



Navodila za uporabo

Olerup SSP[®] vključno s Taq polimerazo

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

Kompleti za tipiziranje 1584-LBL v02 Olerup SSP[®] HLA, vključno s Taq polimerazo

Za *in vitro* diagnostično uporabo

Revizija septembra 2023



Stran 1 od 29

Za *in vitro* diagnostično uporabo

PREDVIDENA UPORABA

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

POVZETEK IN POJASNILA

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

NAČELO POSTOPKA

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

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

Ker lahko na postopek PCR negativno vplivajo razni dejavniki (npr. napake pri pipetiranju, prenizka koncentracija DNK, slaba kakovost DNK, prisotnost zaviralcev PCR, netočnost cikličnega termostata), je v vsako reakcijo PCR vključen notranji par začetnih oligonukleotidov pozitivne kontrole². Par začetnih oligonukleotidov notranje pozitivne kontrole se ujema z ohranjenimi regijami gena za človeški rastni hormon, ki je

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

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

REAGENTI

A. Identifikacija

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

Raztopine začetnih oligonukleotidov so predhodno alikvotirane in posušene v 0,2 ml vdolbinah izrezanih pladnjev za PCR s tankimi stenami. Vsaka vdolbina na pladnju vsebuje posušeno raztopino začetnih oligonukleotidov, ki je sestavljena iz specifične mešanice začetnih oligonukleotidov, tj. začetnih oligonukleotidov HLA, specifičnih za alele in skupino, ter par začetnih oligonukleotidov notranje pozitivne kontrole, ki se ujema z nealelnimi zaporedji, in so pripravljene za dodajanje vzorca DNK, mešanice reagentov in H₂O.

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

Tabele specifičnosti in interpretacij ali delovni list za določene alele HLA, ojačane z vsako mešanico temeljnih začetnih oligonukleotidov, in ki so specifične za vsako serijo, je mogoče pridobiti na spletnem mestu www.caredx.com.

B. Opozorila in previdnostni ukrepi

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

C. Navodila za uporabo

Glejte Navodila za uporabo.

D. Navodila za shranjevanje

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

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

E: Čiščenje ali obdelava, potrebna za uporabo

Glejte Navodila za uporabo.

F. Indikacije nestabilnosti

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

ZAHTEVE ZA INSTRUMENTE**A. Instrument**

Uporabiti morate ciklični termostat z naslednjimi minimalnimi specifikacijami:

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

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

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

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

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP*® HLA, vključno s Taq polimerazo

B. Parametri PCR cikliranja

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

Skupni reakcijski volumen v vsaki vdolbini, 10 µl.

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

ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV

Za tipizacijo SSP je potrebna ekstrahirana, zelo čista DNK. Vzorce DNK, ki bodo uporabljeni za tipizacijo PCR-SSP HLA, morate ponovno suspendirati v dH₂O. Razmerje A_{260/280} mora biti 1,6 – 2,0 z UV spektrofotometrijo za optimalno vizualizacijo trakov med elektroforezo.

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

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

Priporočena koncentracija DNK z:

EZ1 ekstrahirana DNK, 15 ng/μl.

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

Koncentracije, ki presegajo 50 ng/μl, bodo povečale tveganje za nespecifične amplifikacije in šibke dodatne pasove, zlasti za HLA razreda I tipizacije SSP visoke ločljivosti. Po potrebi razredčite ekstrahirano DNK v dH₂O.

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

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

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

POSTOPEK**A. Priloženi materiali**

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

B. Materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi

1. Komplet/oprema za izoliranje DNK
2. UV spektrofotometer
3. Pripomočki za pipetiranje. Priporočamo elektronsko enokanalno pipeto, ki lahko razdeli 10 µl alikvotov za dodajanje mešanice reagentov-DNK-dH₂O mešanice v vdolbine pladnja.
4. Konice za pipete za enkratno uporabo
5. Polipropilenske epruvete
6. Vortex mešalnik
7. Mikrocentrifuga
8. Stojalo za pladenj PCR
9. Ciklični termostat z ogrevanim pokrovom za PCR s formatom s 96 vdolbinami, temperaturnim gradientom čez grelni blok ≤ 0,75 °C in pladnjem/zadrževalnikom za 0,2 ml tankostenske reakcijske vdolbine
10. Mikrovalovna pečica ali kuhalna plošča za ogrevanje raztopin agaroze
11. Agarosa razreda elektroforeze, npr. FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE pufer; 1 x TBE pufer je 89 mM tris-borat, 2 mM dinatrijev EDTA, pH 8,0
13. Steklenička s kapalko za etidijev bromid št. Izdelka 103.301-10 ali steklenička s kapalko za GelRed 103.302-05
14. Pripomoček za pipetiranje gela. Priporočamo 8-kanalno pipeto za polnjenje z gelom, z nastavljivo prostornino 5-25 µl
15. Oznaka velikosti DNK, ki pokriva območje 50 - 1 000 bp, npr. lestev 100 osnovnih parov, oznaka velikosti DNK št. izdelka 103.202-100 ali oznaka velikosti DNK za kratke uporabe gela 103.203-100
16. Naprava za elektroforezo/napajanje
17. UV transiluminator
18. Sistem dokumentacije fotografij ali slik

C. Postopek po korakih

Glejte Navodila za uporabo.

NAVODILA ZA UPORABO**A. Priprava vzorca**

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

B. Priprava reagenta/opreme

1. Programirajte ciklični termostatski program za zagon programa *Olerup SSP*® PCR, glejte Zahteve za instrumente - Parametri PCR cikliranja.
2. Pripravite gel za elektroforezo, glejte poglavje C – **Priprava gelske elektroforeze** spodaj.

C. Priprava gelske elektroforeze

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

1. Nastavitev

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

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

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

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

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

D. Postopek po korakih

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

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

2. Vzorce DNK na kratko premešajte z vrtinčenjem.
3. Postavite pladenj(e) začetnih oligonukleotidov v stojalo za pladnje za PCR.
4. **Kompleti z nizko in visoko ločljivostjo**
 - Preden vzamete alikvote, premešajte mešanico reagentov.
 - Z ročno enokanalno pipeto dodajte mešanico reagentov pri sobni temperaturi in dH₂O v 0,5 ml ali 1,5 ml epruveto. (Za ustrezne količine glej preglednico 1 spodaj.)
 - Zaprite epruveto in vrtinčite 5 sekund. Epruveto zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruvete.
 - Z ročno enokanalno pipeto dodajte 8 µl mešanica reagentov-dH₂O mešanice in 2 µl dH₂O v vdolbino za negativno kontrolo, tj. vdolbina s pari začetnih oligonukleotidov negativne kontrole pladnja začetnih oligonukleotidov.
 - Z ročno enokanalno pipeto dodajte vzorec DNK pri sobni temperaturi v preostalo mešanica reagentov-dH₂O mešanico. (Za ustrezne količine glej preglednico 1 spodaj.)
 - Zaprite epruveto in vrtinčite 5 sekund. Epruveto zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruvete.
 - Z elektronsko enokanalno pipeto alikvotirajte 10 µl vzorčne reakcijske mešanice v vsako vdolbino, razen v vdolbino za negativno kontrolo, pladnja začetnih oligonukleotidov.

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

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

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

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

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

- Vrtinčite mešanico reagentov v vrtinčnem mešalniku.
- Z ročno enokanalno pipeto dodajte 520 µl dH₂O pri sobni temperaturi v priloženo 1,5 ml epruветo, ki vsebuje 312 µl mešanice reagentov.
- Zaprite epruветo in vrtinčite 5 sekund. Epruветo zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruветe.
- Z ročno enokanalno pipeto dodajte 8 µl mešanica reagentov - dH₂O mešanice in 2 µl dH₂O v vdolbino za negativno kontrolo št. 96, tj. vdolbina s pari začetnih oligonukleotidov negativne kontrole.
- Z ročno enokanalno pipeto dodajte 206 µl DNK vzorca pri sobni temperaturi v preostalo mešanico reagentov in dH₂O mešanico.
- Zaprite epruветo in vrtinčite 5 sekund. Epruветo zavrtite s pulznim vrtenjem v mikrocentrifugi, da se vsa tekočina spusti s stranic epruветe.
- Z elektronsko enokanalno pipeto alikvotirajte 10 µl vzorčne reakcijske mešanice v vsako vdolbino, razen v vdolbino za negativno kontrolo št. 96, pladnja začetnih oligonukleotidov.

Pomembno:

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

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

E. Gelska elektroforeza

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

KONTROLA KAKOVOSTI

Smernice ASHI za testiranje HLA kažejo, da je treba v vsako nastavitvev PCR vključiti vdolbino za negativno (kontaminacijsko) kontrolo. (Revidirani standardi za akreditirane laboratorije, Ameriško združenje za histokompatibilnost in imunogenetiko, odobril

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

CMS: 16. februarja 2021). Vdolbina z negativno kontrolo je vključena v vse komplete, z izjemo HLA-B*27 – enota in kompletov HLA-B*27 z eno vdolbino.

Glejte razlago gela na strani 14.

REZULTATI

Do listov za validacijo celične linije in potrdila o analizi, specifičnih za serijo, je mogoče dostopati na spletu, www.caredx.com.

OMEJITVE POSTOPKA

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

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

6. PCR plošče so fizično združljive z večino cikličnih termostatov na trgu. Glejte spodnjo tabelo združljivosti s plastiko cikličnega termostata.

Opomba: Tabela je namenjena samo kot smernica. Za validirane ciklične termostate glejte poglavje Zahteve za instrumente — Instrument.

Tabela združljivosti	
Proizvajalec	Ciklični termostat
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96 vdolbin
	ProFlex 2x96 vdolbin
	Blok Veriti 0,2 ml 96 vdolbin
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
Bio-Rad	TProfessional
	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
Eppendorf	PTC-2(xx)
	PTC-100 z blokom s 96 vdolbinami
	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

PRIČAKOVANE VREDNOSTI

A. Analiza podatkov










Previdno preglejte fotografijo gela in določite pozitivne steze.

1. Hitrejše-pomikajoči in krajši trak bo viden v stezi gela, če so bili specifični aleli HLA amplificirani. To kaže na pozitiven rezultat testa.
 - a. Zabeležite prisotnost in odsotnost specifičnih produktov PCR.
 - b. Pri razlagi rezultatov gela je koristno spremljati relativne dolžine specifičnih produktov PCR, kot je navedeno v vložkih za posamezne serije. Več stez ima dve ali več možnih dolžin specifičnih produktov PCR.

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

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

B. Razlaga gela

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

1. Označevalec velikosti DNK (lestev 100 baznih parov, oznaka velikosti DNK št. 103.202-100 ali oznaka velikosti DNK za kratke postopke z gelom 103.203-100) je treba zagnati v eni vdolbini na vrsto gela ali v skladu z lokalnimi laboratorijskimi smernicami za akreditacijo.

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP®* HLA, vključno s Taq polimerazo

2. Lahko se dobijo trakovi, daljši od traku notranje pozitivne kontrole, ki jih je treba zanemariti pri razlagi rezultatov tipizacije.
3. Neuporabljeni začetni oligonukleotidi bodo oblikovali razpršen trak krajših trakov 50 baznih parov.
4. Opaziti je mogoče artefakte oligomera začetnih oligonukleotidov. Te so daljši od traku začetnih oligonukleotidov, vendar krajši od posebnih trakov.

POSEBNE ZNAČILNOSTI UČINKOVITOSTI

Nadzor kakovosti serije kompleta

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

Primerjalna študija metod 1

Večcentrična študija, ki je ocenjevala skladnost kompleta za tipiziranje *Olerup SSP®* DR Low Resolution HLA Typing Kit in pladnja za tipiziranje One Lambda Micro SSPTM HLA DNA Typing Tray v treh kliničnih laboratorijih v Združenih državah.

Analizirani rezultati tipiziranja kompleta za tipiziranje *Olerup SSP®* DR Low Resolution HLA Typing Kit in pladnja za tipiziranje One Lambda Micro SSP™ HLA DNA Typing Tray so pokazali 98,4-odstotno (123/125; 95 % IZ: 94,3–99,8) ujemanje pri obdelavi dveh dvoumnih rezultatov *Olerup* kot neskladnih. Ujemanje je bilo 100-odstotno (123/123; 95 % IZ: 97,1–100), ko v analizo niso bili vključeni dvoumni rezultati *Olerup*, ki odražajo običajno klinično prakso.

Primerjalna študija metod 2

Ta študija je bila zasnovana za prikaz ujemanja rezultatov tipizacije z nizko ločljivostjo alelov HLA (A, B, C, DQ), pridobljenih s testnimi kompleti za tipiziranje *Olerup SSP®* HLA in referenčnimi kompleti One Lambda LABType SSO. Vzorci polne krvi ACD so bili zbrani pri 95 osebah, razdeljenih na 3 klinične lokacije v Združenih državah. Izvedena je bila ekstrakcija DNK in nastala prečiščena DNK je bila testirana s preiskovalnimi metodami *Olerup SSP®* in referenčnima metodama One Lambda LabType SSO HLA.

Splošno ujemanje za alele razreda I je bilo 99,6 % (278/279; 95 % IZ: 98,0–100). Za alele razreda II je bilo ujemanje 100-odstotno (94/94; 95 % IZ: 96,2–100).

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP*® HLA, vključno s Taq polimerazo

Tabela 1

Splošno ujemanje rezultatov *Olerup SSP*® in OneLambda SSO za alele razreda I in razreda II.

Lokus HLA	Skupaj	
	n/N	% ujemanja (95 % CI)
A	95/95	100 96,2–100)
B	90/90	100 96,0–100)
C	93/94	98,9 94,2–100)
Vsi razred I Lokusi	278/279	99,6 98,0–100)
Razred II Lokusi (DQ)	94/94	100 96,2–100)

Študija obnovljivosti rezultatov kompleta.

Ta študija je primerjala rezultate tipizacije *Olerup SSP*® HLA med tremi laboratoriji za testiranje HLA z uporabo skupine 10 dobro karakteriziranih vzorcev DNK, katerih soglasni rezultati so vključeni v banko DNK HLA UCLA za HLA razreda I (A, B in C), pogoste alele razreda II (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* in DQB1*) in manj pogosto raziskani aleli razreda II (DQA1*, DPA1* in DPB1*).

Tabela 2: Povzetek rezultatov Olerup SSP® študije ponovljivosti kompleta HLA

Tip alela HLA	Natančnost tipiziranja v % n/N 95 % konf. Interval (LL, UL)	
	Dvoumen rezultat obravnavan kot neskladje	Dvoumen rezultat, ki se obravna kot nedoločen in je izključen iz analize
Nizka ločljivost razreda I (A in B skupaj)	98,3 (59/60) 91,1, 100	100 (59/59) 93,9, 100
Visoka ločljivost razreda I (A, B in C skupaj)	94,7 (142/150) 89,8, 97,7	98,6 (142/144) 95,1, 99,8
Nizka ločljivost razreda II (DRB1* in DRB3*/DRB4*/DRB5*)	100 (60/60) 94,0, 100	100 (60/60) 94,0, 100
Visoka ločljivost razreda II – pogosti aleli (DRB1*, DRB3*/DRB4*/DRB5* in DQB1*)	98,3 (118/120) 94,1, 99,8	100 (118/118) 96,9, 100
Visoka ločljivost razreda II Manj pogosto raziskani aleli (DQA1*, DPA1* in DPB1*)	83,3 (75/90) 74,0, 90,4	86,2 (75/87) 77,2, 92,7

Ta študija je uporabila skupino desetih (10) vzorcev DNK z dobro opredeljenimi rezultati tipizacije HLA.

Manjša ujemanja, opažena za redkeje raziskane alele visoke ločljivosti razreda II, odražajo večjo negotovost v »rezultatih ujemanja« vzorcev DNK UCLA ob upoštevanju nepopolnih informacij o zaporedju, ki so na voljo za alele DQA1*, DPA1* in DPB1*. Za 9 od 11 neskladnih rezultatov, opaženih med študijo obnovljivosti (rezultat DQA1*0505 iz Olerup SSP® tipiziranja v primerjavi z DQA1* 0501 »konsenzom tipiziranja«) so vsa tri testna mesta dobila isti rezultat, ki kaže na dosledno delovanje kompleta Olerup DQA1*.

LITERATURA

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991: **37**: 197-204.
2. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992: **39**: 225-235.
3. Trenutne alele HLA lahko najdete na www.ebi.ac.uk/imgt/hla

ODPRAVLJANJE TEŽAV

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

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP*[®] HLA, vključno s Taq polimerazo

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

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

Težava	Razlog	Ukrepanje
Nadaljevanje: Naključna napaka amplifikacije (izpadi).	V vdolbine so bile dodane neenake količine DNK-mešanica reagentov mešanice.	Bodite bolj previdni pri pipetiranju.
Šibki notranji kontrolni fragmenti.	Nečista DNK.	Izmerite kakovost DNK. Razmerje $A_{260/280}$ mora biti 1,6–2,0 z UV spektrofotometrijo. Kontaminacija RNK lahko povzroči spektrofotometrično precenjevanje koncentracije DNK. Razgrajena DNK povzroči razmaz v stezah gela. Pazljivo ponovite ekstrakcijo DNK s sveže pripravljenimi raztopinami. Priporočamo avtomatizirano ekstrakcijo DNK s sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Premajhna količina DNK.	Izmerite koncentracijo DNK in prilagodite na 30 ng/μl ali na 15 ng/μl za DNK, pridobljeno s krvnim sistemom QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Kontaminacija RNK lahko povzroči spektrofotometrično precenjevanje koncentracije DNK. Razgrajena DNK povzroči razmaz v stezah gela. Pazljivo ponovite ekstrakcijo DNK s sveže pripravljenimi raztopinami. Priporočamo avtomatizirano

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

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

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

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

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje *Olerup SSP*[®] HLA, vključno s Taq polimerazo

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

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

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

Navodila za uporabo
Kompleti za tipiziranje Olerup SSP® HLA, vključno s Taq polimerazo

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

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

BLAGOVNE ZNAMKE, UPORABLJENE V TEM DOKUMENTU/IZDELKU

Olerup SSP[®] je registrirana blagovna znamka *CareDx AB*.

Qiagen[™] je blagovna znamka družbe QIAGEN.

GARANCIJA

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

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

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

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

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

JAMSTVO

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

NASLOVI:**Proizvajalec:**

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

Tel: +46-8-508 939 00

Faks: +46-8-717 88 18

E-pošta: orders-se@caredx.com

Spletna stran: www.caredx.com

Distributer:

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

Tel: +46-8-508 939 00

Faks: +46-8-717 88 18

E-pošta: orders-se@caredx.com

Spletna stran: www.caredx.com

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

Tel: 1-877-653-7871

Faks: 610-344-7989

E-pošta: orders-us@caredx.com

Spletna stran: www.caredx.com

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

Tel: +61 8 9336 4212

E-pošta: orders-aus@caredx.com

Spletna stran: www.caredx.com

Pooblaščen predstavnik:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

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

1584-LBL v02 je preveden iz glavne angleške različice 0192-LBL v07 Olerup SSP® kompleti za tipiziranje HLA, vključno s polimerazo Taq.

Spremembe revizije 0192-LBL v07 v primerjavi z 0192-LBL v06:

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