



Lietošanas instrukcija

Olerup SSP[®] ar *Taq* polimerāzi

© 2023 CareDx, Inc. Visas pakalpojumu zīmes vai preču zīmes pieder vai tās licencē CareDx, Inc. vai ar to saistīti uzņēmumi. Visas tiesības aizsargātas.

1580-LBL v02 Olerup SSP[®] HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

In vitro diagnostikai

Pārskatīts 2023. gada septembris



Lappuse 1 no 28

In vitro diagnostikai

PAREDZĒTAIS LIETOJUMS

Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ir kvalitatīvi *in vitro* diagnostikas testi HLA I klases un HLA II klases alēļu DNS tipēšanai. Produktus izmanto apmācīti speciālisti medicīnas iestādēs HLA fenotipa noteikšanai. Pārbaudāmais izejmateriāls ir DNS.

KOPSAVILKUMS UN SKAIDROJUMS

Agrāk cilvēka leikocītu antigēnus (HLA) noteica, veicot limfocitotoksicitātes testu. Tomēr, kļūdu biežuma un alēļu līmeņa izšķirtspējas trūkuma dēļ šis tests tika aizstāts ar DNS tipēšanas metodēm uz polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) pamata. Metodēs uz PĶR pamata PĶR process lielākoties tiek izmantots tikai nepieciešamās mērķa DNS amplifikācijas solī un lai atšķirtu dažādas alēles ir nepieciešams pēcamplifikācijas solis. PĶR-SSP metodoloģijā (sekvencai specifisks praimer – SSP) dažādu alēļu atšķiršana, gluži otrādi, notiek PĶR procesa laikā. Tas saīsina un atvieglo pēcamplifikācijas soli līdz parastajam gela elektroforēzes noteikšanas solim. SSP testa rezultāti ir pozitīvi vai negatīvi, un tādēļ sarežģīta rezultātu interpretācija nav vajadzīga. Tāpat arī PĶR-SSP tipēšanas izšķirtspēja ir augstāka par citu metožu uz PĶR pamata izšķirtspēju, jo katrs praimeru pāris nosaka divus sekvenču motīvus, kas atrodas *cis* pozīcijā, t. i., tajā pašā hromosomā. Turklāt SSP reaģentu sintētiskās dabas dēļ ir uzlabojusies stabilitāte un samazinājusies starpība starp partijām.

PROCEDŪRAS PRINCIPS

PĶR-SSP metodoloģijas pamatā ir princips, ka pilnīgi vai gandrīz pilnīgi piesaistījušies oligonukleotīdu praimeru bez nepārotiem 3' galiem tiek efektīvāk izmantoti PĶR reakcijā nekā nepāroti praimeru ar termostabilām DNS polimerāzēm bez korektūras īpašībām. Praimeru pāri ir paredzēti, lai tos pārotu ar atsevišķām alēlēm vai alēļu grupu(-ām), atkarībā no nepieciešamās tipēšanas izšķirtspējas pakāpes. Stingri kontrolētos PĶR apstākļos piesaistīti vai gandrīz pilnīgi piesaistīti praimeru pāri ļauj notikt amplifikācijai, t. i., rodas pozitīvs rezultāts, turpretim nepiesaistīti praimeru pāri neļauj notikt amplifikācijai, t. i., rodas negatīvs rezultāts.

Pēc PĶR procesa amplificēti DNS fragmenti tiek sadalīti pa izmēriem, piem., veicot elektroforēzi agarozes gelā, vizualizējot ar etīdija bromīda iekrāsojošo šķīdumu un pakļaujot ultravioletas gaismas iedarbībai, dokumentējot ar fotogrāfijām un veicot interpretāciju. PĶR-SSP rezultātu interpretācijas pamatā ir specifiska(-u) PĶR produkta(-u) klātbūtne vai neesamība. Specifiska(-u) PĶR produkta(-u) relatīvie izmēri var palīdzēt rezultātu interpretācijā. HLA paredzētu PĶR-SSP metodoloģiju sākotnēji aprakstīja O. Olerup 1991. un 1992. gadā^{1,2}.

Tā kā PĶR procesu var nelabvēlīgi ietekmēt dažādi faktori (piem., pipetēšanas kļūdas, pārāk zema DNS koncentrācija, slikta DNS kvalitāte, PĶR inhibitoru klātbūtne, amplifikatora neprecizitāte), iekšējās pozitīvās kontroles praimeru pāris tiek iekļauts katrā PĶR reakcijā². Iekšējās pozitīvās kontroles praimeru pāris piesaistās saglabātajiem cilvēka augšanas hormona gēna rajoniem, kas atrodas visos cilvēka DNS paraugos. HLA alēles(-ļu) specifiska PĶR produkta klātbūtnē iekšējās pozitīvās kontroles joslas produkts var būt vājš vai tas var nebūt vispār. Specifisku HLA praimeru

pāru veidotie amplikoni ir īsāki par iekšējās pozitīvās kontroles praimeru pāru amplikoniem, bet lielāki par neiekļautajiem praimeriem (skatiet sadaļu “Paredzamās vērtības”).

REAGENTI

A. Identifikācija

Olerup SSP® tipēšanas komplekti satur izžāvētus, iepriekš optimizētus sekvencai specifiskus praimerus HLA alēļu un cilvēka augšanas hormona gēna PQR amplifikācijai, PQR Master Mix ar Taq polimerāzi (“Master Mix”) un pielīmējamām PQR plēvēm.

Praimeru šķīdumi tiek iepriekš sadalīti alikvotās un izžāvēti izgrieztu plānsienu PQR paplāšu 0,2 ml iedobēs. Katras paplātes iedobē atrodas izžāvēts praimeira šķīdums, kas sastāv no specifiska praimeru maisījuma, t. i., alēlei vai grupai specifiskiem HLA praimeriem, kā arī iekšējās pozitīvās kontroles praimeru pāra, kas atbilst nealēļu sekvencēm un ir gatavs DNS parauga, Master Mix un H₂O pievienošanai.

Praimeri paredzēti optimālai PQR amplifikācijai, izmantojot Master Mix un ieteikto DNS ciklēšanas programmu (skatiet sadaļu “Amplifikatora programmēšana”).

Ar katru praimeru maisījumu amplificēto konkrēto HLA alēļu partijai specifiskās interpretācijas un specifitātes tabulas vai darblapu var iegūt tīmekļa vietnē www.caredx.com.

B. Brīdinājumi un piesardzība lietošanā

1. *In vitro* diagnostikai.
2. Šo produktu nevar lietot kā vienīgo pamatu klīniska lēmuma pieņemšanai.
3. **Bioloģiskas bīstamības brīdinājums:** Visi asins produkti jāuzskata par potenciāli infekcioziem. Neviena zināma(-as) testēšanas metode(-as) nevar sniegt garantiju, ka produkti, kas iegūti no cilvēka asinīm, nepārnēsās infekcijas izraisītājus.
4. **Bioloģiskas bīstamības brīdinājums:** Etīdija bromīds, ko izmanto DNS iekrāsošanai, veicot elektroforēzi agarozes gelā, ir kancerogēns. Izmantojiet atbilstošus individuālās aizsardzības līdzekļus.
5. **Uzmanību!** Lietojiet UV starus bloķējošus acu aizsardzības līdzekļus un, apskatot vai fotografējot gelus, neskatieties tieši UV gaismas avotā.
6. Pipetes un citu aprīkojumu, ko izmanto manipulācijām **pēc** PQR, **nedrīkst** izmantot manipulācijām **pirms** PQR.
7. Detalizētu informāciju skatiet drošības datu lapā (www.caredx.com).

C. Lietošanas instrukcija

Skatīt norādes par lietošanu.

D. Uzglabāšanas instrukcijas

Uzglabājiet komplekta sastāvdaļas tumšā vietā un temperatūrā, kas norādīta uz iepakojuma etiķetēm.

Izlietojiet pirms derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz iepakojuma etiķetes.

E. Lietošanai nepieciešamā attīrīšana vai apstrāde

Skatīt norādes par lietošanu.

F. Nestabilitātes indikācijas

1. Neizmantojiet praimeru paplātes, kurās ir plaisas iedobēs vai bojāta iedobju augšējā mala, jo šādi var izraisīt iztvaikošanu PĶR amplifikācijas laikā. Neizmantojiet PĶR vāciņu strēmeles, kurās ir plaisas, jo šādi var izraisīt iztvaikošanu PĶR amplifikācijas laikā.
2. Granulām iedobēs jābūt sarkanām. Ja granulu krāsa ir mainījusies uz dzeltenu, tas var liecināt par degradāciju.
3. Master Mix krāsai jābūt sarkanai vai violetai. Ja granulu krāsa ir mainījusies uz dzeltenu vai oranžu, tas var liecināt par degradāciju.

PRASĪBAS ATTIECĪBĀ UZ INSTRUMENTIEM

A. Instruments

Jāizmanto amplifikators ar šādām minimālām specifikācijām:

- apsildāms vāks ar 104 °C grādu temperatūru darbībai bez eļļas;
- paraugu bloks (no alumīnija, sudraba vai apzeltīta sudraba) lietošanai ar 96 iedobju PQR plati vai 0,2 ml plānsienu reakciju stobriņiem;
- Olerup SSP komplekti ir validēti šādiem amplifikatoriem.
Ieteicamais temperatūras izmaiņu ātrums:
 - GeneAmp 9700: GeneAmp 9700 amplifikators ir iestatīts režīmā 9600. Tas atbilst **parauga temperatūras izmaiņu ātrumam** 1,6 °C/s uz augšu un 0,8 °C uz leju.
 - ProFlex 1x96 iedobju bloks: ProFlex PQR amplifikators ar bloka temperatūras izmaiņu ātrumu 3,0 °C/s (3,0 °C/s katrā solī). **Bloka temperatūras izmaiņu ātrums** 3,0 °C/s atbilst parauga temperatūras izmaiņu ātrumam 1,52 °C/s uz augšu un 1,36 °C uz leju.
 - ProFlex 2x96 iedobju bloks: ProFlex PQR amplifikators ar bloka temperatūras izmaiņu ātrumu 3,0 °C/s (3,0 °C/s katrā solī). **Bloka temperatūras izmaiņu ātrums** 3,0 °C/s atbilst parauga temperatūras izmaiņu ātrumam 1,9 °C/s uz augšu un 1,6 °C uz leju.

Piezīme. Ja temperatūras izmaiņu ātrums ir lielāks par aprakstīto, var tikt ietekmēti tipēšanas rezultāti. Lūdzu, ņemiet vērā, ka ietekme uz tipēšanu dažādiem nevalidētajiem amplifikatoriem, atkarībā no iestatījumiem, var būt dažāda.

- temperatūras diapazons 4,0 °C – 99,9 °C
- temperatūras precizitāte ±0,25 °C diapazonā no 35 °C līdz 99,9 °C
- paraugu bloka temperatūras vienmērīgums ≤0,75 °C diapazonā no 55 °C līdz 95 °C
- temperatūras kalibrēšana izsekojama līdz atsauces standartam (t. i., NIST)

Ieprogramējiet amplifikatoru, izmantojot PQR ciklēšanas parametrus, kas norādīti tālāk B sadaļā.

Specifisku informāciju par amplifikatoru skatiet ražotāja lietotāja rokasgrāmatā. Amplifikatoriem jābūt kalibrētiem atbilstoši ASHI (Amerikas Histosaderības un imunoģenētikas biedrības) vai EFI (Eiropas Imunoģenētikas federācijas) akreditācijas noteikumiem.

Ieprogramējiet amplifikatoru pirms tālāk aprakstīto lietošanas norāžu izpildes.

B. PĶR ciklēšanas parametri

- | | | | | |
|----|--------------------|-------|--------------|--|
| 1. | 1 cikls | 94 °C | 2 min. | denaturācija |
| 2. | 10 cikli | 94 °C | 10 sek. | denaturācija |
| | | 65 °C | 60 sek. | hibridizācija un elongācija |
| 3. | 20 cikli | 94 °C | 10 sek. | denaturācija |
| | | 61 °C | 50 sek. | hibridizācija |
| | | 72 °C | 30 sek. | elongācija |
| 4. | Beigas – glabāšana | 4 °C | Telpas temp. | ja mazāk par 8 stundām ja ilgāk par 8 stundām |

Kopējais reakcijas apjoms katrā iedobē – 10 µl.

Šādus PĶR cikla parametrus izmanto visiem Olerup SSP® komplektiem.

PARAUGU PAŅEMŠANA UN SAGATAVOŠANA

SSP tipēšanai ir nepieciešams ekstrahēts un ļoti tīrs DNS. PĶR-SSP HLA tipēšanai izmantojamie DNS paraugi atkārtoti jāsuspendē dH₂O. Lai nodrošinātu optimālu joslas vizualizāciju elektroforēzes laikā, attiecībai A_{260/280}, mērot ar UV spektrofotometru, jābūt 1,6 – 2,0.

Iesakām automatizētu DNS ekstrahēšanu, izmantojot asins sistēmu QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Kā izejmateriālu jāizmanto ACD asinis.

Vai arī DNS var ekstrahēt, izmantojot jebkuru vēlamo metodi, kas nodrošina tīru DNS. Izmantojot alternatīvas metodes, DNS koncentrācija jāpielāgo uz 30 ng/µl. **Ar šīm metodēm nedrīkst izmantot heparinizētas asinis.**

Ieteicamā DNS koncentrācija, izmantojot:

ar EZ1 ekstrahētu DNS – 15 ng/µl.

ar citām metodēm ekstrahētu DNS – 30 ng/µl.

Ja koncentrācija pārsniedz 50 ng/µl, palielinās nespecifisku amplifikāciju un vāju papildu joslu risks, it īpaši veicot HLA I klases augstas izšķirtspējas SSP tipēšanu. Nepieciešamības gadījumā ekstrahēto DNS atšķaidiet dH₂O.

DNS paraugi ir atkārtoti jāsuspendē šķīdumos, kas satur helātu veidošanās aģentus, piemēram, EDTA, koncentrācijā virs 0,5 mM.

DNS paraugus var izmantot tūlīt pēc ekstrahēšanas vai uzglabāt +4 °C temperatūrā līdz 2 nedēļām bez nelabvēlīgas ietekmes uz rezultātiem. DNS paraugus var glabāt -20 °C vai aukstākā temperatūrā 9 mēnešus. Ilgstoši uzglabātu ekstrahētu DNS paraugu tīrības pakāpe un koncentrācija pirms HLA tipēšanas ir jāpārbauda, lai pārliecinātos, ka tā ir pieņemama.

DNS paraugi jānosūta +4 °C vai aukstākā temperatūrā, lai saglabātu to viengabalainību transportēšanas laikā.

PROCEDŪRA**A. Iepakojumā esošie materiāli**

1. Olerup SSP® praimeru paplātes.
2. Master Mix (atbilstošs apjoms komplekta paplātēm). To pašu Master Mix izmanto visiem Olerup SSP® komplektiem.
3. Pielīmējamās PĶR plēves (atbilstošs skaits komplekta paplātēm).

B. Nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti

1. DNS izdalīšanas komplekts/aprīkojums
2. UV spektrofotometrs
3. Pipetēšanas ierīces. Iesakām elektronisko vienkanāla dozatoru, kas spēj dozēt 10 µl alikvotas, lai pievienotu DNA-Master Mix-dH₂O maisījumu paplātes iedobēs.
4. Vienreizlietojamie pipetes uzgaļi
5. Polipropilēna stobriņi
6. Virpuļmaisītājs
7. Mikrocentrifūga
8. PĶR paplāšu statīvs
9. Amplifikators ar apsildāmu vāku, kas paredzēts PĶR ar 96 iedobju formātu, temperatūras gradientu sildīšanas blokā ≤ 0,75 °C, un paplāti/turētāju 0,2 ml plānsienu reakcijas iedobēm
10. Mikroviļņu krāsns vai sildvirsmas agarozes šķīdumu sildīšanai
11. Elektroforēzes klases agaroze, piem., FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE buferšķīdums; 1 x TBE buferšķīdums ir 89 mM tris-borāts, 2 mM dinātrijs EDTA, pH 8,0
13. Etīdija bromīda pilinātāja pudele produkta Nr. 103.301-10 vai GelRed pilinātāja pudele, produkta Nr. 103.302-05
14. Pipetēšanas ierīce uznešanai uz gela. Iesakām 8 kanālu pipeti uznešanai uz gela, 5–25 µl regulējams apjoms
15. DNS izmēra marķieris diapazonam 50 – 1000 bp, piem., 100 bāzes pāru garuma marķieris, DNS izmēra marķieris, produkta Nr. 103.202-100 vai DNS izmēra marķieris īsajiem gela cikliem 103.203-100
16. Elektroforēzes aparāts / barošanas bloks
17. UV transiluminators
18. Fotografiju vai attēlu dokumentācijas sistēma

C. Procedūra soli pa solim

Skatīt norādes par lietošanu.

NORĀDES PAR LIETOŠANU

A. Parauga sagatavošana

1. Attīriet genoma DNS no leukocītu parauga, izmantojot izvēlēto metodi, skatiet augstāk sadaļu "Paraugu paņemšana un sagatavošana".
2. Specifisku informāciju par parauga sagatavošanu un uzglabāšanu, skatiet augstāk sadaļā "Paraugu paņemšana un sagatavošana".
3. Attīrītajam DNS paraugam veiciet PĶR amplifikāciju, izmantojot *Olerup SSP*® tipēšanas paplāti, vai uzglabāiet DNS paraugu līdz būsiat gatavi veikt tipēšanu.

B. Reaģentu/aprīkojuma sagatavošana

1. Ieprogramējiet amplifikatoru uz *Olerup SSP*® PĶR programmu, skatiet augstāk sadaļu "Prasības attiecībā uz instrumentiem – PĶR ciklēšanas parametri".
2. Sagatavojiet elektroforēzes gelu, skatiet tālāk C sadaļu – "**Sagatavošanās gela elektroforēzei**".

C. Sagatavošanās gela elektroforēzei

Olerup SSP® gela sistēma 96 (produkta Nr. 103.101-01)

1. Sagatavošana

- Nolīmeņojiet liešanas kameru 1 gelam (produkta Nr. 103.101-31) vai liešanas kameru 3 geliem (produkta Nr. 103.101-33), izmantojot burbuļa līmeņrādi un trijkāji ar regulējamu augstumu.
- Ievietojiet gela paplāti(-es) liešanas kamerā.

2. 2% (w/v) agarozes gela sagatavošana

Izmantojiet augstas kvalitātes elektroforēzes klases gelu, kas spēj izšķīrt 50 – 2000 DNS bāzes pāru fragmentus.

- 5 ml 10 x TBE (tris-borāta EDTA) buferšķīdumam pievienojiet 150 ml destilēta ūdens un 2 g agarozes 500 ml stikla pudelē.
- Izšķīdiniet agarozī, vārot to mikroviļņu krāsnī līdz izveidojas 100 ml viendabīgs šķīdums.
- Ļaujiet atšķaidītā gela šķīdumam atdzist līdz 60 °C, piem., sildīšanas skapī.
- Pirms liešanas iekrāsojiet gelu ar etīdija bromīdu (10 mg/ml) – 5 µl uz 100 ml gela šķīduma. Vienkāršības labad izmantojiet mūsu etīdija bromīda pilinātāju pudeli (produkta Nr. 103.301-10). **Piezīme. Etīdija bromīds ir kancerogēns. Izmantojiet atbilstošus individuālās aizsardzības līdzekļus.**
- Ielejiet 100 ml gela šķīduma liešanas kameras gela paplātē. Novietojiet 6 gela ķemmes (produkts Nr. 103.101-21) gela paplātes spraugās.
- Ļaujiet gelam sacietēt 15 minūtes.
- Ielejiet gela tvertnē 750 ml 0,5 x TBE buferšķīduma. Iemērciet gela paplāti gela kastītē un uzmanīgi izņemiet 6 gela ķemmes, paceļot tās.

Izmantojot alternatīvas elektroforēzes sistēmas, ievērojiet ražotāja instrukcijas. Lai izmantotu ar *Olerup SSP*® HLA tipēšanas komplektiem, šo sistēmu PĶR produktu izšķīrtspējai jābūt no 50 līdz 1100 bāzes pāriem pēc izmēra.

D. Pakāpeniska procedūra

1. Izņemiet no norādītās(-ām) uzglabāšanas temperatūras(-ām): atbilstošu DNS paraugu skaitu, praimeru paplāti(-es) un izvēlētajam DNS paraugam(-iem)/praimeru paplātei(-ēm) nepieciešamo Master Mix apjomu. Atkausējiet istabas temperatūrā (20–25 °C).

To pašu Master Mix izmanto visiem Olerup SSP® komplektiem.

2. Īslaicīgi pamaisiet DNS paraugu(-s) ar virpuļmaisītāju.
3. Ievietojiet praimeru paplāti(-es) PKR paplāšu statīvā.
4. **Zemas un augstas izšķirtspējas komplekti**
 - Pirms alikvotu paņemšanas samaisiet Master Mix, izmantojot virpuļmaisītāju.
 - Izmantojot manuālo vienkanāla pipeti, 0,5 ml vai 1,5 ml stobriņā pievienojiet istabas temperatūras Master Mix un dH₂O. (Atbilstošos daudzumus skatiet tālāk 1. tabulā.)
 - Uzlieciet stobriņam vāciņu un maisiet virpuļmaisītājā 5 sekundes. Vibrocentrifugējiet stobriņu mikrocentrifūgā, lai viss šķidrums no stobriņa sāniem notecētu uz leju.
 - Izmantojot manuālo vienkanāla pipeti, praimeru paplātes negatīvās kontroles iedobē, t. i., iedobe ar negatīvās kontroles praimeru pāriem, pievienojiet 8 µl Master Mix – dH₂O maisījuma un 2 µl dH₂O.
 - Izmantojot manuālo vienkanāla pipeti, pievienojiet istabas temperatūras DNS paraugu atlikušajā Master Mix – dH₂O maisījumā. (Atbilstošos daudzumus skatiet tālāk 1. tabulā.)
 - Uzlieciet stobriņam vāciņu un maisiet virpuļmaisītājā 5 sekundes. Vibrocentrifugējiet stobriņu mikrocentrifūgā, lai viss šķidrums no stobriņa sāniem notecētu uz leju.
 - Izmantojot elektronisko vienkanāla dozatoru, katrā iedobē, izņemot praimeru paplātes negatīvās kontroles iedobi, ievietojiet parauga reakcijas maisījuma 10 µl alikvotu.

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

1. tabula. Katram testam nepieciešamie sastāvdaļu apjomi dažādiem iedobju skaitiem, izmantojot Master Mix.

| Iedobju skaits vienā testā | Master Mix apjoms (µl) | DNS parauga apjoms (µl) | dH ₂ O apjoms (µl) | Iedobju skaits vienā testā | Master Mix apjoms (µl) | DNS parauga apjoms (µl) | dH ₂ O apjoms (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 |

Augstāk norādītajos ieteicamajos apjomos ir iekļauts apjoms pipešu variāciju un šķidruma zudumu uz stobriņu iekšējām sienām kompensēšanai.

5. Kombinētie komplekti A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ un DQA-DQB-DR Enhanced un HLA-C augstas izšķirtspējas komplekts bieži sastopamām alēlēm

- Samaisiet Master Mix ar virpuļmaisītāju.
- Izmantojot manuālo vienkanāla pipeti, pievienojiet istabas temperatūras 520 µl dH₂O nodrošinātajā 1,5 ml stobriņā, kurā jau atrodas 312 µl Master Mix.
- Uzlieciet stobriņam vāciņu un maisiet virpuļmaisītājā 5 sekundes. Vibrocentrifugējiet stobriņu mikrocentrifūgā, lai viss šķidrums no stobriņa sāniem notecētu uz leju.
- Izmantojot manuālo vienkanāla pipeti, negatīvas kontroles iedobē Nr. 96, t. i., iedobe ar negatīvās kontroles praimeru pāriem, pievienojiet 8 µl Master Mix – dH₂O maisījuma un 2 µl dH₂O.
- Izmantojot manuālo vienkanāla pipeti, pievienojiet istabas temperatūras 206 µl DNS paraugu atlikušajā Master Mix – dH₂O maisījumā.

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

- Uzlieciet stobriņam vāciņu un maisiet virpuļmaisītājā 5 sekundes. Vibrocentrifugējiet stobriņu mikrocentrifūgā, lai viss šķidrums no stobriņa sāniem notecētu uz leju.
- Izmantojot elektronisko vienkanāla dozatoru, katrā praimera paplātes iedobē, izņemot negatīvās kontroles iedobi Nr. 96, ievietojiet parauga reakcijas maisījuma 10 µl alikvotu.

Svarīgi!

Pārliecinieties, ka paraugs tiek uzklāts virs praimeriem (izžāvēti katras praimeru paplātes iedobes apakšā), lai izvairītos no iedobju savstarpējas piesārņošanas. Pieskarities iedobes iekšējai sienuīnai ar pipetes uzgali, lai ļautu paraugam noslīdēt uz iedobes apakšu. Pārliecinieties, ka visi paraugi ir nosēdušies katras iedobes apakšā. Ja nē, viegli pasitiet ar paplāti pa galda virsmu, lai visi paraugi nesēdinātos iedobes apakšā pirms PĶR uzsākšanas.

6. Pārklājiet praimeru paplāti(-es) ar nodrošinātajām pielīmējamām PĶR plēvēm. Pārliecinieties, ka visas reakcijas iedobes ir pilnīgi pārklātas, lai PĶR amplifikācijas laikā nepieļautu zudumus iztvaikošanas dēļ. Uz pielīmējamām PĶR plēvēm var uzlikt spiedošo spilventiņu *Olerup SSP® Compression Pad* (produkta Nr. 103.505-06), lai nepieļautu iztvaikošanos termiskās ciklēšanas laikā.
7. Ievietojiet praimeru paplāti(-es) amplifikatorā ar piemērotu stobriņa-paplātes adapteru. Nepieļaujiet vairāk nekā 5 minūšu aizkavi starp PĶR iestatīšanu un termisko ciklēšanu.
8. Ievadiet savu *Olerup SSP®* programmas numuru. Norādiet 10 µl reakcijas apjomu.
9. Sāciet PĶR programmu. Programma ilgst aptuveni 1 stundu un 20 minūtes.
10. Izņemiet praimeru paplāti(-es) no amplifikatora. Pārbaudiet PĶR paplāti, lai pārliecinātos, ka katrā PĶR iedobē ir aptuveni vienāds šķidruma daudzums. Veiciet paraugu elektroforēzi, skatiet tālāk E sadaļu – “Gēla elektroforēze”. Interpretējiet tipēšanas rezultātus, izmantojot **partijai specifiskas interpretācijas un specifitātes tabulas vai darblapu**, skatiet tālāk sadaļu “Paredzamās vērtības”.

E. Gela elektroforēze

1. Pēc PĶR reakcijas pabeigšanas pagrieziet praimeru paplāti un gela kastīti. Iedobju secība ir no kreisās puses uz labo un no augšas uz apakšu.
2. Uzmanīgi noņemiet strēmeļu vāciņus, neizlejot PĶR produktus.
3. Pēc kārtas uznesiet PĶR produktus 2% agarozes gelā. (Papildu buferšķīdumu uznešanai uz gela nav jāpievieno.) Uznešanai uz gela ieteicams izmantot 8 kanālu pipeti.
4. Uznesiet DNS izmēra marķieri (100 bāzes pāru garuma marķieri, DNS izmēra marķieri, produkta Nr. 103.202-100 vai DNS izmēra marķieri īsajiem gela cikliem 103.203-100) vienā iedobē katrā rindā.
5. Aizveriet gela kastīti ar gela kastītes vāciņu.
6. Veiciet gela elektroforēzi 0,5 x TBE buferšķīdumā, bez buferšķīduma recirkulācijas, 15–20 minūtēs ar ātrumu 8–10 V/cm.
7. Pārvietojiet gela paplāti ar gelu uz UV transiluminatoru.
8. Nofotografējiet gelu ar vai bez gela paplātes.
9. Atzīmējiet fotogrāfiju atbilstoši laboratorijas noteikumiem.

KVALITĀTES KONTROLE

ASHI HLA testēšanas vadlīnijās norādīts, ka katrā PĶR iestatījumā jābūt iekļautai negatīvās (piesārņojuma) kontroles iedobei. (Pārskatītie standarti akreditētām laboratorijā, Amerikas Histosaderības un imunoģenētikas biedrība, apstiprināja CMS: 2021. gada 16. februārī). Negatīvās kontroles iedobe ir iekļauta visos komplektos, izņemot HLA-B*27 – vienības devas un HLA-B*27 vienas iedobes komplektus.

Skatiet sadaļu “Gela elektroforēze”, 14. lappuse.

REZULTĀTI

Partijai specifisku šūnu līnijas validācijas lapām un analīzes sertifikātam var piekļūt tiešsaistē: www.caredx.com.

PROCEDŪRAS IEROBEŽOJUMI

1. PĶR-SSP procesa veikšanai ir nepieciešami stingri kontrolēti testa noteikumi, lai nodrošinātu piemērotu atšķirīgu amplifikāciju. Ir stingri jāievēro lietošanas instrukcijā aprakstītā procedūra.
2. Ekstrahētais DNS paraugs ir veidne specifiskam PĶR amplifikācijas procesam. Lai nodrošinātu optimālu joslas vizualizāciju elektroforēzes laikā, attīrītā DNS attiecībai $A_{260/280}$ jābūt no 1,6 līdz 2,0.
3. Visiem instrumentiem, piem., amplifikatoram, pipetēšanas ierīcēm, jābūt kalibrētiem atbilstoši ražotāja ieteikumiem.
4. Partijai specifiska informācija ir sniegta produkta lietošanas instrukcijā: Partijai specifiskā informācijā un partijai specifiskā darblapā.
5. Pamatojoties uz veikto testēšanu, ar trim (3) ekstrahēšanas metodēm tika novērtētas šādas vielas norādītajās koncentrācijās, un ietekme uz testa veikspēju netika atklāta.

| | | |
|--|-------------------------|--|
| | Traucējošā viela | |
|--|-------------------------|--|

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

| Ekstrahēšanas metode | | Traucējošā koncentrācija* |
|-----------------------------|--------------|----------------------------------|
| EZ1 DSP DNA Blood System | Bilirubīns | 200 mg/l |
| | Hemoglobīns | 200 g/l |
| | Triglicerīds | 30 g/l |
| | Olbaltums | 110 g/l |
| QIAamp DSP DNA Blood Kit | Bilirubīns | 200 mg/l |
| | Hemoglobīns | 200 g/l |
| | Triglicerīds | 18,2 g/l |
| | Olbaltums | 77 – 96 g/l |
| Gentra PureGene metode | Bilirubīns | 200 mg/l |
| | Hemoglobīns | 200 g/l |
| | Triglicerīds | 18,2 g/l |
| | Olbaltums | 119 – 146 g/l |

6. PĶR plates ir fiziski saderīgas ar lielāko daļu tirgū pieejamo amplifikatoru. Skatiet tālāk norādīto amplifikatora plastmasas saderības tabulu.
Piezīme. Tabulai ir tikai orientējoša rakstura nozīme. Validētos amplifikatorus, lūdzu, skatiet sadaļā “Prasības attiecībā uz instrumentiem – Instruments”.

| Saderības tabula | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Ražotājs | Amplifikators |
| Applied Biosystems | GeneAmp 9700 |
| | ProFlex 96 iedobes |
| | ProFlex 2x96 iedobes |
| | Veriti 0,2 ml 96 iedobju bloks |
| | GeneAmp 2700, 2720, 9600 |
| | |
| Agilent (Stratagene) | SureCycler 8800 |
| | RoboCycler |
| | Gradient Cycler |
| | |
| Biometra | Uno, Uno II |
| | T1 amplifikators |
| | TGradient/TAdvanced |
| | TRobot |
| | TProfessional |
| Bio-Rad | MJ Mini |
| | T100 |
| | iCycler, MyCycler |
| | C1000, S1000 |
| | PTC-2(xx) |
| | PTC-100 ar 96 iedobju bloku |
| 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 |

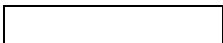
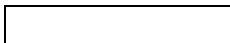
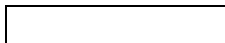






PAREDZAMĀS VĒRTĪBAS

A. Datu analīze

Uzmanīgi izpētiet gela fotogrāfiju un nosakiet pozitīvās joslas.

1. Ja specifiska(-s) HLA alēle(-s) tika amplificēta(-s), gela joslā būs redzama ātrāk migrējoša, īsāka josla. Tas norāda uz pozitīvu testa rezultātu.
 - a. Pierakstiet specifisku PĶR produktu klātbūtni un neesamību.
 - b. Interpretējot gela rezultātus, ir lietderīgi novērot specifisku PĶR produktu relatīvos garumus, kuri ir doti partijai specifiskās produktu lietošanas instrukcijās. Vairākām līnijām ir divi vai vairāki iespējami specifisku PĶR produktu garumi. Šīs iedobes satur vairākus praimeru pārus, kas ģenerē dažādu izmēru PĶR produktus atkarībā no DNS parauga HLA alēles(-ēm).
 - c. Atrodiet atbilstošu gela joslu izkārtojumu ar specifiskiem PĶR produktiem partijai specifiskajās interpretācijas un specifitātes tabulās, lai iegūtu DNS parauga HLA tipēšanu.
2. Iekšējās pozitīvās kontroles joslai, kura ir lēnāk migrējoša un garāka, jābūt redzamai visās gela līnijās, izņemot negatīvās kontroles gela joslu, tādējādi liecinot par veiksmīgu amplifikācijas kontroli. Pozitīvās gela līnijās iekšējās pozitīvās kontroles josla var būt vāja vai tās var nebūt vispār.
 - a. Pierakstiet iekšējās pozitīvās kontroles joslu klātbūtni un relatīvos garumus. Dažāda izmēra kontroles joslas palīdzēs pareizi orientēt tipēšanu, kā arī identificēt komplektu.
 - b. Iekšējās pozitīvās kontroles joslas bez specifiskiem PĶR produktiem neesamība norāda, ka PĶR reakcija nav notikusi.
 - i. Ja HLA alēles var noteikt nenotikušās(-o) PĶR reakcijas(-u) klātbūtnē un nenotikušā(-s) PĶR reakcija(-s) nemaina alēles piederību, tests nav jāatkārto.
 - ii. Ja tomēr nenotikušā(-s) PĶR reakcija(-s) var mainīt HLA alēles piederību, tipēšana ir obligāti jāatkārto.
3. Specifisku PĶR produktu vai iekšējās pozitīvās kontroles joslas klātbūtne negatīvās kontroles joslā(-s) norāda uz piesārņojumu ar PĶR produktu(-iem) un padara visus testa rezultātus par nederīgiem. Negatīvās kontroles līnijā(-s) var novērot praimeru oligomērus, kuru izmērs ir 40–60 bāzes pāri. Tas nav uzskatāms par piesārņojumu.

B. Gela interpretācija

| | Pozitīva reakcija | Negatīva reakcija | Nenotikusi PĶR reakcija |
|------------------------------------|---|---|---|
| Iedobe |  |  |  |
| Iekšējās pozitīvās kontroles josla |  |  | |
| Specifiska josla |  | | |
| Praimeru josla |  |  |  |

1. DNS izmēra marķieri (100 bāzes pāru garuma marķieri, DNS izmēra marķieri, produkta Nr. 103.202-100 vai DNS izmēra marķieri īsajiem gela cikliem 103.203-100) jāievieto vienā iedobē katrā gela rindā vai atbilstoši vietējās laboratorijas akreditācijas noteikumiem.
2. Var tikt iegūtas joslas, kas garākas par iekšējās pozitīvās kontroles joslu, bet tās tipēšanas rezultātu interpretācijā ir jāignorē.
3. Neizlietotie praimeri veidos difūzu joslu, kas īsāka par 50 bāzes pāriem.
4. Var tikt novēroti praimeru oligomēru artefakti. Tie ir garāki nekā praimeru josla, bet īsāki nekā specifiskas joslas.

SPECIFISKS DARBĪBAS RAKSTUROJUMSKomplekta partijas kvalitātes kontrole

Katrs praimeru šķīdums tiek testēts attiecībā pret 48 DNS paraugu paneli no IHWC labi raksturotām šūnu līnijām, skatiet partijai specifisku(-as) šūnu līnijas validācijas lapu(-as) produkta lietošanas instrukcijā – Partijai specifiska informācija.

1. metožu salīdzināšanas pētījums

Tas bija daudzcentru pētījums, kurā tika novērtēta Olerup SSP® DR zemas izšķirtspējas tipēšanas komplekta un One Lambda Micro SSP™ HLA DNS tipēšanas paplātes sakritība trīs klīniskajās laboratorijās ASV.

Olerup SSP® DR zemas izšķirtspējas tipēšanas komplekta un One Lambda Micro SSP™ HLA DNS tipēšanas paplātes analizētie tipēšanas rezultāti parādīja 98,4% (123 / 125; 95% CI: 94,3 – 99,8) sakritību, bet divi neviennozīmīgie Olerup rezultāti tika novērtēti kā pretrunīgi. Sakritība bija 100% (123 / 123; 95% CI: 97,1 – 100),

kad *Olerup* neviennozīmīgie rezultāti nebija iekļauti analīzē, kas atspoguļo normālu klīnisko praksi.

2. metožu salīdzināšanas pētījums

Šī pētījuma mērķis bija demonstrēt HLA alēles (A, B, C, DQ) zemas izšķirtspējas tipēšanas rezultātu sakritību, rezultātus iegūstot ar pētāmajiem *Olerup SSP®* HLA tipēšanas komplektiem un references One Lambda LABType SSO komplektiem. ACD pilnasiņu asins paraugi tika paņemti no 95 pacientiem 3 klīniskajos centros ASV. Tika veikta DNS ekstrahēšana, un rezultātā iegūtais attīrītais DNS tika testēts ar pētāmo *Olerup SSP®* un references One Lambda LabType SSO HLA metodi.

I klases alēļu vispārējā sakritība bija 99,6% (278 / 279; 95% CI: 98,0 – 100). II klase alēļu sakritība bija 100% (94 / 94; 95% CI: 96,2 – 100).

1. tabula

Olerup SSP® un One Lambda SSO rezultātu vispārējā sakritība I klases un II klases alēlēm.

| HLA lokuss | Kopā | |
|------------------------------|-----------|----------------------|
| | n/N | % sakritība (95% CI) |
| A | 95 / 95 | 100 (96,2 – 100) |
| B | 90 / 90 | 100 (96,0 – 100) |
| C | 93 / 94 | 98,9 (94,2 – 100) |
| Visi I klases lokusi | 278 / 279 | 99,6 (98,0 – 100) |
| II klases lokusi (DQ) | 94 / 94 | 100 (96,2 – 100) |

Komplekta rezultāta reproducējamības pētījums.

Šajā pētījumā *Olerup SSP®* HLA tipēšanas rezultāti tika salīdzināti starp trim HLA testēšanas laboratorijām, izmantojot 10 labi raksturotu DNS paraugu paneli, kura konsensa rezultāti ir iekļauti UCLA HLA DNS bankā HLA I klasei (A, B un C), plaši izplatītām II klases alēlēm (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* un DQB1*) un mazāk pētītām II klases alēlēm (DQA1*, DPA1* un DPB1*).

2. tabula. Olerup SSP® HLA komplekta reproducējamības pētījuma rezultātu kopsavilkums

| HLA alēles veids | Tipēšanas precizitāte % n/N 95% tic. intervāls (LL, UL) | |
|--|---|--|
| | <i>Neviennozīmīgais rezultāts, kas tika novērtēts kā pretrunīgs</i> | <i>Neviennozīmīgais rezultāts, kas tika novērtēts kā nenoteikts un tika izslēgts no analīzes</i> |
| <i>I klases zemas izšķirtspējas (A un B kopā)</i> | 98,3 (59/60) 91,1, 100 | 100 (59/59) 93,9, 100 |
| <i>I klases augstas izšķirtspējas (A, B un C kopā)</i> | 94,7 (142/150) 89,8, 97,7 | 98,6 (142/144) 95,1, 99,8 |
| <i>II klases zemas izšķirtspējas (DRB1* un DRB3*/DRB4*/DRB5*)</i> | 100 (60/60) 94,0, 100 | 100 (60/60) 94,0, 100 |
| <i>II klases augstas izšķirtspējas – plaši izplatītas alēles (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* un DQB1*)</i> | 98,3 (118/120) 94,1, 99,8 | 100 (118/118) 96,9, 100 |
| <i>II klases augstas izšķirtspējas Mazāk pētītas alēles (DQA1*, DPA1* un DPB1*)</i> | 83,3 (75/90) 74,0, 90,4 | 86,2 (75/87) 77,2, 92,7 |

Šajā pētījumā tika izmantots desmit (10) DNS paraugu panelis ar labi raksturotiem HLA tipēšanas rezultātiem.

Zemāka sakritība, kas novērota mazāk pētītām II klases augstas izšķirtspējas alēlēm, atspoguļo lielāku nenoteiktību UCLA DNS paraugu “konsensa rezultātos”, ņemot vērā, ka par DQA1*, DPA1* un DPB1* alēļu sekvencēm ir pieejama nepilnīga informācija. 9 no 11 pretrunīgiem rezultātiem, kas novēroti reproducējamības pētījumā (DQA1*0505 izsaukums no Olerup SSP® pret DQA1*0501 “konsensa tipēšanu”) visi

trīs testēšanas centri nonāca pie viena rezultāta, kas norāda uz konsekventu Olerup DQA1* komplekta veiktspēju.

BIBLIOGRĀFIJA

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. Aktuāla informācija par HLA alēlēm ir atrodama šeit: www.ebi.ac.uk/imgt/hla

PROBLĒMU NOVĒRŠANA

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|--|--|---|
| Nav amplifikācijas (ne iekšējās kontroles fragmentu, ne specifiskas amplifikācijas). | Pārāk mazs DNS daudzums. | Izmēriet DNS koncentrāciju un pārlicinieties, ka pievienotais daudzums ir pareizs. RNS piesārņojums var izraisīt DNS koncentrācijas spektrofotometrisku pārvērtēšanu. Uzmanīgi atkārtojiet DNS ekstrahēšanu, izmantojot svaigi pagatavotus šķīdumus. Iesakām automatizētu DNS ekstrahēšanu, izmantojot asins sistēmu QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | DNS satur PĶR inhibitorus, piemēram, olbaltumvielas, etanolu (no nosēdināšanas darbībām), atlikušās matricas no cietās fāzes DNS attīrīšanas produktiem. | Mēriet DNS kvalitāti. Iesakām A260/A280 attiecību 1,6 – 2,0, mērot ar UV spektrofotometru. Precīzi ievērojiet piegādātāja DNS ekstrahēšanas protokolu. Atkārtoti ekstrahējiet DNS. Iesakām automatizētu DNS ekstrahēšanu, izmantojot asins sistēmu QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | DNS ir ekstrahēta no heparinizētām asinīm. | Izmantojiet neheparinizētas asinis vai izmantojiet heparinizētām asinīm paredzētus DNS ekstrakcijas protokolus. |
| | DNS ir izšķīdināta buferšķīdumā, kas satur EDTA. | Atkārtojiet DNS ekstrahēšanu un atšķaidiet DNS, izmantojot dH ₂ O. |

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|--|---|---|
| Turpinājums: Nav amplifikācijas (ne iekšējās kontroles fragmentu, ne specifiskas amplifikācijas). | Nejauša balinātāja ievadīšana testā. | Pārskatiet zonas, kurās varētu būt ievadīts balinātājs. |
| | Komplekti nav uzglabāti atbilstošā temperatūrā. | Uzglabājiet komplektus - 20 °C temperatūrā. |
| | Amplifikators nedarbojas pareizi. | Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, ko ikdienā izmanto PĶR-SSP tipēšanai, jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem. |
| | Nepietiekama amplifikatora sildīšanas bloka un SSP tipēšanas paplātes saskare. | Izmantojiet pareizo paplāti/turētāju 0,2 ml plānsienu reakcijas iedobēm, skatiet amplifikatora rokasgrāmatu. |
| Nejauša amplifikācijas kļūme (pārtraukumi). | Ja PĶR plēves/PĶR stobriņu vāciņi nav cieši aizvērti, notiks iztvaikošanās un amplifikācijas kļūme. | Pārlicinieties, ka PĶR plēves/visi stobriņu vāciņi ir cieši aizvērti. Uz pielīmējamām PĶR plēvēm var uzlikt spiedošo spilventiņu <i>Olerup SSP® Compression Pad</i> (produkta Nr. 103.505-06), lai nepieļautu iztvaikošanos termiskās ciklēšanas laikā. |
| | Kļūdas, veicot uznešanu uz gela. | Pārbaudiet, ka ir piepildīts pareizs iedobju skaits un katrā iedobē atrodas aptuveni vienāds PĶR maisījuma daudzums. |
| | Nekalibrētu pipešu lietošana. | Regulāri kalibrējiet visas pipetes saskaņā ar piegādātāja ieteikumiem. |
| | Pipetēšanas kļūdas. | Rūpīgāk veiciet pipetēšanu. |
| | Pirms lietošanas Master Mix un DNS paraugs nav pareizi samaisīti. | Pirms lietošanas ātri samaisiet, izmantojot virpuļmikseri. Mēs iesakām veikt maisīšanu |

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|---|---|---|
| | | ar virpuļmikseri pēc katras rindas. |
| | Iedobēs pievienots nevienmērīgs DNS-master mix maisījuma tilpums. | Rūpīgāk veiciet pipetēšanu. |
| Vāji iekšējās kontroles fragmenti. | Piesārņota DNS. | Mēriet DNS kvalitāti. Attiecībai A _{260/280} , mērot ar UV spektrofotometru, jābūt 1,6 – 2,0. RNS piesārņojums var izraisīt DNS koncentrācijas spektrofotometrisku pārvērtēšanu. Degradēta DNS izraisa izsmērēšanos gela joslās. Uzmanīgi atkārtojiet DNS ekstrahēšanu, izmantojot svaigi pagatavotus šķīdumus. Iesakām automatizētu DNS ekstrahēšanu, izmantojot asins sistēmu QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | Pārāk mazs DNS daudzums. | Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet uz 30 ng/μl vai 15 ng/μl ar QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System ekstrahētajam DNS. RNS piesārņojums var izraisīt DNS koncentrācijas spektrofotometrisku pārvērtēšanu. Degradēta DNS izraisa izsmērēšanos gela joslās. Uzmanīgi atkārtojiet DNS ekstrahēšanu, izmantojot svaigi pagatavotus šķīdumus. |

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|--|---|---|
| | | Iesakām automatizētu DNS ekstrahēšanu, izmantojot QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| Turpinājums: Vāji iekšējās kontroles fragmenti. | Pārāk augsta hibridizācijas temperatūra, amplifikators nav kalibrēts. | Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, ko ikdienā izmanto PĶR-SSP tipēšanai, jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem. |
| | PĶR Master Mix tika uzglabāts +4 °C temperatūrā ilgāk nekā 2 nedēļas. | Pareizi uzglabājiet PĶR Master Mix. |
| Nespecifiska amplifikācija (garuma marķieri vai izsmērēšana). | Pārāk liela DNS parauga izmantošana. | Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet uz 30 ng/μl vai 15 ng/μl ar QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System ekstrahētajam DNS. Dažiem praimeru šķīdumiem ir lielāka tendence izraisīt nespecifisku amplifikāciju, skatiet piezīmes katrā partijai specifiskā specifitātes tabulā. |
| | Piesārņota DNS. | Interpretējot iegūtos rezultātus, visi fragmenti, kas lielāki par iekšējās kontroles fragmentu, nav jāņem vērā. Pārbaudiet DNS kvalitāti. Atkārtojiet DNS ekstrahēšanu. Iesakām automatizētu DNS ekstrahēšanu, izmantojot asins sistēmu QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Dažiem praimeru šķīdumiem ir lielāka tendence izraisīt |

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|--|---|---|
| | | nespecifisku amplifikāciju, skatiet piezīmes katrā partijai specifiskā specifitātes tabulā. |
| Arvien vājāki amplifikācijas signāli laika gaitā. | Etīdija bromīda agarozes gela iekrāsojošais šķīdums ir vecs. | Pagatavojiet svaigu etīdija bromīda šķīdumu, lai sasniegtu labāku agarozes gela iekrāsošanu un labāku signālu. Ja agarozes gels ir normāli iekrāsots, praimeru mākoņus ir viegli noteikt. |
| | Viena no UV lampām ir bojāta. | Pārbaudiet UV apgaismojuma aprīkojumu. Ja ar UV apgaismojumu viss ir kārtībā, praimeru mākoņus ir viegli noteikt. |
| | Izmantots pārāk mazs DNS paraugs. | Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet uz 30 ng/μl vai 15 ng/μl ar QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System ekstrahētajam DNS. |
| | Pārāk augsta hibridizācijas temperatūra, amplifikators nav kalibrēts. | Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, ko ikdienā izmanto PĶR-SSP tipēšanai, jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem. |
| Savādi amplifikācijas modeļi. | Tiek izmantota nepareiza partijai specifiska interpretācijas tabula / darblapa. | Pārbaudiet izmantotā produkta partijas numuru un izmantoto interpretācijas tabulu / darblapu. |
| | Nepareiza secība, veicot uznešanu uz gela. | Pārbaudiet maisījumu un gela joslu izvietojumu. |
| | Amplifikācijas modelis satur kļūdaini pozitīvu elementu. | Skatiet tālāk. |

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|---|--|---|
| | Amplifikācijas modelis satur kļūdaini negatīvu elementu. | Skatiet tālāk. |
| Kļūdaini pozitīvas amplifikācijas. | DNS piesārņojums. | Izmantojiet cimodus, pipetes uzgaļus ar barjerām (filtra aizbāžņiem), kā arī apstrādi pirms un pēc PĶR veiciet dažādās telpās. Nodrošiniet precīzu visu paraugu apstrādi visos posmos. Pārbaudiet, vai nav piesārņojuma, izmantojot <i>Olerup SSP® Wipe Test</i> komplektu. |
| | Piesārņota DNS. | Mēriet DNS kvalitāti. Precīzi ievērojiet piegādātāja DNS ekstrahēšanas protokolu. Izmēģiniet citas DNS ekstrahēšanas sistēmas. Atkārtoti ekstrahējiet DNS. Iesakām automatizētu DNS ekstrahēšanu, izmantojot QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. |
| | Pārāk liela DNS parauga izmantošana. | Izmēriet DNS koncentrāciju un noregulējiet uz 30 ng/μl vai 15 ng/μl ar QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System ekstrahētajam DNS. |
| | Pārāk zema hibridizācijas temperatūra. | Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PĶR programmu. Amplifikators, ko ikdienā izmanto PĶR-SSP tipēšanai, jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem. |
| | Pārmērīga aizkave starp PĶR iestatīšanu un | Nepieļaujiet vairāk nekā 5 minūšu aizkavi pirms termiskās ciklēšanas. |

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|--|---|--|
| | termiskās ciklēšanas sākšanu. | |
| | Aizkave starp tipēšanas paplātes ievietošanu amplifikatorā un ciklēšanas sākšanu. | Izmantojiet iepriekš sasildītu amplifikatoru. |
| Turpinājums: Kļūdaini pozitīvas amplifikācijas. | Pārāk liela etīdija bromīda daudzuma izmantošana. | Izmantojiet ieteicamo etīdija bromīda daudzumu. |
| | Artefakta kā specifiskas joslas nepareiza interpretācija. | Pārbaudiet pareizu joslas izmēru partijai specifiskā interpretācijas tabulā / darblapā un specifitātes tabulā un piezīmēs. |
| | Amplifikācijas modelis satur kļūdaini pozitīvu elementu. | Pārbaudiet, vai visām specifiskām amplifikācijām ir pareizs izmērs un vai artefakts (pārnešana, praimera dimērs) netika nepareizi interpretēts kā amplifikācija. |
| | Nepareiza secība, veicot uznešanu uz gela. | Pārbaudiet maisījumu un gela joslu izvietojumu. |
| Kļūdaini negatīvas amplifikācijas. | Amplifikators nav pareizi kalibrēts. | Kalibrējiet amplifikatoru un pārbaudiet PQR programmu. Amplifikators, ko ikdienā izmanto PQR-SSP tipēšanai, jākalibrē ik pēc 6–12 mēnešiem. Ja atkārtota kalibrēšana neatrisina problēmu, veiciet testa atkārtotu tipēšanu, izmantojot references paraugu ar tādu pašu specifitāti. Ja tiek apstiprināts negatīvs rezultāts, sazinieties ar klientu atbalsta dienestu. |
| | Nepareiza secība, veicot uznešanu uz gela. | Pārbaudiet maisījumu un gela joslu izvietojumu. |

Lietošanas instrukcija
Olerup SSP® HLA tipēšanas komplekti ar Taq polimerāzi

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|---|--|--|
| Vispārējās problēmas ar gelu (izplūdis gels un/vai izsmērētas joslas). | Degradējies DNS paraugs. | Gela joslās parādās kā izsmērēta vieta. Izdaliet DNS no svaiga parauga. |
| | Daudz svītru nejaušās iedobēs. | Nevienmērīga DNS suspendēšana. Pirms alikvotas paņemšanas pārlicinieties, ka DNS paraugs ir izšķīdināts. Samaisiet izšķīdinātu DNS paraugu ar virpulmaisītāju. |
| | PQR produkts izplūda ārā no iedobes. | Uzmanīgi savietojiet pipetes uzgaļus ar gela iedobēm un dozējiet lēni. |
| | Elektroforēzes buferšķīdums varētu būt pārāk silts. | Pagatavojiet jaunu TBE buferšķīdumu. Izpildiet ar mazāku spriegumu. |
| | Tika izmantots agarozes gels ar nepareizu procentuālo attiecību. | Pārlicinieties, ka tiek izmantots ieteicamais 2% agarozes gels. |
| | Agarozē nav pilnīgi izšķīdināta. | Īslaicīgi uzvāriet, lai agarozē izkūstu. |
| | Nepareiza TBE koncentrācija. | Izmantojiet ieteicamo 0,5 x TBE koncentrāciju. |
| | Geli ir tikko pagatavoti. | Geli būs gatavi lietošanai tikai 15 minūtes pēc liešanas. |
| | Geli ir pārāk veci. | Nepagatavojiet gelus pārāk agri. |
| | Izmantotajai gela ķemmei ir pārāk biezas spraugas. | Izmantojiet plānas ķemmes (4 x 1 mm). |
| | Gela paplāte nelaiž cauri UV gaismu. | Pirms apskates izņemiet gelu no gela paplātes. |
| | Gela attēls ir pārāk spilgts. | Pārāk liela etīdija bromīda daudzuma izmantošana. Pārbaudiet kameras iestatījumus. |
| | Gela attēls ir pārāk tumšs. | Izmantojiet ieteicamo etīdija bromīda daudzumu. Pārbaudiet kameras iestatījumus. |

| Problēma | Iemesls | Rīcība |
|---|--|--|
| Vispārējas problēmas ar kļūdaini negatīvu amplifikāciju vai tādas pašas problēmas, kas atkarīgas no izpildītā cikla | Temperatūras izmaiņu ātruma iestatījums ir pārāk augsts. | <i>Olerup SSP</i> komplekti ir validēti, izmantojot GeneAmp 9700 amplifikatoru komplektu režīmam 9600 un ProFlex ar temperatūras izmaiņu ātrumu 3 °C/s. Augstāks temperatūras izmaiņu ātrums par šo var ietekmēt tipēšanas rezultātus. |

ŠAJĀ DOKUMENTA/PRODUKTĀ IZMANTOTĀS PREČU ZĪMES

Olerup SSP[®] ir *CareDx AB* reģistrēta preču zīme.

Qiagen[™] ir QIAGEN preču zīme.

GARANTĪJA

CareDx AB sākotnējam pircējam sniedz savu produktu garantiju attiecībā uz materiālu un ražošanas defektiem, pastāvot normālas izmantošanas un pielietojuma mērķim. *CareDx AB* vienīgais pienākums šīs garantijas ietvaros ir nomainīt bez maksas jebkuru produktu, kas neatbilst produkta specifikācijas lapā norādītajiem veiktspējas standartiem.

Šī garantija attiecas tikai uz produktiem, kas apstrādāti un uzglabāti saskaņā ar *CareDx AB* ieteikumiem, un neattiecas uz produktiem, kas ir bijuši mainīti, nepareizi vai ļaunprātīgi izmantoti.

Visas prasības saskaņā ar šo garantiju nosūtāmas *CareDx AB* rakstiski, tām pievienojot pircēja rēķina kopiju. Šī garantija aizstāj visas citas garantijas, tieši vai netieši izteiktas, ieskaitot garantijas par piemērotību pārdošanai un piemērotību noteiktam mērķim. *CareDx AB* nekādā gadījumā nav atbildīgs par nejaušiem vai netiešiem zaudējumiem.

Šo produktu nedrīkst pārveidot, pārpakot vai pārdot tālāk jebkādā veidā bez *CareDx AB*, Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm (Zviedrija) rakstiskas piekrišanas.

Ar visiem paraugiem jāstrādā tā, it kā tie varētu pārnēsāt slimību. Visi darbi jāveic, izmantojot cimdus un atbilstošu aizsardzību.

GALVOJUMS

CareDx AB garantē, ka praimeriem *Olerup SSP*[®] tipēšanas paplātēs ir darblapā, lietošanas instrukcijas partijai specifiskajās specifitātes un interpretācijas tabulās norādītās specifitātes.

ADRESES:

Ražotājs:

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

Tālr.: +46-8-508 939 00

Fakss: +46-8-717 88 18

E-pasts: orders-se@caredx.com

Timekļa vietne: www.caredx.com

Izplatītājs:

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

Tālr.: +46-8-508 939 00

Fakss: +46-8-717 88 18

E-pasts: orders-se@caredx.com

Timekļa vietne: www.caredx.com

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

Tālr.: 1-877-653-7871

Fakss: 610-344-7989

E-pasts: orders-us@caredx.com

Timekļa vietne: www.caredx.com

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

Tālr.: +61 8 9336 4212

E-pasts: orders-aus@caredx.com

Timekļa vietne: www.caredx.com

Pilnvarotais pārstāvis:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Lai iegūtu informāciju par *CareDx* izplatītājiem visā pasaulē, sazinieties ar *CareDx AB*.

1580-LBL v02 ir pārtulkots no angļu valodas pamatteksta 0192-LBL v07 *Olerup SSP®* HLA tipēšanas komplekti ar *Taq* polimerāzi.

Izmaiņas versijā 0192-LBL v07 salīdzinājumā ar 0192-LBL v06:

1. Šveices pilnvarotā pārstāvja pievienošana.
2. GelRed pievienošana sadaļai B. nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti.