



# Instrucțiuni de utilizare

## Olerup SSP® cu polimerază Taq

© 2023 CareDx, Inc. Toate mărcile de servicii sau mărcile comerciale sunt deținute sau dețin licențe de la CareDx, Inc. sau de la filialele sale. Toate drepturile rezervate.

Kituri de tipizare HLA 1582-LBL v02 Olerup SSP® cu polimerază Taq

Destinat *utilizării pentru diagnosticarea in vitro*

Revizuit în septembrie 2023



Pagina 1 din 31

## Pentru diagnosticare *in vitro*

### UTILIZARE PREVĂZUTĂ

Kiturile Olerup SSP® de tipizare HLA sunt kituri de diagnosticare calitativă *in vitro* pentru tipizarea ADN a alelelor HLA din Clasa I și din Clasa II. Produsele sunt utilizate de către specialiști calificați în medii medicale, în scopul determinării fenotipului HLA. Materialul sursă testat este ADN-ul.

### REZUMAT ȘI EXPLICAȚII

În trecut, antigenii leucocitari umani (HLA) erau determinați prin testul de limfocitotoxicitate. Cu toate acestea, din cauza frecvenței erorilor și a lipsei de rezoluție la nivelul alelelor, acest test a fost înlocuit cu sisteme de tipizare ADN bazate pe reacția în lanț a polimerazei (PCR). În majoritatea tehnicilor de tip PCR, procesul PCR este utilizat doar ca o etapă de amplificare a ADN-ului matrită necesar și este necesară o etapă de post-amplificare, pentru diferențierea alelelor. În schimb, în metodologia PCR-SSP (sequence-specific primer – primer specific secvenței – SSP), diferențierea între diferitele alele are loc în timpul procesului PCR. Acest lucru reduce și simplifică etapa post-amplificare la o simplă etapă de detectare a electroforezei în gel. Rezultatele testului SSP sunt fie pozitive, fie negative, ceea ce elimină necesitatea unei interpretări complicate a rezultatelor. În plus, rezoluția de tipizare prin metoda PCR-SSP este mai mare decât în cazul altor sisteme de tipizare bazate pe PCR, deoarece fiecare pereche de primeri definește două motive de secvențe localizate în *cis*, adică pe același cromozom. În plus, luând în considerare natura sintetică a reactivilor SSP, stabilitatea a fost îmbunătățită, iar variația de la lot la lot a fost redusă.

### PRINCIPIUL PROCEDURII

Metodologia PCR-SSP are la bază principiul conform căruia primerii oligonucleotidici cu complementaritate perfectă sau aproape perfectă, fără nepotriviri la capătul 3' sunt mai eficienți în reacția PCR decât primerii necorespunzători de la ADN polimerază termostabilă fără corectare. Perechile de primeri sunt concepute pentru a se potrivi cu alele unice sau cu grupuri de alele, în funcție de gradul de rezoluție necesar pentru tipizare. În cazul condițiilor PCR strict controlate, perechile de primeri complementare sau aproape complementare permit amplificarea, adică un rezultat pozitiv, în timp ce perechile de primeri necomplementare nu permit amplificarea, adică un rezultat negativ.

În urma procesului PCR, fragmentele de ADN amplificate sunt separate în funcție de dimensiune, de exemplu, prin electroforeză în gel de agaroză, vizualizată prin colorare cu bromură de etidiu și expunere la lumină ultravioletă, documentată prin fotografiere și interpretată. Interpretarea rezultatelor PCR-SSP se bazează pe prezența sau absența produsului (produselor) PCR specific(e). Dimensiunile relative ale produsului (produselor) PCR specifice pot fi de ajutor la interpretarea rezultatelor. Metodologia PCR-SSP pentru HLA a fost descrisă inițial de O. Olerup în 1991 și 1992<sup>1,2</sup>.

Cum procesul PCR poate fi afectat negativ de diverși factori (de exemplu, de erori de pipetare, de o concentrație prea mică a ADN-ului, de calitatea slabă a ADN-ului, de prezența inhibitorilor PCR sau lipsa de precizie termociclorului), în fiecare reacție PCR este inclusă o pereche de primeri de control intern pozitiv<sup>2</sup>. Perechea de primeri de

control intern pozitiv corespunde părților conservate ale genei hormonului uman de creștere, care este prezentă în toate probele de ADN uman. În prezența unui produs PCR specific al unei (unor) alele HLA, produsul de pe banda de control intern pozitiv poate fi slab vizibil sau poate lipsi. Ampliconii generați de perechile specifice de primeri HLA sunt mai scurți decât ampliconii perechilor de primeri cu control intern pozitiv, dar mai lungi decât cei ai primerilor neîncorporați (consultați secțiunea Valori preconizate).

## REACTIVI

### A. Identificare

Kiturile de tipizare Olerup SSP® conțin primeri uscați, pre-optimizați, specifici secvențelor pentru amplificarea prin PCR a alelelor HLA și a genei hormonului uman de creștere, amestec principal pentru PCR care include polimerază Taq („Master mix”) și folii adezive PCR.

Soluțiile de primeri sunt pre-alicotate și uscate în godeuri de 0,2 ml amplasate în tăvi PCR tăiate, cu pereți subțiri. Fiecare godeu al tăvii conține o soluție de primer uscată, constând dintr-un amestec specific de primeri, de exemplu, primeri specifici alelelor și grupurilor de alele HLA, precum și o pereche de primeri de control intern pozitiv care corespund secvențelor non-alelice și sunt gata pentru adăugarea probei de ADN, a Master mixului și a H<sub>2</sub>O.

Primerii sunt concepuți pentru o amplificare PCR optimă atunci când se utilizează Master mixului și programul recomandat de termociclare a ADN-ului (consultați secțiunea Programarea termociclorului).

Tabelele de specificitate a lotului și de interpretare sau Foaia de lucru pentru alelele HLA specifice, amplificate de fiecare amestec de primeri, pot fi descărcate de pe pagina web [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### B. Avertismente și măsuri de precauție

1. Pentru diagnosticare *In Vitro*.
2. Acest produs nu trebuie să fie utilizat ca bază unică pentru luarea unei decizii clinice.
3. Avertisment privind riscurile biologice: Toate produsele din sânge trebuie tratate ca potențial infecțioase. Niciuna dintre metodele de testare cunoscute nu poate oferi garanția că produsele derivate din sânge uman nu vor transmite agenți infecțioși.
4. Avertisment privind riscurile biologice: Bromura de etidiu utilizată pentru colorarea ADN-ului la electroforeza în gel de agaroză este cancerigenă. Purtați echipament individual de protecție corespunzător atunci când manipulați produsul.
5. Atenție: Folosiți mijloace de protecție oculară cu filtre de blocare UV și nu priviți direct către sursa de lumină UV atunci când vizualizați sau fotografiați gelurile.
6. Pipetele și alte echipamente utilizate la manipulări **post-PCR**, **nu** trebuie utilizate la manipulări **pre-PCR**.
7. Pentru informații detaliate, consultați Fișa cu date de securitate ([www.caredx.com](http://www.caredx.com)).

**C. Instrucțiuni de utilizare**

Consultați Indicațiile de utilizare.

**D. Instrucțiuni de depozitare**

Depozitați componentele kitului la întuneric și la temperaturile indicate pe etichetele ambalajului.

A se utiliza înainte de data de expirare imprimată pe etichetele ambalajului.

**E: Purificarea sau tratamentul necesar pentru utilizare**

Consultați Indicațiile de utilizare.

**F. Semne de instabilitate**

1. Nu utilizați tăvi pentru primer ale căror godeuri prezintă crăpături sau deteriorări pe marginile superioare, deoarece acest lucru poate cauza evaporare în timpul amplificării PCR. Nu utilizați benzi de capace PCR care prezintă crăpături, deoarece acest lucru poate duce la apariția evaporării în timpul amplificării PCR.
2. Granulele din godeuri trebuie să fie de culoare roșie. Decolorarea în galben a granulelor poate indica degradarea.
3. Master mixul trebuie să fie de culoare roșie până la violet. Decolorarea în galben, până la portocaliu poate indica degradarea.

**CERINȚE PRIVIND INSTRUMENTUL****A. Instrumentul**

Este necesară utilizarea unui termociclor cu următoarele specificații minime:

- capac încălzit la o temperatură de 104 °C, pentru a face posibilă funcționarea fără ulei
- bloc de probă (aluminiu, argint sau argint placat cu aur) care poate fi utilizat fie cu o placă PCR cu 96 de godeuri, fie cu tuburi de reacție de 0,2 ml, cu pereți subțiri
- Kiturile Olerup SSP sunt validate pentru următoarele termocicloare.

Viteze de încălzire/răcire recomandate:

- GeneAmp 9700: Termociclorul GeneAmp 9700 setat pe modul 9600. Acesta corespunde unei viteze de încălzire a probei de 1,6 °C/s și unei viteze de răcire de 0,8° C/s.
- ProFlex 1 bloc x 96 de godeuri: Termociclorul ProFlex PCR cu o viteză de încălzire/răcire a blocului de 3,0 °C/s (3,0 °C/s la fiecare treaptă). O viteză de încălzire/răcire a blocului de 3,0 °C/s corespunde unei viteze de încălzire a probei a de 1,52 °C/s și unei viteze de răcire a probei de 1,36 °C/s.
- ProFlex 2 blocuri x 96 de godeuri: Termociclorul ProFlex PCR cu o viteză de încălzire/răcire a blocului de 3,0 °C/s (3,0 °C/s pentru fiecare treaptă). O viteză de încălzire/răcire a blocului de 3,0 °C/s corespunde unei viteze de încălzire a probei a de 1,9 °C/s și unei viteze de răcire a probei de 1,6 °C/s.

**Observație: Vitezele de încălzire/răcire mai mari decât cele descrise mai sus pot influența rezultatele tipizării. De asemenea, vă rugăm rețineți că efectul asupra tipizării poate fi diferit între diferite termocicloare nevalidate, în funcție de setări.**

- interval de temperatură între 4,0 °C și 99,9 °C
- precizie a temperaturii de ± 0,25 °C în intervalul 35-99,9 °C
- uniformitate a temperaturii blocului de probe de ≤ 0,75 °C în intervalul 55-95 °C
- calibrare a temperaturii în conformitate cu un standard de referință (de exemplu, NIST)

Programați termociclorul utilizând parametrii de termociclare PCR din secțiunea B de mai jos.

Pentru informații specifice termociclorului, consultați manualul de utilizare al producătorului. Termocicloarele trebuie calibrate în conformitate cu normele de acreditare ASHI (Societatea Americană pentru Histocompatibilitate și Imunogenetică) sau EFI (Federația Europeană de Imunogenetică).

Programați termociclorul înainte de a începe să aplicați Indicațiile de utilizare descrise mai jos.

**B. Parametri de termociclare PCR**

- |    |                     |       |            |                                 |
|----|---------------------|-------|------------|---------------------------------|
| 1. | 1 ciclu             | 94 °C | 2 min      | denaturare                      |
| 2. | 10 cicluri          | 94 °C | 10 sec.    | denaturare                      |
|    |                     | 65 °C | 60 de sec. | atașare primer și extensie      |
| 3. | 20 de cicluri       | 94 °C | 10 sec.    | denaturare                      |
|    |                     | 61 °C | 50 de sec. | atașare primer                  |
|    |                     | 72 °C | 30 de sec. | extensie                        |
| 4. | Încheiere-menținere | RT    |            | dacă durează mai puțin de 8 ore |
|    |                     | 4 °C  |            | dacă durează mai mult de 8 ore  |

Volumul total de reacție din fiecare godeu, 10 µl.

Aceiași parametri de termociclare PCR sunt utilizați pentru toate kiturile Olerup SSP®.

**COLECTAREA ȘI PREGĂTIREA PROBELOR**

Pentru tipizările SSP este necesară extragere unei probe foarte pure de ADN. Probele de ADN care urmează să fie utilizate pentru tipizarea HLA de tip PCR-SSP trebuie să fie introduse din nou în suspensia de dH<sub>2</sub>O. Raportul A<sub>260/280</sub> trebuie să fie de 1,6 – 2,0 la spectrofotometria în UV, pentru o vizualizare optimă a benzii în timpul electroforezei.

Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu ajutorul sistemului de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP. Ca materie primă va fi utilizat sângele din ACD (Acid-citrat-dextroză).

În mod alternativ, ADN-ul poate fi extras prin orice metodă preferată care are ca rezultat ADN-ul pur. Atunci când se utilizează metode alternative, concentrația ADN-ului trebuie ajustată la 30 ng/μl. **Nu utilizați sânge care conține heparină la aceste metode.**

Concentrația recomandată pentru ADN dacă se folosește:  
ADN extras cu sistemul EZ1, 15 ng/μl.  
ADN extras prin alte metode, 30 ng/μl.

Concentrațiile care depășesc 50 ng/μl vor crește riscul de amplificări nespecifice și benzi suplimentare slabe, în special la tipizările SSP de înaltă rezoluție pentru HLA din Clasa I. Dacă este necesar, diluați ADN-ul extras în dH<sub>2</sub>O.

**Probele de ADN nu trebuie introduse din nou în soluții care conțin agenți chelatori, cum ar fi EDTA, cu o concentrație mai mare de 0,5 mM.**

Probele de ADN pot fi utilizate imediat după extracție sau pot fi depozitate la +4 °C timp de până la 2 săptămâni, fără efecte negative asupra rezultatelor. Probele ADN pot fi stocate la -20 °C sau la o temperatură mai mică timp de 9 luni. Purity și concentrația probelor de ADN extras care au fost depozitate pentru o perioadă îndelungată trebuie testate pentru a confirma calitatea acceptabilă înainte de tipizarea HLA.

Probele de ADN trebuie expediate la o temperatură de +4 °C sau mai mică pentru a-și păstra integritatea în timpul transportului.

**PROCEDURĂ****A. Materiale furnizate**

1. Tăvi pentru primer Olerup SSP®.
2. Master mix (volum adecvat pentru tăvile kitului). Același Master mix este folosit pentru toate kiturile Olerup SSP®.
3. Folii adezive de etanșare PCR (număr suficient pentru tăvile kitului).

**B. Materiale necesare, dar care nu sunt furnizate**

1. Kit/echipament de izolare a ADN-ului
2. Spectrofotometru UV
3. Dispozitive de pipetare. Vă recomandăm să utilizați un dozator electronic cu un singur canal care poate distribui 10 µl de părți alicote pentru adăugarea soluției alcătuite din ADN-Master mix-dH<sub>2</sub>O în godeurile tăvii.
4. Vârfuri de pipetă de unică folosință
5. Tuburi de polipropilenă
6. Mixer vortex
7. Microcentrifugă
8. Suport pentru tavă PCR
9. Termociclor cu capac încălzit pentru PCR cu structură cu 96 de godeuri, gradient de temperatură pe întregul bloc de încălzire de ≤ 0,75 °C și tavă/dispozitiv de fixare pentru godeuri de reacție de 0,2 ml, cu pereți subțiri
10. Cuptor cu microunde sau încălzitor pentru încălzirea soluțiilor de agaroză
11. Agaroză pentru electroforeză, de exemplu, FMC Seakem LE
12. 0,5 x tampon TBE; 1 x tampon TBE are 89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA disodic, pH 8,0
13. Sticlă cu picurător pentru bromură de etidiu Nr. produs 103.301-10 sau sticlă cu picurător pentru GelRed Nr. produs 103.302-05
14. Dispozitiv de pipetare pentru încărcare cu gel. Pentru încărcarea cu gel vă recomandăm pipeta cu 8 canale, cu volum reglabil de 5-25 µl
15. Marker de dimensiune ADN pentru a acoperi intervalul de 50 - 1.000 bp, de exemplu, scară cu 100 de perechi de baze, Nr. produs pentru markerul de dimensiune ADN 103.202-100 sau marker de dimensiune ADN pentru cantități reduse de gel, Nr. produs 103.203-100
16. Aparat de electroforeză/sursă de alimentare
17. Transiluminator cu UV
18. Sistem de documentare a fotografiilor sau a imaginilor

**C. Procedură pas cu pas**

Consultați Indicațiile de utilizare.



**INDICAȚII DE UTILIZARE****A. Pregătirea probelor**

1. Purificați ADN-ul genomic din proba leucocitară prin metoda aleasă. Consultați secțiunea de mai sus, intitulată Colectarea și pregătirea probelor.
2. Pentru informații specifice privind pregătirea și depozitarea probelor, consultați secțiunea de mai sus, intitulată Colectarea și pregătirea probelor.
3. Efectuați amplificarea PCR a probei de ADN purificat folosind o tavă de tipizare Olerup SSP® sau depozitați proba de ADN până când este gata pentru tipizare.

**B. Pregătirea reactivului/echipamentului**

1. Programați un termociclor pentru a rula programul PCR Olerup SSP®. Consultați secțiunea Cerințe privind instrumentele – Parametri de termociclare PCR de mai sus.
2. Preparați gelul de electroforeză; consultați secțiunea C – **Pregătirea electroforezei în gel de mai jos.**

**C. Pregătirea electroforezei în gel**

Pentru *sistemul cu gel Olerup SSP® 96* (Nr. produs 103.101-01)

1. Configurare
  - Aduceți la același nivel camera de turnare pentru 1 gel (Nr. produs 103.101-31) sau camera de turnare pentru 3 geluri (Nr. produsului 103.101-33) utilizând nivela cu bulă de aer și cele trei picioare reglabile pe înălțime.
  - Așezați tava (tăvile) pentru gel în camera de turnare.
2. 2% (m/ v) Prepararea gelului de agaroză

Utilizați agaroză de înaltă calitate pentru electroforeză, care să permită identificarea a 50 - 2.000 de fragmente de perechi de baze de ADN.

  - La 5 ml de soluție tampon TBE (Tris-borat-EDTA) de 10x se adaugă 150 ml de apă distilată și 2 g de agaroză într-o sticlă de 500 ml.
  - Dizolvați agaroză prin fierbere într-un cuptor cu microunde până când se obține o soluție omogenă de 100 ml.
  - Lăsați soluția de gel dizolvat să se răcească la 60 °C, de exemplu, într-o cameră termică.
  - Înainte de turnare, colorați gelul cu bromură de etidiu (10 mg/ml), 5 μl la 100 ml soluție de gel. Pentru o ușurință maximă în manipulare, utilizați sticlele noastre cu picurător pentru bromură de etidiu (Nr. produs. 103.301-10). **Observație: Bromura de etidiu este cancerigenă. Purtați echipament individual de protecție corespunzător atunci când manipulați produsul.**
  - Turnați 100 ml de soluție de gel în tava pentru gel așezată în camera de turnare. Introduceți 6 piepteni pentru gel (Nr. produs 103.101-21) în fantele tăvii pentru gel.
  - Lăsați gelul să se întărească timp de 15 minute.
  - Turnați 750 ml de soluție tampon TBE de 0,5 x în rezervorul pentru gel. Scufundați tava pentru gel în cutia pentru gel și scoateți cu atenție, prin ridicare, cei 6 piepteni pentru gel.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

Respectați instrucțiunile de utilizare furnizate de producător atunci când utilizați sisteme alternative pentru electroforeză. Pentru a putea fi utilizate cu kiturile de tipizare HLA Olerup SSP®, aceste sisteme trebuie să permită identificarea produselor PCR care variază, ca dimensiune, între 50 și 1.100 de perechi de baze.

**D. Procedura pe etape**

1. Scoateți de la temperatura de depozitare indicată: numărul corespunzător de probe de ADN, tava (tăvile) pentru primer și cantitatea necesară de Master mix pentru proba (probele) de ADN selectată(e)/tava (tăvile) pentru primer. Dezghețați la temperatura camerei (între 20 și 25 °C).

Același Master mix este folosit pentru toate kiturile Olerup SSP®

2. Amestecați proba (probele) de ADN pentru scurt timp, într-un mixer vortex.
3. Așezați tava (tăvile) pentru primer într-un suport pentru tăvi PCR.
4. **Kituri de joasă și de înaltă rezoluție**
  - Amestecați Master mixul în mixerul vortex înainte de a colecta părți alicote.
  - Utilizând o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați Master mixul la temperatura camerei și dH<sub>2</sub>O într-un tub de 0,5 ml sau de 1,5 ml. (Consultați tabelul 1 de mai jos pentru cantitățile adecvate.)
  - Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotiți-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
  - Utilizând o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați 8 μl din soluția alcătuită din Master mix și dH<sub>2</sub>O și 2 μl de dH<sub>2</sub>O în godeul de control negativ, adică godeul cu perechile de primeri cu control negativ, din tava pentru primer.
  - Utilizând o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați proba de ADN la temperatura camerei în soluția de Master mix – dH<sub>2</sub>O rămasă. (Consultați tabelul 1 de mai jos pentru cantitățile adecvate.)
  - Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotiți-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
  - Utilizând un dozator electronic cu un singur canal, distribuiți în părți alicote 10 μl din amestecul reactiv al probei în fiecare godeu, cu excepția godeului de control negativ de pe tava pentru primer.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

**Tabelul 1: Volumele componentelor necesare pentru fiecare test și pentru un număr diferit de godeuri, atunci când se utilizează Master mixul.**

Nr. de godeuri per test	Volumul de Master mix (μl)	Volumul probei de ADN (μl)	Volumul de dH <sub>2</sub> O (μl)	Nr. de godeuri per test	Volumul de Master mix (μl)	Volumul probei de ADN (μl)	Volumul de dH <sub>2</sub> 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

Volumele recomandate enumerate mai sus includ volumul pentru compensarea variațiilor de pipetă și pentru pierderile de lichid de pe pereții interiori ai tuburilor.

**5. Kituri combinate A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ și DQA-DQB-DR îmbunătățite și HLA-C de înaltă rezoluție pentru kitul de alele frecvente**

- Amestecați Master mixul în vortex.
- Utilizând o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați 520 μl de dH<sub>2</sub>O la temperatura camerei în tubul de 1,5 ml furnizat, care conține 312 μl de Master mix.
- Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotații-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
- Utilizând o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați 8 μl din soluția alcătuită din Master mix și dH<sub>2</sub>O, precum și 2 μl de dH<sub>2</sub>O în godeul de control negativ Nr. 96, adică godeul cu perechile de primeri de control negativ.
- Utilizând o pipetă manuală cu un singur canal, adăugați 206 μl din proba de ADN la temperatura camerei în soluția de Master mix – dH<sub>2</sub>O rămasă.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

- Acoperiți tubul cu un capac și amestecați în mixerul vortex timp de 5 secunde. Introduceți tubul într-o microcentrifugă cu impulsuri și rotații-l, pentru ca tot lichidul de pe lateralele tubului să coboare.
- Utilizând un dozator electronic cu un singur canal, distribuiți în părți alicote 10 µl din amestecul reactiv al probei în fiecare godeu, cu excepția godeului de control negativ Nr. 96 al tăvii pentru primer.

**Important:**

Asigurați-vă că aplicați proba peste primeri (uscați în partea de jos a fiecărui godeu al tăvii pentru primer), pentru a evita contaminarea încrucișată între godeuri. Atingeți peretele interior al godeului cu vârful pipetei pentru ca proba să alunece până la fundul godeului. Verificați dacă toate probele au ajuns pe fundul fiecărui godeu. În caz contrar, loviți ușor tava de masa de lucru, astfel încât toate probele să se așeze pe fundul godeului înainte de a începe procesul PCR.

6. Acoperiți tava (tăvile) pentru primer cu foliile adezive de etanșare PCR furnizate. Asigurați-vă că toate godeurile de reacție sunt complet acoperite, pentru a preveni pierderea prin evaporare în timpul amplificării PCR. Placa de compresie *Olerup SSP®* (Nr. produs 103.505-06) poate fi așezată peste foliile adezive de etanșare PCR pentru a preveni evaporarea în timpul termociclării.
7. Așezați tava (tăvile) pentru primer în termociclor utilizând un adaptor adecvat pentru tavă și pentru tuburi. Nu lăsați să treacă mai mult de 5 minute între configurarea PCR și termociclare.
8. Introduceți numărul programului dvs. *Olerup SSP®*. Specificați un volum de reacției de 10 µl.
9. Porniți programul pentru PCR. Programul durează aproximativ 1 oră și 20 de minute.
10. Scoateți tava (tăvile) pentru primer din termociclor. Verificați tava PCR pentru a vă asigura că în fiecare godeu PCR există aproximativ același volum de lichid. Supuneți probele la electroforeză; consultați secțiunea E – Electroforeză în gel, de mai jos. Interpretați rezultatele tipizării utilizând **tabelele de interpretare specifice lotului și tabelele de specificitate sau foile de lucru**. Consultați secțiunea Valori preconizate de mai jos.

**E. Electroforeză în gel**

1. După încheierea reacției PCR, orientați tava pentru primer și cutia cu gel. Ordinea godeurilor este de la stânga la dreapta și de sus în jos.
2. Scoateți cu grijă benzile de capace, fără să vărsați produsele PCR.
3. Încărcați produsele PCR în ordine, în gelul de agaroză 2 %. (Nu este necesar să adăugați soluția tampon de încărcare a gelului.) Pentru încărcarea cu gel se recomandă utilizarea unei pipete cu 8 canale.
4. Încărcați un marker de dimensiune ADN (scară cu 100 de perechi de baze, Nr. produs pentru markerul de dimensiune ADN 103.202-100 sau Marker de dimensiune ADN pentru cantități reduse de gel are Nr. produs 103.203-100) într-un singur godeu de pe fiecare rând.
5. Acoperiți cutia pentru gel cu capacul.
6. Supuneți gelul la procesul de electroforeză în soluție tampon TBE de 0,5 x, fără a recircula soluția tampon, pentru 15-20 de minute, la 8-10 V/cm.
7. Transferați tava cu gel la un transiluminator cu UV.
8. Fotografiați gelul cu sau fără tava pentru gel.
9. Marcați fotografia în conformitate cu regulile laboratorului.

**CONTROLUL CALITĂȚII**

Orientările privind testarea HLA ASHI indică faptul că un godeu de control negativ (de contaminare) trebuie inclus în fiecare configurare PCR. (Standarde revizuite pentru laboratoare acreditate, Societatea Americană pentru Histocompatibilitate și Imunogenetică, aprobate de CMS: 16 februarie 2021). Un godeu de control negativ este inclus în toate kiturile, cu excepția kiturilor cu doză unică HLA-B\*27 și cu un singur godeu HLA-B\*27.

Consultați secțiunea Interpretarea gelului de la pagina 14.

**REZULTATE**

Fișele de validare a liniei celulare specifice lotului și certificatul de analiză pot fi accesate online, [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

**LIMITĂRI ALE PROCEDURII**

1. Procesul PCR-SSP necesită condiții de testare riguros controlate pentru a asigura o amplificare diferențiată în mod corespunzător. Respectați cu strictețe procedura descrisă în instrucțiunile de utilizare.
2. Proba de ADN extrasă reprezintă șablonul pentru procesul specific de amplificare PCR. ADN-ul purificat trebuie să aibă un raport  $A_{260/280}$  cuprins între 1,6 și 2,0 pentru o vizualizare optimă a benzii la electroforeză.
3. Toate instrumentele, de exemplu, termociclorul și dispozitivele de pipetare, trebuie să fie calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.
4. Informațiile specifice lotului sunt prezentate în prospectul produsului: Informații specifice lotului și în Foaia de lucru specifică lotului.
5. Pe baza testelor efectuate, următoarele substanțe au fost evaluate prin trei (3) metode de extracție la concentrațiile enumerate și s-a constatat că acestea nu afectează rezultatele testelor.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Metodă de extracție</b>	<b>Substanță de interferență</b>	<b>Concentrație de interferență*</b>
Sistem pentru extragerea ADN-ului din sânge EZ1 DSP	Bilirubină	200 mg/L
	Hemoglobină	200 g/L
	Trigliceride	30 g/L
	Proteină	110 g/L
Kit pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAamp DSP	Bilirubină	200 mg/L
	Hemoglobină	200 g/L
	Trigliceride	18,2 g/L
	Proteină	77 - 96 g/L
Metoda Gentra PureGene	Bilirubină	200 mg/L
	Hemoglobină	200 g/L
	Trigliceride	18,2 g/L
	Proteină	119 - 146 g/L

6. Plăcile PCR sunt compatibile fizic cu majoritatea termocicloarelor de pe piață. Consultați tabelul de mai jos pentru informații privind compatibilitatea dintre materialele din plastic și termociclor.

*Observație: Tabelul are exclusiv rol informativ. Pentru a vedea care sunt termocicloarele validate, consultați secțiunea Cerințe privind instrumentele – Instrument.*

<b>Tabel de compatibilitate</b>	
<b>Producător</b>	<b>Termociclor</b>
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex cu 96 de godeuri
	ProFlex 2 x 96 de godeuri
	Veriti cu bloc cu 96 de godeuri a 0,2 ml
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
Bio-Rad	TProfesional
	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 cu bloc de 96 de godeuri
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

## VALORI PRECONIZATE

### A. Analiza datelor










Examinați cu atenție fotografia gelului și identificați benzile pozitive.

1. O bandă mai scurtă, cu migrare mai rapidă va fi vizibilă pe o bandă de gel dacă alela (alelele) HLA specifică(e) a(u) fost amplificată(e). Acest lucru indică un rezultat pozitiv al testului.
  - a. Înregistrați prezența și absența produselor PCR specifice.
  - b. Atunci când se interpretează rezultatele testului cu gel, este util să se monitorizeze lungimile relative ale produselor PCR specifice, așa cum sunt ele menționate în prospectele specifice lotului de produse. Mai multe benzi au două sau mai multe lungimi posibile de produse PCR specifice. Aceste godeuri conțin mai multe perechi de primeri care generează produse PCR de diferite dimensiuni, în funcție de alelele HLA ale ADN-ului probei.
  - c. Potrivii modelul benzilor de gel cu produsele PCR specifice, conform informațiilor din Tabelele de interpretare în funcție de lot și din Tabelele de specificitate pentru a realiza tipizarea HLA a ADN-ului probei.
2. Ar trebui ca pe toate benzile de gel, cu excepția benzii de gel de control negativ, să fie vizibilă o bandă de control intern pozitiv, mai lungă și cu migrație mai lentă, ca măsură de control a amplificării reușite. Este posibil ca banda de control intern pozitiv să fie mai puțin vizibilă sau să lipsească de pe benzile de gel pozitive.
  - a. Înregistrați prezența și lungimile relative ale benzilor de control intern pozitiv. Benzile de control de diferite dimensiuni sunt utile pentru orientarea corectă a tipizării, precum și pentru identificarea kitului.
  - b. Absența benzii de control intern pozitiv fără produs PCR specific indică o reacție PCR nereușită.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

- i. Dacă alelele HLA pot fi determinate în prezența reacției (reacțiilor) PCR eșuate, iar reacția (reacțiile) PCR eșuată (eșuate) nu modifică atribuirea alelei, atunci nu este nevoie ca testul să fie repetat.
  - ii. Dacă, totuși, reacția (reacțiile) PCR eșuată(e) ar putea modifica atribuirea alelei HLA, atunci tipizarea trebuie să fie repetată.
3. Prezența unui produs PCR specific sau a unei benzi de control intern pozitive în banda (benzile) de control negativ indică contaminarea cu produs(e) PCR și anulează toate rezultatele testelor. Oligomerii de primer cu 40 până la 60 de perechi de baze pot fi observați pe banda (benzile) de control negativ. Acest lucru nu înseamnă că s-a produs contaminarea.

**B. Interpretarea rezultatului testului cu gel**

	<b>Reacție pozitivă</b>	<b>Reacție negativă</b>	<b>Reacție PCR eșuată</b>
Godeu			
Bandă de control intern pozitiv			
Bandă specifică			
Bandă pentru primer			

1. Un marker de dimensiune ADN (scară cu 100 de perechi de baze, Nr. produs 103.202-100 pentru Markerul de dimensiune ADN sau un marker de dimensiune ADN pentru cantități reduse de gel cu Nr. produs 103.203-100) trebuie introdus în câte un godeu de pe fiecare rând al gelului sau în conformitate cu reglementările locale de acreditare a laboratoarelor.
2. Se pot obține benzi mai lungi decât banda de control intern pozitiv, iar acestea nu trebuie să fie luate în considerare la interpretarea rezultatelor tipizării.
3. Primerii neutilizați vor forma o bandă difuză mai scurtă, cu 50 de perechi de baze.
4. Se pot observa artefacte de oligomer în primer. Acestea sunt mai lungi decât banda pentru primer, dar mai scurte decât benzile specifice.

**CARACTERISTICI SPECIFICE DE PERFORMANȚĂ**

Controlul calității pentru lotul de kituri



**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

Fiecare soluție de primer este testată pe o gamă de 48 de probe de ADN prelevate din linii celulare bine definite ale IHWC. Consultați Fișa (fișele) de validare a liniei celulare specifice lotului din prospectul produsului - informații specifice lotului.

Studiul 1 privind compararea metodelor

Acesta a fost un studiu multicentric care a evaluat concordanța dintre kitul de tipizare HLA de rezoluție scăzută Olerup SSP® DR și tava One Lambda Micro SSP™ de tipizare HLA a ADN-ului, la trei laboratoare clinice din Statele Unite.

Rezultatele analizate ale tipizării realizate cu kitul de tipizare HLA de rezoluție scăzută Olerup SSP® DR și cu tava One Lambda Micro SSP™ de tipizare HLA a ADN-ului au arătat o concordanță de 98,4% (123/125; 95 % CI: 94,3-99,8) atunci când două rezultate Olerup ambigue sunt tratate ca discordante. Concordanța a fost de 100 % (123/123; 95 % CI: 97,1 – 100) atunci când rezultatele ambigue Olerup nu au fost incluse în analiză, reflectând practica clinică normală.

Studiul 2 privind compararea metodelor

Acest studiu a fost conceput pentru a demonstra concordanța rezultatelor cu rezoluție scăzută de tipizare a alelelor HLA (A, B, C, DQ), obținute cu ajutorul kiturilor experimentale de tipizare HLA Olerup SSP® și al kiturilor de referință One Lambda LABType SSO. Probele ACD de sânge integral au fost colectate de la 95 de subiecți din 3 clinici din Statele Unite. S-a efectuat extracția ADN-ului. ADN-ul purificat rezultat a fost testat cu metodele de investigație Olerup SSP® și cu metodele de referință One Lambda LabType SSO HLA.

Concordanța generală pentru alelele din clasa I a fost de 99,6% (278/279; 95 % CI: 98,0-100). Pentru clasa II, concordanța alelelor a fost de 100% (94/94; 95 % CI: 96,2-100).

**Tabelul 1**

Concordanța generală dintre rezultatele Olerup SSP® și OneLambda SSO pentru alelele din clasele I și II.

Locus HLA	Total	
	n/N	concordanță % (95 % CI)

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>A</b>	95/95	100 (96,2-100)
<b>B</b>	90/90	100 (96,0-100)
<b>C</b>	93/94	98,9 (94,2-100)
<b>Loci pentru toate clasele</b>	278/279	99,6 (98,0-100)
<b>Loci pentru Clasa II (DQ)</b>	94/94	100 (96,2-100)

Studiu privind caracterul reproductibil al rezultatului testului.

Acest studiu a comparat rezultatele tipizării HLA realizate cu ajutorul *Olerup SSP®* de trei laboratoare de testare HLA, folosind un grup de 10 probe ADN bine evidențiate, ale căror rezultate privind concordanța sunt incluse în Banca ADN HLA UCLA pentru Clasa HLA I (A, B și C), alelele obișnuite din Clasa II (DRB1\*, DRB3\*/DRB4\*/DRB5\*, și DQB1\*) și alelele din Clasa II, care sunt investigate mai rar (DQA1\*, DPA1\*, și DPB1\*).

**Tabelul 2: Rezumatul rezultatelor studiului privind caracterul reproductibil al kitului Olerup SSP®**

Tipul alelei HLA	Precizie de tipizare % n/N Interval Conf. 95 % (LL, UL)	
	Rezultat ambiguu tratat ca discordant	Rezultat ambiguu tratat ca nedeterminat și exclus din analiză
Rezoluție scăzută Clasa I (A și B combinate)	98,3 (59/60) 91,1; 100	100 (59/59) 93,9; 100
Rezoluție înaltă Clasa I (A, B și C combinate)	94,7 (142/150) 89,8; 97,7	98,6 (142/144) 95,1; 99,8
Rezoluție scăzută Clasa II (DRB1* și DRB3*/DRB4*/DRB5*)	100 (60/60) 94,0; 100	100 (60/60) 94,0; 100
Rezoluție înaltă Clasa II – Alele comune (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* și DQB1*)	98,3 (118/120) 94,1; 99,8	100 (118/118) 96,9; 100
Rezoluție înaltă Clasa II Alele investigate mai rar (DQA1*, DPA1* și DPB1*)	83,3 (75/90) 74,0; 90,4	86,2 (75/87) 77,2; 92,7

Acest studiu a utilizat un grup de zece (10) probe de ADN cu rezultate bine evidențiate de tipizare HLA.

Gradul redus de concordanță observat la alelele de înaltă rezoluție din Clasa II, care sunt investigate mai rar, reflectă incertitudinea mai mare, în ceea ce privește „rezultatele concordanței” dintre probele de ADN UCLA, având în vedere informațiile incomplete de secvențiere disponibile pentru alelele DQA1\*, DPA1\* și DPB1\*. Pentru 9 din cele 11 rezultate discordante observate în timpul studiului de reproductibilitate (un apel DQA1 \* 0505 de Olerup SSP® vs. „tipizarea în concordanță” DQA1\*0501), toate cele trei laboratoare de testare au ajuns la același rezultat, ceea ce indică fiabilitatea kitului Olerup DQA1\*.

## BIBLIOGRAFIE

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. Alelele HLA actuale pot fi găsite pe [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

## DEPANAREA

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsurile de luat</b>
<b>Fără amplificare (nici amplificarea fragmentelor de control intern, nici amplificări specifice).</b>	Cantitate prea mică de ADN.	Măsurați concentrația ADN-ului și verificați dacă este corectă cantitatea adăugată. Contaminarea ARN-ului poate cauza o supraestimare a concentrației ADN-ului, în urma spectrofotometriei. Repetați cu atenție extracția ADN-ului, utilizând soluții proaspăt preparate. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu ajutorul sistemului de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	ADN-ul conține inhibitori PCR, de exemplu, proteine, etanol (din pașii de precipitare), matrice rămase din produsele de purificare a ADN-ului în stare solidă.	Măsurați calitatea ADN-ului. Recomandăm utilizarea unui raport A260/A280 de 1,6-2,0 prin spectrofotometrie cu UV. Respectați cu strictețe protocolul de extragere a ADN-ului. Extrageți din nou ADN-ul. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu ajutorul sistemului de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	ADN-ul a fost extras din sânge heparinizat.	Utilizați sânge neheparinizat sau protocoale de extragere a ADN din sânge heparinizat.
	ADN-ul este dizolvat în soluția tampon care conține EDTA.	Repetați extragerea ADN-ului și dizolvați ADN-ul în dH <sub>2</sub> O.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsuri de luat</b>
<b>Continuare:</b> <b>Fără amplificare (nici amplificarea fragmentelor de control intern, nici amplificări specifice).</b>	Introducere accidentală a unui înălbitor în test.	Verificați din nou zonele în care este posibil să fi fost introdus înălbitor.
	Kiturile nu sunt păstrate la temperatura corectă.	Depozitați kiturile la -20 °C.
	Termociclorul nu funcționează în mod corect.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6-12 luni.
	Contact necorespunzător între blocul de încălzire al termociclorului și tava de tipizare SSP.	Utilizați tava corectă/dispozitivul de fixare corect pentru godeuri de reacție de 0,2 ml, cu pereți subțiri. Consultați manualul termociclorului.
<b>Eșec aleatoriu al amplificării (întreruperi).</b>	Dacă nu sunt bine închise, foliile de etanșare PCR/capacele pentru tuburile PCR vor duce la apariția evaporării și, ulterior, la eșecul amplificării.	Asigurați-vă că foliile de etanșare PCR/toate capacele sunt bine închise. Placa de compresie <i>Olerup SSP®</i> (Nr. produs 103.505-06) poate fi așezată peste foliile adezive de etanșare PCR pentru a preveni evaporarea în timpul termociclării.
	Greșeli la încărcarea cu gel.	Verificați dacă a fost încărcat numărul corect de godeuri și dacă fiecare godeu conține aproximativ același volum de amestec PCR.
	Utilizarea unor pipete necalibrate.	Calibrați periodic toate pipetele, conform recomandărilor furnizorului.
	Erori de pipetare.	Pipetați cu mai multă atenție.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsurile de luat</b>
	Master mixul și proba de ADN nu au fost bine omogenizate înainte de utilizare.	Amestecați scurt, într-un mixer vortex, înainte de utilizare. Vă recomandăm să puneți fiecare rând în mixerul vortex.
	În godeurile s-au depus volume inegale de ADN și amestec principal.	Pipetați cu mai multă atenție.
<b>Fragmente de control intern slabe.</b>	ADN impur.	Măsurați calitatea ADN-ului. Raportul A <sub>260/280</sub> trebuie să fie de 1,6-2,0 la spectrofotometria cu UV. Contaminarea ARN-ului poate cauza o supraestimare a concentrației ADN-ului, în urma spectrofotometriei. ADN-ul degradat determină apariția petelor pe benzile de gel. Repetati cu atenție extracția ADN-ului, utilizând soluții proaspăt preparate. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu ajutorul sistemului de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Cantitate prea mică de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP. Contaminarea ARN-ului poate cauza o supraestimare a concentrației ADN-ului,

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsuri de luat</b>
<b>Continuare:</b> <b>Fragmente de control intern slabe.</b>		În urma spectrofotometriei. ADN-ul degradat determină apariția petelor pe benzile de gel. Repetați cu atenție extracția ADN-ului, utilizând soluții proaspăt preparate. Vă recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Temperatura de atașare a primerului este prea mare; termociclorul nu este calibrat.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6-12 luni.
	Master mixul pentru PCR a fost păstrat la + 4 °C pentru mai mult de 2 săptămâni.	Depozitați în mod corespunzător Master mixul pentru PCR.
<b>Amplificare nespecifică (scări sau pete).</b>	Utilizarea în exces a probei de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP. Unele soluții de primeri tind să genereze mai des amplificare nespecifică; consultați notele de subsol din fiecare Tabel de specificitate a lotului.
	ADN impur.	Niciun fragment mai mare decât fragmentul de control intern nu trebuie luat în considerare la



**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsuri de luat</b>
		interpretarea rezultatelor obținute. Verificați calitatea ADN-ului. Repetați extracția ADN-ului. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu ajutorul sistemului de extragere a ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP. Unele soluții de primeri tind să genereze mai des amplificare nespecifică; consultați notele de subsol din fiecare Tabel de specificitate a lotului.
<b>Semnale de amplificare tot mai slabe în timp.</b>	Soluția cu bromură de etidiu pentru colorarea gelului de agaroză este veche.	Pregătiți o soluție proaspătă cu bromură de etidiu, pentru o mai bună colorare a gelului de agaroză și pentru obținerea unui semnal mai bun. Efectele de umbră cauzate de primeri sunt ușor de detectat dacă colorarea gelului de agaroză este normală.
	Una dintre lămpile cu lumină UV este defectă.	Verificați echipamentul cu lumină UV. Efectele de umbră cauzate de primeri sunt ușor de detectat dacă lumina UV este normală.
	S-a folosit o cantitate prea mică de probă de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Temperatura de atașare a primerului este prea mare;	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsurile de luat</b>
	termociclorul nu este calibrat.	Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6-12 luni.
<b>Modele neobișnuite de amplificare.</b>	Se utilizează un tabel de interpretare specific lotului/o foaie de lucru incorect(ă).	Verificați numărul de lot al produsului utilizat și Tabelul de interpretare/Foaia de lucru utilizat(ă).
	Ordine incorectă la încărcarea cu gel.	Verificați alinierea amestecurilor și a benzilor de gel.
	Modelul de amplificare conține un rezultat fals pozitiv.	Vedeți mai jos.
	Modelul de amplificare conține un rezultat fals negativ.	Vedeți mai jos.
<b>Amplificări cu rezultat fals pozitiv.</b>	Contaminarea ADN-ului.	Utilizați mănuși, vârfuri de pipetă cu bariere (dopuri filtrante) și încăperi separate pentru manipulările pre-PCR și post-PCR. Asigurați manipularea corectă a tuturor eșantioanelor, în fiecare etapă. Verificați dacă există urme de contaminare utilizând kitul pentru testare prin ștergere <i>Olerup SSP®</i> .
	ADN impur.	Măsurați calitatea ADN-ului. Respectați cu strictețe protocolul de extragere a ADN-ului. Încercați alte sisteme de extragere a ADN-ului. Extrageți din nou ADN-ul. Recomandăm extracția automată a ADN-ului cu sistemul pentru determinarea ADN-ului

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsuri de luat</b>
<b>Continuare:</b> <b>Amplificări cu rezultat fals pozitiv.</b>		din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Utilizarea în exces a probei de ADN.	Măsurați concentrația de ADN și ajustați-o la 30 ng/μl sau la 15 ng/μl pentru ADN-ul extras cu sistemul pentru extragerea ADN-ului din sânge QIAGEN EZ1 DSP.
	Temperatura de atașare a primerului este prea mică.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6-12 luni.
	Întârziere semnificativă între configurarea PCR și începerea termociclării.	Nu este permisă o întârziere mai lungă de 5 minute înainte de termociclare.
	Interval prea mare de timp între așezarea tăvilor de tipizare în termociclor și începerea termociclării.	Utilizați un termociclor preîncălzit.
	A fost utilizată o cantitate prea mare de bromură de etidiu.	Utilizați cantitatea de bromură de etidiu recomandată.
	Interpretarea incorectă a unui artefact ca bandă specifică.	Verificați tabelul de specificitate a lotului/foaia de lucru cu privire la dimensiunea corectă a benzii și notele de subsol.
	Modelul de amplificare conține un rezultat fals pozitiv.	Verificați dacă toate amplificările specifice au mărimea corectă sau dacă un artefact (transfer, dimer de primer) a fost interpretat greșit ca amplificare.
	Ordine incorectă la încărcarea cu gel.	Verificați alinierea amestecurilor și a benzilor de gel.

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsurile de luat</b>
<b>Amplificări fals negative.</b>	Termociclorul nu este calibrat corect.	Calibrați termociclorul și verificați programul PCR. Un termociclor utilizat pentru o tipizare PCR-SSP de rutină trebuie calibrat la fiecare 6-12 luni. Dacă eroarea nu este corectată prin recalibrare, tipizați din nou testul utilizând o probă de referință cu aceeași specificitate. Dacă se confirmă rezultatul negativ, contactați departamentul de asistență pentru clienți.
	Ordine incorectă la încărcarea cu gel.	Verificați alinierea amestecurilor și a benzilor de gel.
<b>Probleme generale legate de gel (geluri neclare și/sau benzi pătate).</b>	Probă de ADN degradat.	Apare ca o pată pe benzile de gel. Izolați ADN-ul dintr-o probă proaspătă.
	Numeroase striții în godeuri aleatorii.	Suspensii inegale de ADN. Asigurați-vă că ADN-ul probei este dizolvat înainte de a prelua părțile alicote. Amestecați în vortex proba de ADN diluată.
	Produsul PCR a ieșit afară din godeu.	Aliniați cu atenție vârful pipetei la godeurile de gel și dozați cu grijă.
	Este posibil ca tamponul de electroforeză să fie prea cald.	Pregătiți un nou tampon TBE. Aplicați o tensiune mai mică.
	S-a utilizat o concentrație incorectă a gelului de agaroză.	Asigurați-vă că se utilizează gelul de agaroză recomandat, cu concentrația de 2 %.
	Agaroză nu s-a dizolvat complet.	Fierbeți din nou agaroză, pentru o perioadă scurtă

**Instrucțiuni de utilizare**  
**Kituri de tipizare HLA Olerup SSP® cu polimerază Taq**

<b>Problema</b>	<b>Motivul</b>	<b>Măsuri de luat</b>
		de timp, pentru ca aceasta să se topească.
	Concentrație incorectă de TBE.	Utilizați concentrația recomandată pentru TBE, de 0,5 x.
	Gelurile au fost turnate prea devreme.	Gelurile nu pot fi utilizate decât după 15 minute de la turnare.
	Gelurile sunt prea vechi.	Nu turnați gelurile cu prea mult timp înainte.
	Pieptenele pentru gel utilizat are dinții prea mari.	Utilizați piepteni cu dinți subțiri (4 x 1 mm).
	Tava pentru gel nu este transparentă la UV.	Scoateți gelul din tava pentru gel înainte de vizualizare.
	Imaginea gelului este prea luminoasă.	A fost utilizată o cantitate prea mare de bromură de etidiu. Verificați setările camerei.
	Imaginea gelului este prea întunecată.	Utilizați cantitatea de bromură de etidiu recomandată. Verificați setările camerei.
<b>Probleme generale de amplificare fals negativă sau alte probleme similare care țin de rulare</b>	Setarea vitezei de încălzire/răcire este la o valoare prea mare.	Kiturile Olerup SSP sunt validate utilizând termociclorul GeneAmp 9700 setat pe modul 9600 și ProFlex cu o viteză de încălzire/răcire de 3 °C/s. Vitezele de încălzire/răcire mai mari decât acestea pot influența rezultatele tipizării.

## MĂRCI COMERCIALE UTILIZATE ÎN ACEST DOCUMENT/LA ACEST PRODUS

Olerup SSP® este o marcă înregistrată a CareDx AB.  
Qiagen™ este o marcă comercială a QIAGEN.

### GARANȚIE

CareDx AB garantează produsele sale împotriva defectelor de material sau de producție, în condiții normale de utilizare și aplicare. Garanția se acordă cumpărătorului inițial. Singura obligație a CareDx AB în temeiul acestei garanții este de a înlocui, în mod gratuit, orice produs care nu respectă standardele de performanță menționate în fișa de specificații a produsului.

Această garanție se aplică numai produselor care au fost manipulate și depozitate în conformitate cu recomandările CareDx AB și nu se aplică produselor care au făcut obiectul modificării, utilizării incorecte sau utilizării abuzive.

Toate reclamațiile depuse în temeiul acestei garanții trebuie să fie înaintate către CareDx AB în scris și trebuie să fie însoțite de o copie a facturii de achiziție. Această garanție înlocuiește toate celelalte garanții, exprese sau implicite, inclusiv garanțiile de vandabilitate și de adecvare la un anumit scop. CareDx AB nu va fi răspunzătoare, sub nicio formă, pentru daune incidentale sau indirecte.

Acest produs nu poate fi reformulat, reambalat sau revândut sub nicio formă, fără acordul scris al CareDx AB, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Suedia.

Manipulați toate eșantioanele ca și cum ar putea să transmită boli. Toate activitățile trebuie să fie efectuate purtând mănuși și mijloace adecvate de protecție.

### GARANȚIE

CareDx AB garantează că primerii din tăvile de tipizare Olerup SSP® dețin caracteristicile menționate în foaia de lucru, în Tabelele de specificitate a lotului și în Tabele de interpretare din prospectul produsului.

**ADRESE:**

**Producător:**

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

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

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

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

**Pagină web:** www.caredx.com

**Distribuit de:**

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

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

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

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

**Pagină 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

**Pagină web:** www.caredx.com

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

**Tel:** +61 8 9336 4212

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

**Pagină web:** www.caredx.com

**Reprezentant autorizat:**

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Pentru informații privind distribuitorii CareDx din întreaga lume, contactați CareDx AB.

1582-LBL v02 este tradus din documentul principal în limba engleză 0192-LBL v07 Olerup SSP® HLA typing kits without Taq polymerase.

Schimbări în revizia 0192-LBL v07 față de 0192-LBL v06:

1. Adăugarea reprezentant autorizat elvetian.
2. Adăugarea GelRed la secțiunea B. Materiale necesare, dar care nu sunt furnizate.