



Инструкции за употреба

Olerup SSP® без включена Taq полимераза

© 2023 CareDx, Inc. Всички марки на услуги или търговски марки са собственост на или лицензирани от CareDX, Inc. или нейните клонове. Всички права запазени.

Комплекти за HLA типизиране 1178-LBL v04 Olerup SSP® без Taq полимераза За *инвитро* диагностична употреба

Преработено септември 2023 г.



Страница 1 от 32

За *инвитро* диагностична употреба

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Комплектите за HLA типизиране *Olerup SSP*® са комплекти за ДНК-базирано типизиране на Клас I и Клас II HLA алели чрез метода на качествена *инвитро* диагностика. Продуктите се използват от обучени специалисти в медицински заведения с цел определяне на HLA фенотипа. Тестваният изходен материал е ДНК.

РЕЗЮМЕ И ОБЯСНЕНИЕ

Човешките левкоцитни антигени (HLA) са се определяли с помощта на тест за лимфоцитотоксичност. Този тест обаче е заменен от техники за ДНК типизиране на базата на полимеразна верижна реакция (PCR) поради степента на грешки и липсата на разрешителна способност на нивото на алелите. При повечето PCR-базирани техники процесът на PCR се използва само като етап на амплификация на необходимата прицелна ДНК и е необходима стъпка след амплификация за разграничаване на различните алели. За разлика от това, в методологията PCR-SSP (SSP – специфичен за последователността праймер) разграничаването на различните алели се извършва по време на процеса на PCR. Това съкращава и опростява стъпката след амплификацията до проста стъпка за откриване с гел електрофореза. Резултатите от SSP теста са или положителни, или отрицателни, което премахва необходимостта от сложна интерпретация на резултатите. В допълнение разрешителната способност на типизиране при PCR-SSP е по-висока, отколкото при други PCR-базирани техники за типизиране, тъй като всяка праймерна двойка определя два последователни *цис*-разположени мотива, т.е. на същата хромозома. Освен това синтетичният характер на SSP реактивите спомага за подобряване на стабилността и намаляване на вариациите между партидите.

ПРИНЦИП НА ПРОЦЕДУРАТА

Методологията PCR-SSP се основава на принципа, че напълно или почти напълно припокриващи се олигонуклеотидни праймери без несъответстващи бази в 3' краищата се използват по-ефективно в PCR реакцията, отколкото при неприпокриващите се праймери чрез термостабилни ДНК полимерази без корективни свойства. Двойките праймери са предназначени да се припокриват с единични алели или група(и) алели в зависимост от степента на необходимата разрешителна способност на типизирането. При строго контролирани условия на PCR напълно или почти напълно припокриващи се праймерни двойки позволяват да се получи амплификация, т.е. положителен резултат, докато неприпокриващи се праймерни двойки не позволяват да се получи амплификация, т.е. отрицателен резултат.

След PCR процеса амплифицираните ДНК фрагменти се разделят по размер, напр. чрез електрофореза с агарозен гел, визуализирана чрез оцветяване с етидиев бромид и излагане на ултравиолетова светлина, документирано чрез фотографирание и интерпретирано. Тълкуването на резултатите от PCR-SSP се основава на наличието или отсъствието на специфични PCR продукти. Относителните размери на специфичните PCR продукти могат да бъдат полезни

при тълкуването на резултатите. Методологията PCR-SSP за HLA първоначално е описана от О. Олеруп през 1991 и 1992 г.^{1,2}.

Тъй като PCR процесът може да бъде неблагоприятно повлиян от различни фактори (напр. грешки при пипетиране, твърде ниска концентрация на ДНК, лошо качество на ДНК, наличие на PCR инхибитори, неточност на термичния цикъл), във всяка PCR реакция² е включена вътрешна положителна контролна праймерна двойка. Двойката праймери с вътрешна положителна контрола съвпада със запазените региони на гена на човешкия растежен хормон, който присъства във всички проби от човешка ДНК. При наличието на специфичен PCR продукт на HLA алел(и) продуктът на положителната вътрешна контролна лента може да бъде слаб или да отсъства. Ампликоните, генерирани от специфичните HLA праймерни двойки, са по-къси от ампликоните на вътрешната положителна контрола на праймерните двойки, но са по-дълги от тези на неинкорпорираните праймери (вижте „Очаквани стойности“).

РЕАКТИВИ

А. Идентифициране

Комплектите за типизиране *Olerup SSP*® съдържат изсушени, предварително оптимизирани специфични за последователността праймери за PCR амплификация на HLA алели и на гена на човешкия растежен хормон, основна смес за PCR без Taq полимераза (Основна смес) и адхезивни PCR уплътнителни филми.

Разтворите на праймера са предварително аликвотирани и изсушени в 0,2 ml ямки в нарязани, тънкостенни тави за PCR. Всяка ямка на тавата съдържа изсушен праймер, състоящ се от специфична праймерна смес, т.е. алел- и групово специфични HLA праймери, както и вътрешна положителна контролна праймерна двойка съвпадащи неалелни последователности и са готови за добавяне на ДНК проба, Master Mix и H₂O.

Праймерите са предназначени за оптимално PCR амплифициране при използване на основната смес и препоръчителната програма за ДНК циклиране (вижте „Програмиране на термоциклера“).

Информация относно таблиците за интерпретация и специфичност за конкретните партии или работния лист за специфичните HLA алели, амплифицирани от всяка смес от праймери, може да се намери на уеб страницата www.caredx.com.

В. Предупреждения и предпазни мерки

1. За *инвитро* диагностична употреба.
2. Този продукт не може да се използва като единствена основа за вземане на клинично решение.
3. Предупреждение за биологична опасност: Всички кръвни продукти трябва да се третират като потенциално инфекциозни. Нито един известен метод за тестване не може да гарантира, че продуктите, получени от човешка кръв, няма да предадат инфекциозни агенти.
4. Предупреждение за биологична опасност: Етидиевият бромид, използван за оцветяване на ДНК в електрофорезата с агарозен гел, е канцероген. Манипулирайте с подходящи лични предпазни средства.
5. Внимание: Носете защита за очи с UV защита и не гледайте източника на UV светлина директно по време на преглед или фотографизиране на гелове.
6. Пипети и друго оборудване, използвани за манипулации **след** извършване на PCR, **не** трябва да се използват за манипулации **преди** извършването на PCR.
7. Вижте информационния лист за безопасност (www.caredx.com) за подробна информация.

С. Инструкции за употреба

Вижте Указанията за употреба.

Д. Инструкции за съхранение

Съхранявайте компонентите на комплекта на тъмно и при температури, посочени на етикетите на опаковката.

Използвайте преди срока на годност, отпечатан върху етикетите на опаковката.

Е: Пречистване или обработка, необходима преди употреба

Вижте Указанията за употреба.

Ф. Показания за нестабилност

1. Не използвайте тави за праймери с пукнатини в ямките или с повреден горен ръб на ямките, тъй като това може да причини изпаряване по време на PCR амплификацията. Не използвайте PCR стрипове с капачки с пукнатини, тъй като това може да причини изпаряване по време на PCR амплификацията.
2. Пелетите в ямките трябва да са червени на цвят. Жълтото обезцветяване на пелетата може да е индикация за деградация.
3. Основната смес трябва да е червена до лилава на цвят. Жълтото до оранжево обезцветяване може да е индикация за деградация.

ИЗИСКВАНИЯ КЪМ АПАРАТА

А. Апарат

Трябва да се използва термоциклер със следните минимални спецификации:

- отопляем капак с температура 104°C за работа без масло
- блок за проби (алуминий, сребро, или позлатено сребро) за използване с 96-ямкова PCR плака или 0,2 ml тънкостенни реакционни епруветки
- Комплектите Olerup SSP са валидирани чрез следните термоциклери. Препоръчителна скорост на рампата:
 - GeneAmp 9700: Термоциклер GeneAmp 9700, настроен на режим 9600. Това съответства на **скорост на рампата за проби** от 1,6°C/s нагоре и 0,8°C/s надолу.
 - ProFlex 1x96-ямков блок: Термоциклер ProFlex PCR със скорост на рампата на блока от 3,0°C/s (всяка стъпка 3,0°C/s). **Скорост на рампата на блока** от 3,0°C/s съответства на скорост на рампата на пробата от 1,52°C/s нагоре и 1,36°C/s надолу.
 - ProFlex 2x96-ямков блок: Термоциклер ProFlex PCR със скорост на рампата на блока от 3,0°C/s (всяка стъпка 3,0°C/s). **Скорост на рампата на блока** от 3,0°C/s съответства на скорост на рампата на пробата от 1,9°C/s нагоре и 1,6°C/s надолу. **Забележка: По-високите скорости на рампата от описаните по-горе могат да окажат влияние върху резултатите от типизирането. Моля, имайте предвид също, че ефектът върху типизирането може да се различава между различните невалидирани термоциклери в зависимост от настройките.**
- температурен диапазон от 4,0°C до 99,9°C
- температурна точност от $\pm 0,25^\circ\text{C}$ в диапазона от 35°C до 99,9°C
- еднородност на температурата на блока за проби $\leq 0,75^\circ\text{C}$ в диапазона от 55°C до 95°C
- калибриране на температурата, проследимо до референтен стандарт (напр. Национален институт по стандарти и технологии (NIST))

Програмирайте термоциклера, като използвате цикличните параметри за PCR, посочени в раздел В по-долу.

За информация относно конкретен термоциклер вижте ръководството за потребителя на производителя. Термоциклерите трябва да бъдат калибрирани в съответствие с правилата за акредитация на Американското дружество за хистосъвместимост и имуногенетика (ASHI) или Европейската федерация по имуногенетика (EFI).

Програмирайте термоциклера, преди да изпълните описаните по-долу Указания за употреба.

В. Циклични параметри за PCR

- | | | | | |
|----|------------------|------|---------|--|
| 1. | 1 цикъл | 94°C | 2 min | денатурация |
| 2. | 10 цикъла | 94°C | 10 sec. | денатурация |
| | | 65°C | 60 sec. | отгряване и удължаване |
| 3. | 20 цикъла | 94°C | 10 sec. | денатурация |
| | | 61°C | 50 sec. | отгряване |
| | | 72°C | 30 sec. | удължаване |
| 4. | Край – задържане | 4°C | RT | ако е по-малко от 8 часа
ако е повече от 8 часа |

Общ реакционен обем във всяка ямка, 10 µl.

Тези циклични параметри за PCR се използват за всички комплекти *Olerup SSP*®.

ВЗИМАНЕ И ПОДГОТОВКА НА ПРОБИ

За SSP типизиране е необходима извлечена ДНК с висока чистота. ДНК пробите, които ще се използват за PCR-SSP HLA типизиране, трябва да бъдат повторно суспендирани в dH₂O. Коефициентът $A_{260/280}$, измерен чрез UV спектрофотометрия, трябва да бъде между 1,6 и 2,0 за оптимална визуализация на лентата по време на електрофорезата.

Препоръчваме автоматизирано изолиране на ДНК чрез системата за извличане на ДНК от кръвна проба EZ1 DSP на QIAGEN. За изходен материал трябва да се използва кръв с ACD.

Алтернативно ДНК-то може да бъде извлечено чрез всеки предпочитан метод, чрез който се изолира чиста ДНК. Когато се използват алтернативни методи, концентрацията на ДНК трябва да се коригира до 30 ng/μl. **Не използвайте хепаринизирана кръв с тези методи.**

Препоръчвана концентрация на ДНК при използването на:
EZ1-извлечена ДНК, 15 ng/μl.
ДНК, извлечена чрез други методи, 30 ng/μl.

Концентрации, надвишаващи 50 ng/μl, ще увеличат риска от неспецифични амплификации и слаби допълнителни ленти, особено за клас I HLA алели при SSP типизиране с висока разрешителна способност. Ако е необходимо, разредете извлечената ДНК в dH₂O.

ДНК пробите не трябва да се суспендират повторно в разтвори, съдържащи хелатиращи агенти като ЕДТА, с концентрация над 0,5 mM.

ДНК пробите могат да се използват непосредствено след изолирането или да се съхраняват при температура от +4°C в рамките на до 2 седмици без неблагоприятни ефекти върху резултатите. ДНК пробите могат да се съхраняват при температура от -20°C или по-ниска в продължение на 9 месеца. Чистотата и концентрацията на извлечените ДНК проби, които са били съхранявани за продължителен период, трябва да се анализират за приемливост преди HLA типизирането.

ДНК пробите трябва да се транспортират при температура от +4°C или по-ниска, за да се запази интегритетът им по време на преместването.

ПРОЦЕДУРА

А. Предоставени материали

1. Тави за праймери *Olerup SSP*®.
2. Основна смес без *Taq* полимераза (в подходящ за тавите на комплекта обем). Една и съща основна смес се използва за всички комплекти *Olerup SSP*®.
3. Адхезивен уплътнителен филм за PCR (подходящ брой, отговарящ на броя на тавите на комплекта).

В. Необходими материали, които не са включени в комплекта

1. Комплект/оборудване за изолиране на ДНК
2. UV спектрофотометър
3. Устройства за пипетиране. Препоръчваме електронен едноканален дозатор с възможност за накапване на 10 µl аликвотни части за добавяне на сместа между ДНК, основната смес и dH₂O към ямките на тавите.
4. Накрайници за пипети за еднократна употреба
5. Полипропиленови епруветки
6. Вортекс миксер
7. Микроцентрифуга
8. PCR поставка за тави
9. Термоциклер за PCR с отопляем капак с 96-ямки, температурен градиент през нагревателния блок ≤0,75°C и тава/фиксатор за 0,2 ml тънкостенни реакционни ямки
10. Микровълнова фурна или котлон за нагряване на агарозни разтвори
11. Агароза за електрофореза, напр. FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE буфер; 1 x TBE буфер е 89 mM трис-борат, 2 mM динатриев ЕДТА, pH 8,0
13. Шише с капкомер с етидиев бромид, Продуктов № 103.301-10 или бутилка с капкомер GelRed, Продуктов № 103.302-05
14. Пипетиращо устройство за зареждане с гел. Препоръчваме 8-канална пипета за зареждане на гел с 5 – 25 µl регулируем обем
15. Маркер за размера на ДНК с обхват от 50 – 1000 bp, напр. стълба от 100 базови двойки, маркер за размера на ДНК (Продуктов № 103.202-100) или маркер за размера на ДНК за къси гел серии (Продуктов № 103.203-100)
16. Апарат за електрофореза/захранване
17. UV трансилюминатор
18. Фотографска или образна система за документация
19. ДНК *Taq* полимераза на Roche, клас GMP. [Каталожен № 03 734 927 001 (1000 U) или # 03 734 935 001 (5000 U)].

С. Процедура – стъпка по стъпка

Вижте Указанията за употреба.

УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА**А. Подготовка на пробите**

1. Пречистете геномната ДНК от левкоцитната проба чрез метод по избор, вижте раздела „Взимане и подготовка на проби“ по-горе.
2. За конкретна информация относно подготовката и съхранението на пробите вижте раздела „Взимане и подготовка на проби“ по-горе.
3. Извършете PCR амплификация върху пречистена ДНК проба, като използвате тава за типизиране *Olerup SSP*® или съхранявайте ДНК проба до готовност за типизиране.

В. Подготовка на реагента/оборудването

1. Програмирайте термоциклера да стартира програма за PCR цикъл на *Olerup SSP*®, вижте раздела „Изисквания към апарата – циклични параметри за PCR“ по-горе.
2. Пригответе Taq полимераза (5 единици/μl), съхранявайте я на температура от -20°C.
3. Подгответе гела за електрофореза, вижте раздел С – „Подготовка за гела за електрофореза“ по-долу.

С. Подготовка за гела за електрофореза

За *Olerup SSP*® Gel System 96 (Продуктов № 103.101-01)

1. Настройка

- Нивелирайте електрофоретичната камера за 1 гел (Продуктов № 103.101-31) или електрофоретичната камера за 3 гела (Продуктов № 103.101-33), като използвате нивелир и трите регулируеми на височина крачета.
- Поставете тавата(ите) за гел в електрофоретичната камера.

2. Приготвяне на агарозен гел 2% (w/v)

Използвайте висококачествена агароза за електрофореза, способна да раздели 50 – 2000 базови двойки на ДНК фрагменти.

- В стъклено шише от 500 ml към 5 ml 10 x TBE буфер (трис-борат-ЕДТА) се добавят 150 ml дестилирана вода и 2 g агароза.
- Агарозата се разтваря чрез кипване в микровълнова фурна, докато се образува хомогенен разтвор от 100 ml.
- Оставете разтвора на гела да се охлади до 60°C, напр. в отоплителен шкаф.
- Оцветете гела с етидиев бромид преди леене (10 mg/ml), 5 μl на 100 ml разтвор на гел. За максимална лекота на боравене използвайте шишета за етидиев бромид с капкомер (Продуктов № 103.301-10). **Забележка: Етидиевият бромид е канцероген. Манипулирайте с подходящи лични предпазни средства.**
- Изсипете 100 ml разтвор на гел в тавата за гел в електрофоретичната камера. Поставете 6 гел гребена (Продуктов № 103.101-21) в слотовете на тавата за гел.
- Оставете гела да се охлади за 15 минути.
- Изсипете 750 ml 0,5 x TBE буфер в резервоара за гел. Потопете тавата за гел в кутията и внимателно извадете 6-те гел гребена, като ги повдигнете.

Следвайте Инструкциите за употреба на производителя, когато използвате алтернативни системи за електрофореза. За да се използват с комплекти за HLA типизиране *Olerup SSP*®, тези системи трябва да могат да разделят PCR продукти с размер от 50 до 1100 базови двойки.

D. Поетапна процедура

1. От мястото за съхранение с посочената температура за съхранение извадете: подходящ брой ДНК проби, тави за праймера и желания обем основна смес и *Taq* полимераза (5 units/ μ l), необходими за избраните тави за ДНК проби/праймери. Размразете ги на стайна температура (20 до 25°C)

Една и съща основна смес се използва за всички комплекти *Olerup SSP*®.

2. Смесете за кратко ДНК пробите във вортекс миксер.
3. Поставете тавите за праймери в PCR поставката за тава.
4. **Комплекти с ниска и висока разрешителна способност**
 - Вортексирайте основния микс, преди да вземете аликвотните части.
 - С помощта на ръчна едноканална пипета добавете основен микс със стайна температура, *Taq* полимераза (5 units/ μ l) и dH₂O в епруветка от 0,5 ml или 1,5 ml. (Вижте таблица 1 по-долу за подходящите количества.)
 - Затворете епруветката и вортексирайте за 5 секунди. Завъртете импулсно епруветката в микроцентрофуга, за да свалите цялата течност от стените на епруветката.
 - С помощта на ръчна едноканална пипета добавете 8 μ l от сместа между основната смес и dH₂O и 2 μ l dH₂O в ямката с отрицателна контрола, т.е. ямката с праймерни двойки с отрицателна контрола в тавата за праймери.
 - С помощта на ръчна едноканална пипета добавете ДНК пробата със стайна температура към останалата смес между основната смес и dH₂O. (Вижте таблица 1 по-долу за подходящите количества.)
 - Затворете епруветката и вортексирайте за 5 секунди. Завъртете импулсно епруветката в микроцентрофуга, за да свалите цялата течност от стените на епруветката.
 - Използвайки електронен едноканален дозатор, аликвотирайте 10 μ l от реакционната смес на пробата във всяка ямка, с изключение на ямката с отрицателна контрола от тавата за праймери.

Таблица 1: Обеми на компонентите, необходими на тест за различен брой ямки при използването на основна смес без Taq полимераза.

Брой ямки на тест	Обем на основната смес (µl)	Обем на ДНК пробата (µl)	Обем на dH ₂ O (µl)	Обем на Taq полимераза (µl)	Брой ямки на тест	Обем на основната смес (µl)	Обем на ДНК пробата (µl)	Обем на dH ₂ O (µl)	Обем на Taq полимераза (µl)
2	12	8	19,7	0,3	25	87	58	142,7	2,3
3	15	10	24,6	0,4	26	90	60	147,6	2,4
4	18	12	29,5	0,5	27	93	62	152,5	2,5
5	21	14	34,4	0,6	28	96	64	157,4	2,6
6	24	16	39,4	0,6	29	99	66	162,4	2,6
7	27	18	44,2	0,8	30	102	68	167,3	2,7
8	30	20	49,2	0,8	31	105	70	172,2	2,8
9	33	22	54,1	0,9	32	108	72	177,1	2,9
10	36	24	59	1,0	36	126	84	206,6	3,4
11	39	26	63,9	1,1	40	138	92	226,3	3,7
12	42	28	68,9	1,1	44	150	100	246	4,0
13	45	30	73,8	1,2	48	162	108	265,7	4,3
14	48	32	78,7	1,3	52	174	116	285,4	4,6
15	51	34	83,6	1,4	56	186	124	305	5,0
16	54	36	88,6	1,4	60	198	132	324,7	5,3
17	60	40	98,4	1,6	64	210	140	344,4	5,6
18	63	42	103,3	1,7	68	228	152	373,9	6,1
19	66	44	108,2	1,8	72	240	160	393,6	6,4
20	69	46	113,2	1,8	76	252	168	413,3	6,7
21	72	48	118,1	1,9	80	264	176	433	7,0
22	75	50	123	2,0	84	276	184	452,6	7,4
23	78	52	127,9	2,1	88	288	192	472,3	7,7
24	81	54	132,8	2,2	92	300	200	492	8,0
					96	312	208	511,7	8,3

Препоръчаните обеми, изброени по-горе, включват обем за компенсирание на вариациите на пипетата и загубите на течност по вътрешните стени на епруветките.

5. Комбинирани комплекти A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ и DQA-DQB-DR Enhanced и комплект HLA-C с висока разрешителна способност за често изследвани алели

- Вортексирайте основната смес.
- С помощта на ръчна едноканална пипета добавете 8,3 µl Taq полимераза (5 units/µl) и 511,7 µl dH₂O със стайна температура в предоставената епруетка от 1,5 ml, съдържаща 312 µl основна смес.

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране *Olerup SSP*® без Taq полимераза

- Затворете епруветката и вортексирайте за 5 секунди. Завъртете импулсно епруветката в микроцентрифуга, за да свалите цялата течност от стените на епруветката.
- С помощта на ръчна едноканална пипета добавете 8 µl от сместа между основната смес, Taq полимераза и dH₂O и 2 µl dH₂O в ямката с отрицателна контрола № 96, т.е. ямката с праймерни двойки с отрицателна контрола.
- С помощта на ръчна едноканална пипета, добавете 206 µl от ДНК пробата със стайна температура към останалата смес между основната смес, Taq полимераза и dH₂O.
- Затворете епруветката и вортексирайте за 5 секунди. Завъртете импулсно епруветката в микроцентрифуга, за да свалите цялата течност от стените на епруветката.
- Използвайки електронен едноканален дозатор, аликвотирайте 10 µl от реакционната смес на пробата във всяка ямка, с изключение на ямката с отрицателна контрола № 96 от тавата за праймери.

Важно:

Не забравяйте да нанесете пробата над праймерите (изсушени на дъното на всяка ямка от тавата за праймери), за да избегнете кръстосано замърсяване между ямките. Докоснете вътрешната стена на кладенеца с върха на пипетата, за да позволите пробата да се плъзне надолу към дъното на ямката. Проверете дали всички проби са се утаили на дъното на всяка ямка. Ако не, почукайте леко тавата върху плота така, че всички проби да се утаят на дъното на ямките, преди да започнете PCR.

5. Покрийте тавите за праймери с предоставените адхезивни уплътнителни филми за PCR. Проверете дали всички реакционни ямки са напълно покрити, за да се предотврати загубата им при изпарение по време на PCR амплификацията. Може да поставите компресионна подложка *Olerup SSP*® (Продуктов № 103.505-06) върху адхезивните уплътнителни филми за PCR, за да се предотврати изпаряването по време на термичен цикъл.
6. Поставете тавите за праймери в термоциклер с подходящ адаптер за тави с епруветки. Не допускайте повече от 5 минути закъснение между настройката на PCR и термичното циклиране.
7. Въведете програмния си номер за *Olerup SSP*®. Задайте 10 µl реактивен обем.
8. Стартирайте PCR програмата. Програмата е с продължителност от приблизително 1 час и 20 минути.
9. Извадете тавите за праймери от термоциклера. Огледайте тавата за PCR, за да се уверите, че има приблизително еднакъв обем течност във всяка ямка за PCR. Електрофорезирайте пробите, вижте раздел Е – „Гел електрофореза“ по-долу. Интерпретирайте резултатите от типизирането с помощта на **таблиците за интерпретация и специфичност на конкретни партии или работния лист**, вижте раздела „Очаквани стойности“ по-долу.

Е. Гел електрофореза

1. След завършване на PCR реакцията поставете тавата за праймери и кутията с гел. Последователността на ямките е от ляво надясно и от горе надолу.
2. Внимателно отстранете капациите на лентите, без да разливате продуктите за PCR.
3. Заредете последователно PCR продуктите в 2% агарозен гел. (Не е необходимо добавянето на буфер за зареждане с гел.) Препоръчва се използването на 8-канална пипета за зареждане с гел.
4. Заредете маркер за размера на ДНК (стълба от 100 базови двойки, маркер за размера на ДНК с продуктове № 103.202-100 или маркер за размера на ДНК за къси гел серии с продуктове № 103.203-100) в една от ямките на всеки ред.
5. Покрийте кутията с гел с капачката на кутията за гел.
6. Електрофорезирайте гела в 0,5 x TBE буфер, без повторна циркулация на буфера, за 15 – 20 минути при 8 – 10 V/cm.
7. Прехвърлете тавата за гел с гела в UV трансилюминатор.
8. Фотографирайте гела с или без тавата за гел.
9. Маркирайте снимката според правилата на лабораторията.

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

Насоките за HLA тестване на Американското дружество за хистосъвместимост и имуногенетика (ASHI) гласят, че във всяка настройка за PCR трябва да се включи отрицателна контрола (за замърсяване). (Ревизирани стандарти за акредитирани лаборатории, Американско дружество за хистосъвместимост и имуногенетика, Окончателно ревизирани стандарти, одобрени от CMS: 16 февруари 2021 г.). Отрицателна контролна ямка е включена във всички комплекти, с изключение на HLA-B* 27 – единична доза и комплектите за единични ямки HLA-B* 27.

Вижте раздела „Интерпретация на гела“ на стр. 14.

РЕЗУЛТАТИ

Специфичните за партидата листове за проверка на клетъчните линии и сертификатът за анализ са достъпни онлайн на адрес www.caredx.com.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

1. Процесът на PCR-SSP изисква силно контролирани условия на тестване, за да се осигури необходимата дискриминационна амплификация. Процедурата, описана в тези Инструкции за употреба, трябва да се спазва стриктно.
2. Извлечената ДНК проба е шаблонът за конкретния процес на PCR амплификация. Пречистената ДНК трябва да има коефициент $A_{260/280}$ между 1,6 и 2,0, за да получи оптимална визуализация на лентата чрез електрофореза.
3. Всички апарати, напр. термоциклерът, устройствата за пипетиране, трябва да бъдат калибрирани съгласно препоръките на производителя.
4. Информация за конкретната партида е предоставена в листовката на продукта: Информация и работен лист за конкретната партида.
5. Въз основа на проведените тестове следните вещества са оценени с три (3) метода на екстракция при изброените концентрации и е установено, че те не влияят на резултатите от изпитването.

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране Olerup SSP® без Таq полимераза

Метод на екстракция	Интерфериращо вещество	Интерферентна концентрация*
Система за извличане на ДНК от кръв EZ1 DSP	Билирубин	200 mg/L
	Хемоглобин	200 g/L
	Триглицериди	30 g/L
	Протеин	110 g/L
Комплект за извличане на ДНК от кръв QIAamp DSP	Билирубин	200 mg/L
	Хемоглобин	200 g/L
	Триглицериди	18,2 g/L
	Протеин	77 – 96 g/L
Метод Gentra PureGene	Билирубин	200 mg/L
	Хемоглобин	200 g/L
	Триглицериди	18,2 g/L
	Протеин	119 – 146 g/L

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране Olerup SSP® без Taq полимераза

6. PCR плаките са физически съвместими с повечето термоциклери, предлагани на пазара. Вижте таблицата за съвместимост на термоциклерите с пластмаса по-долу.

Забележка: Таблицата е дадена само за ориентир. За валидирани термоциклери, моля, вижте раздела „Изисквания към апарата – Апарат“.

Таблица за съвместимост	
Производител	Термоциклер
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-ямков
	ProFlex 2x96-ямков
	Veriti 0.2ml 96-ямков блок
	GeneAmp 2700, 2720, 9600
Agilent (Stratagene)	SureCycler 8800
	RoboCycler
	Gradient Cycler
Biometra	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
	TRobot
	TProfessional
Bio-Rad	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 с 96-ямков блок
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

7. Ефективността на този комплект, използващ основна смес без включена Taq полимераза, е потвърдена само с ДНК Taq полимераза на Roche, клас GMP [Каталожен # 03 734 927 001 или #03 734 935 001). Ефективността на анализа с използване на други ензими е неизвестна и трябва да бъде установена и валидирана от потребителя.

Комплекти за HLA типизиране 1178-LBL v04 Olerup SSP® без Taq полимераза За *инвитро* диагностична употреба










ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

А. Анализ на данните

Разгледайте внимателно снимките на гела и определете положителните линии.

1. По-бързо мигрираща, по-къса лента ще се види в гел лентата в случай на амплификация на специфични HLA алели. Това показва положителен резултат от теста.
 - a. Запишете наличието и отсъствието на специфични PCR продукти.
 - b. При интерпретиране на резултатите от гела е полезно да се следят относителните дължини на специфичните PCR продукти, както е дадено в листовката на продукта за конкретната партида. Няколко ленти имат две или повече възможни дължини на специфичните PCR продукти. Тези ямки съдържат множество двойки праймери, генериращи PCR продукти с различни размери в зависимост от HLA алела(ите) на ДНК на пробата.
 - c. Съпоставете модела на гел лентите със специфични PCR продукти с информацията в таблиците за интерпретация и специфичност на конкретната партидата, за да получите HLA типизиране на ДНК пробата.
2. Вътрешна лента за положителен контрол, по-бавно мигрираща и по-дълга, трябва да бъде видима във всички гел ленти, с изключение на гел лентата с отрицателна контрола, като контрол на успешното амплифициране. Вътрешната лента за положителна контрола може да е слаба или да липсва в гел лентите с положителен резултат.
 - a. Запишете наличието и относителните дължини на вътрешните ленти за положителен контрол. Контролните ленти с различен размер ще помогнат за правилната ориентация на типизирането, както и за идентификация на комплекта.
 - b. Липсата на лента за вътрешна положителна контрола без специфичен PCR продукт показва неуспешна PCR реакция.
 - i. Ако HLA алелите могат да бъдат определени в присъствието на неуспешни PCR реакции и неуспешните PCR реакции не променят присвояването на алела, тогава не е необходимо да се повтаря тестът.
 - ii. Ако обаче неуспешните PCR реакции могат да променят присвояването на HLA алела, тогава типизирането трябва да се повтори.
3. Наличието на специфичен PCR продукт или лента за вътрешна положителна контрола в лентите за отрицателна контрола показва замърсяване с PCR продукти и анулира всички резултати от теста. В лентите за отрицателна контрола могат да се наблюдават праймерни олигомери с размер от 40 до 60 базови двойки. Това не се счита за замърсяване.

В. Интерпретация на гела

	Положителна реакция	Отрицателна реакция	Неуспешна PCR реакция
Ямка			
Положителна вътрешна контролна лента			
Специфична лента			
Праймерна лента			

1. Маркер за размера на ДНК (стълба от 100 базови двойки, маркер за размера на ДНК с продуктове № 103.202-100 или маркер за размера на ДНК за кратки гел серии с продуктове № 103.203-100) трябва да се зареди в една от ямките на всеки ред от гела или в съответствие с местните указания за лабораторна акредитация.
2. Могат да се получат ленти, по-дълги от лентата за вътрешна положителна контрола, които трябва да бъдат пренебрегнати при тълкуването на резултатите от типизирането.
3. Неизползваните праймери ще образуват дифузна по-къса лента от 50 базови двойки.
4. Може да се наблюдават артефакти от олигомерни праймери. Те са по-дълги от лентата на праймера, но по-къси от специфичните ленти.

СПЕЦИФИЧНИ РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Контрол на качеството на комплекта

Всеки праймерен разтвор се тества чрез панел от 48 ДНК проби от добре характеризирани клетъчни линии на IHC, вижте листовите за валидиране на специфичните за партидата клетъчни линии в листовката на продукта с информацията за конкретната партида.

Сравнителни методи

Проведено е проучване за сравняване на комплектите за HLA типизиране *Olerup SSP*[®] с и без включена *Taq* полимераза, предоставена в основната смес за PCR. Целта на проучването е да покаже, че ръчното добавяне не влияе върху резултатите от анализа и че различните партиди *Taq* полимераза дават едни и същи резултати. За *in vitro* диагностична употреба

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране Olerup SSP® без Taq полимераза

същи резултати. Проучването включва HLA-A, HLA-B (клас I) и HLA-DRB (клас II) типизиране на ниска разрешителна способност на 15 ДНК проби с известен HLA генотип, получен на Международните семинари по хистосъвместимост. Пробите са подготвени и кодирани от персонал, различен от този, който извършва тестването; изпитващият персонал е заслепен за типовете HLA на пробите. Всяка проба е тествана паралелно с комбинирана тава с HLA-AB-DR Olerup SSP® с основна смес за PCR без включена Taq полимераза („Тест“) и комбинираната тава с HLA-AB-DR Olerup SSP® с основна смес за PCR с включена Taq полимераза („Контрола“) в съответствие с инструкциите за всеки от анализите, включени в листовката на продукта. Всички тестове са проведени в лаборатория CareDx AB Laboratory в Стокхолм, Швеция с използването на една партида от комплекта и две партиди Taq полимераза. В проучването е използвана ДНК Taq полимераза на Roche, клас GMP. Тестването на всяка проба се състои в типизиране с ниска разрешителна способност с комбинираната тава с HLA-AB-DR Olerup SSP®, извършена с: 1) Основна смес за PCR с включена Taq полимераза (изчистен от FDA анализ) (Контролен анализ), 2) Основна смес за PCR плюс ДНК Taq полимераза на Roche, продукт клас GMP, 5 U/μL; Партида #1 (Тествана партида #1) и 3) Основна смес за PCR плюс ДНК Taq полимераза на Roche, продукт клас GMP, 5 U/μL; Партида #2 (Тествана партида #2). Детекцията се извършва с помощта на гел електрофореза след извършването на PCR. Резултатите са обобщени по-долу.

Сравнение	Съвпадение			% Съвпадение (95% Доверителен интервал ^a)
	Резултати от типизиране за клас I (# съвпадение/общо)		Резултати от типизиране за клас II (# съвпадение/общо)	
	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB	
Тествана партида #1/Контролна партида	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Тествана партида #1/Консенсус ^b	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Тествана партида #2/Контролна партида	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Тествана партида #2/Консенсус	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Тествана партида #1/Тествана партида #2	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)

Комплекти за HLA типизиране 1178-LBL v04 Olerup SSP® без Taq полимераза За *инвитро* диагностична употреба

^a Метод на оценка

^b Консенсусен резултат от генотип, получен на Международните семинари по хистосъвместимост

БИБЛИОГРАФИЯ

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. Актуални HLA алели можете да намерите на www.ebi.ac.uk/imgt/hla

ОТСТРАНЯВАНЕ НА НЕИЗПРАВНОСТИ

Проблем	Причина	Действие
Липса на амплификация (липса на амплификация както на фрагментите за вътрешна контрола, така и на специфичните амплификации).	Твърде ниско количество на ДНК.	Измерете концентрацията на ДНК и вижте дали добавеното количество е правилно. Замърсяването с РНК може да причини спектрофотометрично надценяване на концентрацията на ДНК. Повторете екстракцията на ДНК внимателно с прясно приготвени разтвори. Препоръчваме автоматизирано изолиране на ДНК чрез системата за извличане на ДНК от кръвна проба EZ1 DSP на QIAGEN.
	ДНК съдържа PCR инхибитори, напр. протеини, етанол (от етапите на утаяване), останали матрици от продукти за твърдофазно пречистване на ДНК.	Измерете качеството на ДНК. Препоръчваме коефициент A260/A280 от 1,6 – 2,0 чрез UV спектрофотометрия. Следвайте точно протокола за извличане на ДНК на доставчика. Извършете повторно извличане на ДНК. Препоръчваме автоматизирано изолиране на ДНК чрез системата за извличане на ДНК от кръвна проба EZ1 DSP на QIAGEN.
	ДНК е извлечена от хепаринизирана кръв.	Използвайте нехепаринизирана кръв или протоколи за извличане на ДНК от хепаринизирана кръв.

Проблем	Причина	Действие
Продължение: Липса на амплификация (липса на амплификация както на фрагментите за вътрешна контрола, така и на специфичните амплификации).	ДНК е разтворена в буфер, съдържащ EDTA.	Повторете екстракцията на ДНК и разтворете ДНК в dH ₂ O.
	Случайно попадане на белина в теста.	Прегледайте областите, където евентуално може да попадне белина.
	Комплектите не се съхраняват при подходящата температура.	Съхранявайте комплектите при температура от -20°C.
	Термоциклерът не работи правилно.	Калибрирайте термоциклера и проверете PCR програмата. Термоциклерът, използван за рутинно PCR-SSP типизиране, трябва да се калибрира на всеки 6 – 12 месеца.
Произволен неуспех на амплификацията (отпадане).	Неправилен контакт между нагревателния блок на термоциклера и тавата за SSP типизиране.	Използвайте подходяща тава/фиксатор за 0,2 ml тънкостенни реакционни ямки, вижте ръководството на термоциклера.
	Уплътнителните филми/капачките за епруветки за PCR не са плътно затворени, което води до изпарение и последващ неуспех на амплификацията.	Уверете се, че уплътнителните филми/капачките за епруветки за PCR са плътно затворени. Може да поставите компресионна подложка <i>Olerup SSP</i> [®] (Продуктов № 103.505-06) върху адхезивните уплътнителни филми за PCR, за да се предотврати изпаряването по време на термичен цикъл.
	Грешки при зареждане с гел.	Проверете дали е зареден правилният брой ямки и дали всяка

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране *Olerup SSP*[®] без Taq полимераза

Проблем	Причина	Действие
		ямка съдържа приблизително еднакъв обем смес за PCR.
	Използване на некалибрирани пипети.	Калибрирайте всички пипети редовно според препоръките на доставчика.
	Грешки при пипетиране.	Извършвайте пипетирането по-внимателно.
	Основната смес и ДНК на пробата не са били правилно смесени преди употреба.	Разбъркайте за кратко чрез вортексиране преди употреба. Препоръчваме да вортексирате след всеки ред.
	Към ямките се добавя неравномерен обем от сместа между ДНК и основната смес.	Извършвайте пипетирането по-внимателно.
Слаби фрагменти за вътрешен контрол.	Нечиста ДНК.	Измерете качеството на ДНК. Коефициентът A260/A280 трябва да бъде 1,6 – 2,0 чрез UV спектрофотометрия. Замърсяването с РНК може да причини спектрофотометрично надценяване на концентрацията на ДНК. Деградираната ДНК води до размазване в гел лентите. Повторете екстракцията на ДНК внимателно с прясно приготвени разтвори. Препоръчваме автоматизирано изолиране на ДНК чрез системата за извличане на ДНК от кръвна проба EZ1 DSP на QIAGEN.

Проблем	Причина	Действие
Продължение: Слаби фрагменти за вътрешен контрол.	Твърде ниско количество на ДНК.	и регулирайте до 30 ng/µl или до 15 ng/µl за ДНК, извлечена чрез система за извличане на ДНК от кръв EZ1 DSP на QIAGEN. Замърсяването с РНК може да причини спектрофотометрично надценяване на концентрацията на ДНК. Деградираната ДНК води до размазване в гел лентите. Повторете екстракцията на ДНК внимателно с прясно приготвени разтвори. Препоръчваме автоматична екстракция на ДНК чрез система за извличане на ДНК от кръв EZ1 DSP на QIAGEN.
	Твърде висока температура на отгряване, термоциклерът не е калибриран.	Калибрирайте термоциклера и проверете PCR програмата. Термоциклерът, използван за рутинно PCR-SSP типизиране, трябва да се калибрира на всеки 6 – 12 месеца.
	Основната смес за PCR се съхранява при температура от +4°C повече от 2 седмици.	Съхранявайте правилно основната смес за PCR.

Проблем	Причина	Действие
Неспецифични амплификации (стълби или намазки).	Използване на прекомерно количество ДНК проба.	Измерете концентрацията на ДНК и регулирайте до 30 ng/µl или до 15 ng/µl за ДНК, извлечена чрез система за извличане на ДНК от кръв EZ1 DSP на QIAGEN. Някои праймерни решения имат по-висока тенденция да пораждат неспецифична амплификация, вижте бележките под линия във всяка таблица за специфичност на всяка конкретна партида.
	Нечиста ДНК.	Всички фрагменти, по-големи от фрагмента на вътрешния контрол, трябва да бъдат игнорирани при интерпретирането на получените резултати. Проверете качеството на ДНК. Повторете извличането на ДНК. Препоръчваме автоматизирано изолиране на ДНК чрез системата за извличане на ДНК от кръвна проба EZ1 DSP на QIAGEN. Някои праймерни решения имат по-висока тенденция да пораждат неспецифична амплификация, вижте бележките под линия във всяка таблица за специфичност на всяка конкретна партида.

Проблем	Причина	Действие
Все по-слаби сигнали за амплификация с течение на времето.	Оцветяващият разтвор на етидиев бромид агарозен гел е стар.	Пригответе пресен разтвор на етидиев бромид, за да постигнете по-добро оцветяване на агарозния гел и да получите по-добър сигнал. Облаците на праймера са лесни за откриване, ако оцветяването на агарозния гел е нормално.
	Една от UV лампите е счупена.	Проверете оборудването с UV светлина. Облаците на праймера са лесни за откриване, ако UV светлината е нормална.
	Използвано е твърде малко количество ДНК проба.	Измерете концентрацията на ДНК и регулирайте до 30 ng/µl или до 15 ng/µl за ДНК, извлечена чрез система за извличане на ДНК от кръв EZ1 DSP на QIAGEN.
	Твърде висока температура на отгряване, термоциклерът не е калибриран.	Калибрирайте термоциклера и проверете PCR програмата. Термоциклерът, използван за рутинно PCR-SSP типизиране, трябва да се калибрира на всеки 6 – 12 месеца.
Странни модели на амплификация.	Използва се неправилна таблица за интерпретация/работен лист за конкретната партида.	Проверете номера на партидата на използвания продукт и използваната таблица за интерпретация/работен лист.
	Неправилна последователност при зареждане с гел.	Проверете подравняването на смесите и гел лентите.

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране *Olerup SSP*[®] без Таq полимераза

Проблем	Причина	Действие
	Моделът на амплификация съдържа фалшиво положителни резултати.	Вижте по-долу.
	Моделът на амплификация съдържа фалшиво отрицателни резултати.	Вижте по-долу.
Фалшиво положителни амплификации.	Замърсяване на ДНК.	Използвайте ръкавици, накрайници за пипети, съдържащи бариери (филтърни тапи) и отделни помещения за работа с пробата преди и след PCR. Осигурете прецизно боравене с всички проби във всички стъпки. Проверете за замърсяване с помощта на тестов комплект за проби от повърхности <i>Olerup SSP</i> [®] .
	Нечиста ДНК.	Измерете качеството на ДНК. Следвайте точно протокола за извличане на ДНК на доставчика. Изпробвайте други системи за извличане на ДНК. Извършете повторно извличане на ДНК. Препоръчваме автоматична екстракция на ДНК чрез система за извличане на ДНК от кръв EZ1 DSP на QIAGEN.
	Използване на прекомерно количество ДНК проба.	Измерете концентрацията на ДНК и регулирайте до 30 ng/µl или до 15 ng/µl за ДНК, извлечена чрез

Проблем	Причина	Действие
		система за извличане на ДНК от кръв EZ1 DSP на QIAGEN.
	Твърде ниска температура на отгряване.	Калибрирайте термоциклера и проверете PCR програмата. Термоциклерът, използван за рутинно PCR-SSP типизиране, трябва да се калибрира на всеки 6 – 12 месеца.
	Голямо забавяне между настройката на PCR и началото на термичния цикъл.	Не трябва да се допуска над 5-минутно забавяне преди термичното циклиране.
	Забавяне между поставянето на тавите за типизиране в термичен цикъл и началото на циклирането.	Използвайте предварително загрят термоциклер.
Продължение: Фалшиво положителни амплификации.	Използване на прекомерно количество етидиев бромид.	Използвайте препоръчителното количество етидиев бромид.
	Неправилно тълкуване на артефакт като специфична лента.	Проверете таблицата за интерпретация на конкретната партида/работния лист и таблицата за специфичност за правилния размер на лентата и бележките под линия.
	Моделът на амплификация съдържа фалшиво положителни резултати.	Проверете дали всички специфични амплификации са с правилни размери или дали даден артефакт (пренасяне, праймер-димер) е погрешно интерпретиран като амплификация.
	Неправилна последователност при зареждане с гел.	Проверете подравняването на смесите и гел лентите.

Проблем	Причина	Действие
Фалшиви отрицателни амплификации.	Термоциклерът не е правилно калибриран.	Калибрирайте термоциклера и проверете PCR програмата. Термоциклерът, използван за рутинно PCR-SSP типизиране, трябва да се калибрира на всеки 6 – 12 месеца. Ако резултатите не бъдат коригирани чрез повторно калибриране, въведете отново теста с референтна проба със същата специфичност. Ако се потвърдят отрицателните амплификации, свържете се с екипа за поддръжка на клиенти.
	Неправилна последователност при зареждане с гел.	Проверете подравняването на смесите и гел лентите.
Цялостни проблеми с гела (размити гелове и/или размазани ленти).	Деградирана ДНК проба.	Появява се като намазка в гел лентите. Изолирайте ДНК от прясна проба.
	Резки линии в произволни ямки.	Неравномерно суспендиране на ДНК. Уверете се, че ДНК на пробата е разтворена, преди да вземете аликвотната част. Вортексирайте разредената ДНК проба.
	PCR продуктът се излива от ямката.	Внимателно подравнете върховете на пипетата с ямките за гел и накапете бавно.
	Буферът за електрофореза може да е твърде топъл.	Подгответе нов TBE буфер. Работете при по-ниско напрежение.

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране Olerup SSP® без Taq полимераза

Проблем	Причина	Действие
Цялостни проблеми с гела (размити гелове и/или размазани ленти).	Използван е неправилен процент агарозен гел.	Уверете се, че се използва препоръчителният 2% агарозен гел.
	Агарозата не е напълно разтворена.	Затоплете отново за кратко, за да се разтопи агарозата.
	Неправилна концентрация на TBE.	Използвайте препоръчителната концентрация от 0,5 x TBE.
	Гелове са твърде скоро отлети.	Гелове са готови за употреба едва 15 минути след отливането.
	Гелове са твърде стари.	Не отливайте гелове твърде дълго време преди работа с тях.
	Използваният гел гребен има твърде дебели прорези.	Използвайте гребени с тънки прорези (4 x 1 mm).
	Гел тавата не е прозрачна на UV лъчи.	Извадете гела от гел тавата, преди да прегледате данните.
	Фотографията на гела е твърде светла.	Използване на прекомерно количество етидиев бромид. Проверете настройките на камерата.
	Фотографията на гела е твърде тъмна.	Използвайте препоръчителното количество етидиев бромид. Проверете настройките на камерата.

Проблем	Причина	Действие
Общи проблеми с фалшиво отрицателна амплификация или проблеми от подобен характер, свързани с изпълнение на циклите	Рампата е настроена твърде високо.	Комплектите на <i>Olerup SSP</i> се валидират с помощта на циклер GeneAmp 9700, зададен в режим 9600, и ProFlex със скорост на рампата 3°C/s. Повисоката скорост на рампата от описаната може да окаже влияние върху резултатите от типизирането.

ТЪРГОВСКИ МАРКИ, ИЗПОЛЗВАНИ В ТОЗИ ДОКУМЕНТ/ПРОДУКТ

Olerup SSP[®] е регистрирана търговска марка на *CareDx AB*.
Qiagen[™] е търговска марка на QIAGEN.

ЗАБЕЛЕЖКА ЗА КУПУВАЧА: Комплектите *Olerup SSP*[®] без включена *Taq* полимераза – Този продукт е оптимизиран за използване с *Taq* полимераза на Roche, клас GMP (Каталожен # 03 734 927 001 или #03 734 935 001) в процеса на полимеразна верижна реакция („PCR“), която може да е обект на патенти от страна на Roche Molecular Systems, Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd. („Roche“). Лабораторията носи отговорността да се свърже с Roche Molecular Systems, Inc., за да се определи дали е необходимо издаването на лиценз във връзка с тези патенти.

ОТГОВОРНОСТ

CareDx AB предоставя гаранция за своите продукти на първоначалния купувач срещу дефекти в материалите и изработката при нормална употреба и приложение. Единственото задължение на *CareDx AB* по тази гаранция е да замени безплатно всеки продукт, който не отговаря на стандартите за експлоатация, посочени в спецификацията на продукта.

Тази гаранция се отнася само за продукти, които са били обработвани и съхранявани в съответствие с препоръките на *CareDx AB*, и не се отнася за продукти, които са били обект на промяна, неправилна употреба или злоупотреба.

Всички претенции във връзка с тази гаранция трябва да бъдат отправени към *CareDx AB* в писмен вид и да бъдат придружени от копие от фактурата на купувача. Тази гаранция заменя всички други гаранции, изказани или подразбиращи се, включително гаранциите за продаваемост и годност за конкретна цел. *CareDx AB* не носи отговорност за случайно настъпили или последващи щети.

Този продукт не може да бъде преформулиран, опакован или препродаван под каквато и да е форма без писменото съгласие на *CareDx AB*, Franzégatan 5, SE-112 51 Стокхолм, Швеция.

Инструкции за употреба
Комплекти за HLA типизиране *Olerup SSP*® без Таq полимераза

Работете с всички проби, сякаш са в състояние да предават заболявания. Всички работи трябва да се извършват с ръкавици и с подходящи лични предпазни средства.

ГАРАНЦИЯ

CareDx AB гарантира, че праймерите в тавите за типизиране на *Olerup SSP*® притежават спецификите, посочени в работния лист, таблиците за интерпретация и специфичност на конкретни партии от листовката с информация за продукта.

АДРЕСИ:

Производител:

CareDx AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Стокхолм, Швеция

Тел: +46-8-508 939 00

Факс: +46-8-717 88 18

Имейл: orders-se@caredx.com

Уеб страница: www.caredx.com

Дистрибутор:

CareDx AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Стокхолм, Швеция

Тел: +46-8-508 939 00

Факс: +46-8-717 88 18

Имейл: orders-se@caredx.com

Уеб страница: www.caredx.com

CareDx Lab Solutions Inc., 901 S. Bolmar St., Suite R, Уест Честър, Пенсилвания
19382

Тел: 1-877-653-7871

Факс: 610-344-7989

Имейл: orders-us@caredx.com

Уеб страница: www.caredx.com

CareDx Pty Ltd., 20 Collie Street, Фримантъл, Западна Австралия 6160,
Австралия.

Тел: +61 8 9336 4212

Имейл: orders-aus@caredx.com

Уеб страница: www.caredx.com

Упълномощен представител

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

За информация относно дистрибуторите на CareDx в световен мащаб се свържете с CareDx AB.

1178-LBL v04 е превод на английския оригинален документ 0193-LBL v07 Olerup SSP® HLA typing kits without Taq polymerase (Комплекти за HLA типизиране без Taq полимераза 0193-LBL v07 Olerup SSP®).

Извършени промени в преработено издание 0193-LBL, Версия 07 в сравнение с 0193-LBL, Версия 06:

1. Добавяне на швейцарски Упълномощен представител.
2. Добавяне на GelRed към раздел В. Необходими материали, които не са включени в комплекта.