaný pro rutinní typizaci PCR-SSP by měl být kalibrován každých 6 – 12 měsíců.
	Velká prodleva mezi nastavením PCR a zahájením termálního cyklování.	Před termálním cyklováním by neměla být povolena delší prodleva než 5 minut.
	Prodleva mezi vložením zásobníků na psaní do	Použijte předeřátý tepelný cyklér.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Problém	Příčina	Opatření
Pokračování: Falešně pozitivní amplifikace.	termocyklieru a zahájením cyklování.	
	Použití nadbytku ethidium bromidu.	Použijte doporučené množství ethidiumbromidu.
	Nesprávná interpretace artefaktu jako specifického pásma.	Zkontrolujte tabulku/pracovní list pro interpretaci specifickou pro danou šarži a tabulku specifičnosti pro správnou velikost pásů a poznámky pod čarou.
	Vzor amplifikace obsahuje falešně pozitivní výsledek.	Zkontrolujte, zda mají všechny specifické amplifikace správnou velikost, nebo zda nebyl artefakt (carry-over, dimer primeru) nesprávně interpretován jako amplifikace.
	Nesprávné pořadí při nakládání gelu.	Zkontrolujte zarovnání směsí a gelových drah.
Falešně negativní amplifikace.	Termocykler není správně kalibrován.	Zkalibrujte termální cyklér a zkontrolujte program PCR. Termocykler používaný pro rutinní typizaci PCR-SSP by měl být kalibrován každých 6 – 12 měsíců. Pokud nedojde ke korekci rekalibrací, proveďte test znovu s referenčním vzorkem stejné specifity. Pokud se potvrdí, že je negativní, kontaktujte zákaznickou podporu.
	Nesprávné pořadí při nakládání gelu.	Zkontrolujte zarovnání směsí a gelových drah.

Návod k použití
Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy

Problém	Příčina	Opatření
Celkové problémy s gelem (rozmazané gely a/nebo rozmazané pruhy).	Degradovaný vzorek DNA.	Objevuje se jako šmouha v pruzích gelu. Izolujte DNA z čerstvého vzorku.
	Silné pruhování v náhodných jamkách.	Nerovnoměrné suspenze DNA. Před odběrem alikvotní části se ujistěte, že je vzorek DNA rozpuštěn. Zředěný vzorek DNA vortexujte.
	Produkt PCR vyplaval z jamky.	Opatrně zarovnejte špičky pipety s jamkami gelu a pomalu dávkujte.
	Elektroforézní pufr může být příliš teplý.	Připravte nový pufr TBE. Pracujte při nižším napětí.
	Bylo použito nesprávné procento agarózového gelu.	Ujistěte se, že je použit doporučený 2 % agarózový gel.
	Agaróza není zcela rozpuštěna.	Krátce znovu povařte, aby se agaróza roztavila.
	Nesprávná koncentrace TBE.	Použijte doporučenou koncentraci 0,5 x TBE.
	Gely jsou příliš nově odlité.	Gely jsou připraveny k použití až 15 minut po odlití.
	Gely jsou příliš staré.	Nepoužívejte gely příliš daleko předem.
	Použitý gelový hřeben má příliš silné drážky.	Použijte tenké hřebeny (4 x 1 mm).
	Gelový zásobník není UV průhledný.	Před prohlížením vyjměte gel ze zásobníku na gel.
	Příliš jasný gelový obraz.	Nadměrné použití ethidium bromidu. Zkontrolujte nastavení fotoaparátu.
	Příliš jasný tmavý gelový obraz.	Použijte doporučené množství ethidiumbromidu. Zkontrolujte nastavení fotoaparátu.

Problém	Příčina	Opatření
Obecné problémy s falešně negativní amplifikací nebo problémy závislé na jednotlivých sériích.	Příliš vysoké nastavení rychlosti rampy.	Soupravy Olerup SSP jsou validovány pomocí cykléru GeneAmp 9700 nastaveného na režim 9600 a ProFlex s rychlostí náběhu 3 °C/s. Vyšší nájezdové rychlosti, než je ekvivalent této rychlosti, mohou mít vliv na výsledky typizace.

OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU/VÝROBKU

Olerup SSP® je registrovaná ochranná známka společnosti CareDx AB.
Qiagen™ je ochranná známka společnosti QIAGEN.

ZÁRUKA

CareDx AB ručí za své výrobky prvnímu nabyvateli za vady materiálu a zpracování při běžném používání a aplikaci. Jedinou povinností společnosti CareDx AB v rámci této záruky je bezplatně vyměnit jakýkoli výrobek, který nesplňuje výkonnostní normy uvedené ve specifikačním listu výrobku.

Tato záruka se vztahuje pouze na produkty, se kterými bylo nakládáno a které byly skladovány v souladu s doporučeními společnosti CareDx AB, a nevztahuje se na produkty, které byly předmětem změny, nesprávného použití nebo zneužití.

Všechny nároky vyplývající z této záruky musí být společnosti CareDx AB předány písemně a musí být doprovázeny kopií faktury kupujícího. Tato záruka nahrazuje všechny ostatní záruky, vyjádřené nebo předpokládané, včetně záruk obchodovatelnosti a vhodnosti k určitému účelu. CareDx AB nenesou v žádném případě žádnou odpovědnost za náhodné nebo následné škody.

Tento výrobek nesmí být přeformulován, přebalen ani dále prodáván v žádné podobě bez písemného souhlasu společnosti CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švédsko.

Se všemi vzorky jednejte, jako by byly schopny přenášet chorobu. Všechny práce musí být prováděny v rukavicích a s vhodnou ochranou.

ZÁRUKA

Společnost CareDx AB zaručuje, že primery v typizačních zásobnících Olerup SSP® mají specifity uvedené v pracovním listu, tabulkách specifčnosti pro jednotlivé šarže a interpretačních tabulkách v příbalové informaci k produktu.

ADRESY:

Výrobce:

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

Tel: +46-8-508 939 00

Fax: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Web: www.caredx.com

Distribuce:

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

Tel: +46-8-508 939 00

Fax: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Web: www.caredx.com

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

Tel: 1-877-653-7871

Fax: 610-344-7989

E-mail: orders-us@caredx.com

Web: www.caredx.com

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

Tel: +61 8 9336 4212

E-mail: orders-aus@caredx.com

Web: www.caredx.com

Zplnomocněným zástupcem:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Informace o distributorech CareDx po celém světě vám poskytne společnost CareDx AB.

1575-LBL v02 je přeloženo z angličtiny master 0192-LBL v07 Olerup SSP® HLA typizační soupravy včetně Taq polymerázy.

Změny v revizi 0192-LBL v07 ve srovnání s 0192-LBL v06:

1. Přidání švýcarský zplnomocněným zástupcem.
2. Přidání GelRed do sekce B. Požadované, ale neposkytované materiály.