



# Brugsanvisning

## Olerup SSP<sup>®</sup> uden Taq polymerase

© 2023 CareDx, Inc. Alle servicemærker eller varemærker ejes eller licenseres af CareDx, Inc. eller dets associerede selskaber. Alle rettigheder forbeholdes.

1587-LBL v02 Olerup SSP<sup>®</sup> HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase

Til *in vitro* diagnostisk anvendelse

Revideret september 2023



Side 1 af 29

## Til *in vitro* diagnostisk brug

### TILSIGTETANVENDELSE

Olerup SSP® HLA-sæt til genotypebestemmelse er kvalitative *in vitro* diagnosesæt til DNA-genotypebestemmelse af HLA klasse I- og Klasse II-alleler. Produkterne anvendes af uddannede fagfolk i medicinske omgivelser med det formål at bestemme HLA fænotype. Det testede kildemateriale er DNA.

### RESUMÉ OG FORKLARING

Humane leukocytantigener (HLA) blev tidligere bestemt ved lymfocytotoksicitetstesten. Denne test er siden blevet erstattet af polymerasekædereaktion (PCR)-baserede DNA-typningsteknikker på grund af dens fejlrate og manglende opløsning på allelniveau. I de fleste PCR-baserede teknikker bruges PCR-processen kun som et amplifikationstrin af det nødvendige mål-DNA, og et post-amplifikationstrin for at skelne mellem de forskellige alleler er påkrævet. I modsætning hertil sker sondringen mellem de forskellige alleler i PCR-SSP-metoden (sekvensspecifik primer – SSP) under PCR-processen. Dette forkorter og forenkler post-amplifikationstrinnet til et simpelt gelelektroforesedetektionstrin. SSP-testresultaterne er enten positive eller negative, hvilket fjerner behovet for kompliceret tolkning af resultater. Derudover er typeopløsningen af PCR-SSP højere end for andre PCR-baserede typebestemmelsesteknikker, da hvert primerpar definerer to sekvensmotiver placeret i *cis*, dvs. på det samme kromosom. På grund af SSP-reagensers syntetiske natur er stabiliteten desuden blevet forbedret og parti-til-parti variationen reduceret.

### PROCEDUREPRINCIP

PCR-SSP-metodikken er baseret på princippet om, at fuldstændigt eller næsten fuldstændigt matchede oligonukleotidprimers uden 3'-endefejlpasninger anvendes mere effektivt i PCR-reaktionen end mismatched primere af termostabile DNA-polymeraser uden korrektionsevne. Primerpar er designet til at blive matchet med enkelte alleler eller gruppe(r) af alleler afhængigt af graden af påkrævet genotypebestemmelsesopløsning. Under strengt kontrollerede PCR-betingelser tillader matchede eller næsten fuldstændigt matchede primerpar amplifikation at forekomme, dvs. et positivt resultat, hvorimod mismatched primerpar ikke tillader amplifikation at forekomme, dvs. et negativt resultat.

Efter PCR-processen adskilles de amplificerede DNA-fragmenter efter størrelse, f.eks. ved agarosegelelektroforese, visualiseres ved farvning med ethidiumbromid og eksponering for ultraviolet lys, dokumenteret ved fotografering og fortolket. Fortolkningen af PCR-SSP-resultater er baseret på tilstedeværelsen eller fraværet af specifik(ke) PCR-produkt(er). De relative størrelser af det eller de specifikke PCR-produkter kan være nyttige i fortolkningen af resultaterne. PCR-SSP-metoden for HLA blev oprindeligt beskrevet af O. Olerup i 1991 og 1992<sup>1,2</sup>.

Da PCR-processen kan påvirkes negativt af forskellige faktorer (f.eks. pipetteringsfejl, for lav DNA-koncentration, dårlig DNA-kvalitet, tilstedeværelse af PCR-hæmmere, termisk cyklusunøjagtighed), indgår et internt positivt kontrolprimerpar i hver PCR-reaktion<sup>2</sup>. Det interne positive kontrolprimerpar matcher konserverede områder af det

humane væksthormongen, som er til stede i alle humane DNA-prøver. I nærvær af et specifikt PCR-produkt af en eller flere HLA-alleler kan produktet af det interne positive kontrolbånd være svagt eller fraværende. De amplikoner, der genereres af de specifikke HLA-primerpar, er kortere end amplikonerne i det interne positive kontrolprimerpar, men større end ikke-inkorporerede primere (se Forventede værdier).

## REAGENSER

### A. Identifikation

Olerup SSP® typesættene indeholder tørrede, foroptimerede sekvensspecifikke primere til PCR-amplifikation af HLA-alleler og af det humane væksthormongen, PCR Master Mix uden Taq-polymerase ("Master Mix") og klæbende PCR-tætninger.

Primeropløsningerne præ-aliciteret og tørres i 0,2 ml brønde af skårne, tyndvæggede PCR-plader. Hver brønd i pladen indeholder en tørret primeropløsning bestående af en specifik primerblanding, dvs. allel- og gruppespecifikke HLA-primere, samt et internt positivt kontrolprimerpar, der matcher ikke-alleliske sekvenser og er klar til tilsætning af DNA-prøve, Master Mix og H<sub>2</sub>O.

Primerne er designet til optimal PCR-amplifikation ved brug af Master Mix og det anbefalede DNA-cyklusprogram (se Programmering af termocykler).

Partispecifikke specificitets- og fortolkningstabeller eller regneark for de specifikke HLA-alleler, der forstærkes af hver primerblanding, kan hentes fra hjemmesiden [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### B. Advarsler og forholdsregler

1. Til *in vitro* diagnostisk brug.
2. Dette produkt bør ikke anvendes som eneste grundlag for at træffe en klinisk beslutning.
3. Advarsel om biofare: Alle blodprodukter skal behandles som potentielt smitsomme. Ingen af de kendte testmetoder kan give sikkerhed for, at produkter, der stammer fra humant blod, ikke overfører smitsomme stoffer.
4. Advarsel om biofare: Ethidiumbromid, der anvendes til farvning af DNA i agarosegelelektroforesen, er kræftfremkaldende. Håndter med passende personlige værnemidler.
5. Forsigtig: Bær UV-blokerende øjenbeskyttelse, og se ikke direkte ind i UV-lyskilden, når du ser eller fotograferer geler.
6. Pipetter og andet udstyr, der bruges til **post**-PCR-manipulationer, bør **ikke** bruges til **pre**-PCR-manipulationer.
7. Se sikkerhedsdatabladet ([www.caredx.com](http://www.caredx.com)) for at få detaljerede oplysninger.

### C. Brugsanvisning

Se Brugsvejledning.

**D. Opbevaringsvejledning**

Opbevar sætkomponenter i mørke og ved temperaturer, der er angivet på emballageetiketterne.

Brug inden udløbsdatoen, som er trykt på emballageetiketterne.

**E: Oprensning eller behandling krævet til brug**

Se Brugsvejledning.

**F. Indikationer på ustabilitet**

1. Brug ikke primerplader med revner i brøndene eller beskadigelse af brøndenes øverste kant, da dette kan forårsage fordampning under PCR-amplifikation. Brug ikke PCR-hættestrimler med revner, da dette kan forårsage fordampning under PCR-amplifikation.
2. Pellets i brøndene skal være røde i farven. Gul misfarvning af pellet kan indikere nedbrydning.
3. Master Mix skal være rød til lilla i farven. Gul til orange misfarvning kan indikere nedbrydning.

**INSTRUMENTKRAV****A. Instrument**

Der skal anvendes en termocycler med følgende minimumsspecifikationer:

- opvarmet låg med en temperatur på 104 °C til oliefri drift
- prøveblok (aluminium, sølv eller forgyldt sølv) til brug med enten en 96-brønds PCR-plade eller 0,2 ml tyndvæggede reaktionsrør
- Olerup SSP-sæt valideres på følgende cykler.

Anbefalede reaktionshastigheder:

- GeneAmp 9700: GeneAmp 9700 cykler indstillet til 9600-tilstand. Dette svarer til en **prøvereaktionshastighed** på 1,6 °C/s op og 0,8 °C/s ned.
- ProFlex 1x96 brøndblok: ProFlex PCR-cycler med en blokreaktionshastighed på 3,0 °C/s (hvert trin 3,0 °C/s). En **blokreaktionshastighed** på 3,0 °C/s svarer til en prøveaktionshastighed på 1,52 °C/s op og 1,36 °C/s ned.
- ProFlex 2x96 brøndblok: ProFlex PCR-cycler med en blokreaktionshastighed på 3,0 °C/s (hvert trin 3,0 °C/s). En **blokreaktionshastighed** på 3,0 °C/s svarer til en prøveaktionshastighed på 1,9 °C/s op og 1,6 °C/s ned.

**Bemærk: Højere reaktionshastigheder end dem, der er beskrevet ovenfor, kan have en effekt på typebestemmelsesresultaterne.**

**Bemærk også, at effekten på typebestemmelsen kan variere mellem forskellige ikke-validerede cyclere afhængigt af indstillingerne.**

- temperaturområde fra 4,0 °C til 99,9 °C
- temperaturnøjagtighed på ±0,25 °C i området fra 35 °C til 99,9 °C
- ensartethed for prøveblokkens temperatur på ≤0,75 °C over området fra 55 °C til 95 °C
- temperaturkalibrering, der kan spores til en referencestandard (dvs. NIST)

Programmér termocycleren ved hjælp af PCR-cyklusparametrene i afsnit B nedenfor.

For specifikke termocycleroplysninger henvises til producentens brugervejledning. Termocyclere bør kalibreres i henhold til ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) eller EFI (European Federation of Immunogenetics) akkrediteringsregler.

Programmér termocycleren, før du starter brugsanvisningen beskrevet nedenfor.

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

**B. PCR cyklusparametre**

1.	1 cyklus	94°C	2 min	denaturering
2.	10 cyklus	94°C	10 sek.	denaturering
		65°C	60 sek.	hybridisering og forlængelse
3.	20 cyklus	94°C	10 sek.	denaturering
		61°C	50 sek.	hybridisering
		72°C	30 sek.	forlængelse
4.	Slut - hold	RT		hvis mindre end 8 timer
		4°C		hvis længere end 8 timer

Samlet reaktionsvolumen i hver brønd, 10 µl.

De samme PCR-cyklusparametre bruges til alle *Olerup SSP®*-sættene.

**INDSAMLING OG FORBEREDELSE AF PRØVER**

Ekstraheret, meget rent DNA er nødvendigt for SSP-typebestemmelser. DNA-prøver, der skal anvendes til PCR-SSP HLA-typebestemmelse, bør gen-suspenderes i dH<sub>2</sub>O. A<sub>260/280</sub>-forholdet skal være 1,6 - 2,0 ved UV-spektrofotometri for optimal båndvisualisering under elektroforese.

Vi anbefaler automatiseret DNA-ekstraktion med QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. ACD-blod bør anvendes som udgangsmateriale.

Alternativt kan DNA'et ekstraheres ved en hvilken som helst foretrukken metode, der giver rent DNA. Ved anvendelse af alternative metoder bør DNA-koncentrationen justeres til 30 ng/μl. **Brug ikke heparineret blod med disse metoder.**

Anbefalet DNA-koncentration ved brug af:  
EZ1-ekstraheret DNA, 15 ng/μl.  
DNA ekstraheret ved andre metoder, 30 ng/μl.

Koncentrationer på over 50 ng/μl vil øge risikoen for uspecifikke amplifikationer og svage ekstra bånd, især for HLA klasse I SSP-typebestemmelser i høj opløsning. Fortynd om nødvendigt det ekstraherede DNA i dH<sub>2</sub>O.

**DNA-prøver bør ikke suspenderes igen i opløsninger, der indeholder chelateringsmidler såsom EDTA, over 0,5 mM i koncentration.**

DNA-prøver kan anvendes umiddelbart efter ekstraktion eller opbevares ved +4 °C i op til 2 uger uden nogen negativ indvirkning på resultaterne. DNA-prøver kan opbevares ved -20 °C eller koldere i 9 måneder. Renheden og koncentrationen af ekstraherede DNA-prøver, der har været opbevaret i en længere periode, bør testes for acceptabilitet inden HLA-typebestemmelse.

DNA-prøver skal sendes ved +4°C eller koldere for at bevare deres integritet under transport.

**PROCEDURE****A. Leverede materialer**

1. Olerup SSP® primerplader.
2. Master Mix uden Taq-polymerase (passende volumen til sættets plader).  
Det samme Master Mix bruges i alle Olerup SSP® sæt.
3. Selvklæbende PCR-tætninger (passende antal til sættets plader).

**B. Materialer, der kræves, men ikke leveres**

1. DNA-isolationssæt/-udstyr
2. UV-spektrofotometer
3. Pipetteringsanordninger. Vi anbefaler elektronisk enkeltkanals dispenser, der er i stand til at dispensere 10 µl alikvoter til tilsætning af DNA-Master Mix-dH<sub>2</sub>O-blandingen til pladebrøndene.
4. Engangs pipettespidser
5. Polypropylen rør
6. Vortexblander
7. Mikrocentrifuge
8. PCR pladestativ
9. Termocycler med opvarmet låg til PCR med 96-brønds format, en temperaturgradient over varmeblokken ≤ 0,75 °C og plade/holder til 0,2 ml tyndvæggede reaktionsbrønde
10. Mikrobølgeovn eller kogeplade til opvarmning af agaroseopløsninger
11. Agarose af elektroforese kvalitet, f.eks. FMC Seakem LE
12. 0,5 × TBE-buffer; 1 × TBE-buffer er 89 mM Tris-borat, 2 mM dinatrium EDTA, pH 8,0
13. Ethidiumbromid dråbeflaske Produkt nr. 103.301-10 eller GelRed dråbeflaske Produkt nr. 103.302-05
14. Gel-påfyldende pipetteringsanordning. Vi anbefaler 8-kanals pipette til gelpåfyldning, 5-25 µl justerbar volumen
15. DNA-størrelsesmarkør til at dække området 50-1.000 bp, f.eks. 100 baseparstige, DNA-størrelsesmarkørprodukt nr. 103.202-100 eller DNA-størrelsesmarkør til korte gelkørsler 103.203-100
16. Elektroforeseapparat/strømforsyning
17. UV-transilluminator
18. Fotografisk eller billedokumentationssystem
19. Roche Taq DNA-polymerase, GMP-kvalitet. [Katalog nr. 03 734 927 001 (1000 U) eller # 03 734 935 001 (5000 U)].

**C. Trin-for-trin procedure**

Se Brugsvejledning.



**BRUGSVEJLEDNING****A. Prøveforberedelse**

1. Oprens genomisk DNA fra leukocytpøven ifølge metode efter eget valg, se Indsamling og forberedelse af prøver ovenfor.
2. For specifikke oplysninger om forberedelse og opbevaring af prøver, se Indsamling og forberedelse af prøver ovenfor.
3. Udfør PCR-amplifikation på oprenset DNA-prøve ved hjælp af en *Olerup SSP®*-typebestemmelsesplade eller opbevar DNA-prøven, indtil den er klar til typebestemmelse.

**B. Forberedelse af reagens/udstyr**

1. Programmér en termocycler til at køre *Olerup SSP®* PCR-programmet, se Instrumentkrav – PCR-cyklusparametre ovenfor.
2. Har *Taq*-polymerase til rådighed (5 enheder/ $\mu$ l), opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$ .
3. Forbered elektroforesegel, se afsnit C - **forberedelse af elektroforesegel** nedenfor.

**C. Forberedelse af elektroforesegel**

For *Olerup SSP®* Gel System 96 (Produkt nr. 103.101-01)

## 1. Opsætning

- Støbekammeret nivelleres til 1 gel (produkt nr. 103.101-31) eller støbekammeret til 3 geler (produkt nr. 103.101-33) ved hjælp af nivelleringsboblen og de tre højdejusterbare ben.
- Anbring gelpladen/gelpladerne i støbekammeret.

## 2. 2 % (m/v) Agarose Gel Præparat

Brug en højkvalitets agarose af elektroforese kvalitet, der er i stand til at opløse 50-2.000 baseparfragmenter af DNA.

- Til 5 ml  $10 \times$  TBE-buffer (Tris Borate EDTA) tilsættes 150 ml destilleret vand og 2 gr agarose i en 500 ml glasflaske.
- Opløs agarose ved kogning i en mikrobølgeovn, indtil der dannes en homogen opløsning på 100 ml.
- Lad opløsningen af opløst gel køle af til  $60^{\circ}\text{C}$ , f.eks. i et varmeskab.
- Farv gelen inden støbning med ethidiumbromid (10 mg/ml), 5  $\mu$ l pr. 100 ml gelopløsning. For maksimal nem håndtering skal du bruge vores ethidiumbromiddråbeflasker (produkt nr. 103.301-10). **Bemærk: Ethidiumbromid er kræftfremkaldende. Håndter med passende personlige værnemidler.**
- Hæld 100 ml gelopløsning i gelpladen i støbekammeret. Anbring 6 gelkamme (produkt nr. 103.101-21) i gelpladens slidser.
- Lad gelen sætte sig i 15 minutter.
- Hæld 750 ml  $0,5 \times$  TBE-buffer i geltanken. Nedsænk gelpladen i gelboksen, og fjern forsigtigt de 6 gelkamme ved at løfte dem op.

Følg producentens brugsanvisning, når du bruger alternative elektroforesesystemer. For at kunne bruges sammen med *Olerup SSP®* HLA Typing Kits skal disse systemer være i stand til at opløse PCR-produkter fra 50 til 1.100 basepar i størrelse.

**D. Trinvis procedure**

1. Fjern fra den eller de angivne opbevaringstemperatur(er): det eller de relevante antal DNA-prøver, primerpladen/-erne, mængden af Master Mix og Taq-polymerase (5 enheder/ $\mu$ l), der er nødvendige for den eller de udvalgte DNA-prøver/primerpladen(r). Optøning ved stuetemperatur (20°C til 25°C)

Det samme Master Mix bruges i alle Olerup SSP®sæt.

2. Bland DNA-prøven(-erne) kort ved omrøring.
3. Placer primerpladen/-pladerne i et PCR-pladestativ.
4. **Sæt med lav og høj opløsning**
  - Omrør mastermixet, før du tager aliquoter.
  - Ved hjælp af en manuel enkeltkanalpipette tilsættes Master Mix, Taq-polymerase (5 enheder/ $\mu$ l) og dH<sub>2</sub>O ved stuetemperatur i et 0,5 ml eller et 1,5 ml rør. (Se tabel 1 nedenfor for passende mængde.)
  - Tildæk røret og omrør i 5 sekunder. Puls-spin røret i en mikrocentrifuge for at få al væske ned fra rørets sider.
  - Brug en manuel enkeltkanalpipette for at tilsætte 8  $\mu$ l af Master Mix - dH<sub>2</sub>O-blandingen og 2  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O i den negative kontrolbrønd, dvs. brønden med de negative kontrolprimerpar, i primerpladen.
  - Ved hjælp af en manuel enkeltkanalpipette tilsættes DNA-prøven ved stuetemperatur til den resterende Master Mix - dH<sub>2</sub>O-blanding. (Se tabel 1 nedenfor for passende mængde.)
  - Tildæk røret og omrør i 5 sekunder. Puls-spin røret i en mikrocentrifuge for at få al væske ned fra rørets sider.
  - Ved anvendelse af en elektronisk enkeltkanals dispenser aliquot 10  $\mu$ l af prøvereaktionsblandingen i hver brønd, undtagen den negative kontrolbrønde, i primerpladen.

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

**Tabel 1: Komponentmængder der er nødvendige pr. test for forskellige antal brønde, når Master Mix anvendes uden Taq-polymerase .**

Antal brønde pr. test	Mængde af Master Mix (µl)	Mængde af DNA-prøve (µl)	Mængde af dH <sub>2</sub> O (µl)	Mængde af Taq polymerase (µl)	Antal brønde pr. test	Mængde af Master Mix (µl)	Mængde af DNA-prøve (µl)	Mængde af dH <sub>2</sub> O (µl)	Mængde af Taq polymerase (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

De anført ovenfor anbefalede mængder, omfatter mængder der skal kompensere for pipettevariationer og for tab af væske på rørets indvendige vægge.

### 5. Kombinationssæt A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ og DQA-DQB-DR Enhanced og HLA-C højopløsning til hyppige allelersæt

- Omrør Master Mix.
- Ved hjælp af en manuel enkeltkanalpipette tilsættes 8,3 µl Taq-polymerase (5 enheder/µl) og 511,7 µl dH<sub>2</sub>O ved stuetemperatur i det medfølgende 1,5 ml rør indeholdende 312 µl Master Mix.
- Tildæk røret og omrør i 5 sekunder. Puls-spin røret i en mikrocentrifuge for at få al væske ned fra rørets sider.
- Brug en manuel enkeltkanalpipette for at tilsætte 8 µl af Master Mix - Taqpolymerase - dH<sub>2</sub>O-blandingen og 2 µl dH<sub>2</sub>O i den negative kontrolbrønd nr. 96, dvs. brønden med de negative kontrolprimerpar.
- Ved hjælp af en manuel enkeltkanalpipette tilsættes 206 µl DNA-prøve ved stuetemperatur til den resterende Master Mix - Taq-polymerase dH<sub>2</sub>O-blanding.
- Tildæk røret og omrør i 5 sekunder. Puls-spin røret i en mikrocentrifuge for at få al væske ned fra rørets sider.

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

- Ved anvendelse af en elektronisk enkeltkanals dispenser aliquot 10 µl af prøvereaktionsblandingen i hver brønd, undtagen den negative kontrolbrønd nr. 96, i primerpladen.

**Vigtigt:**

Sørg for at påføre prøven over primerne (tørret i bunden af hver brønd i primerpladen) for at undgå krydskontaminering mellem brønde. Rør ved brøndens indvendige væg med pipettespidsen, så prøven kan glide ned til bunden af brønden. Kontroller, at alle prøver er faldet til bunden af hver brønd. Hvis ikke, skal du banke forsigtigt på pladen på bordpladen, så alle prøver sætter sig i bunden af brønden, før du begynder PCR.

5. Dæk primerpladen(erne) med de medfølgende, klæbende PCR-tætninger. Kontroller, at alle reaktionsbrønde er helt dækket for at forhindre fordampningstab under PCR-amplifikation. *Olerup SSP®*-kompressionspuden (produkt nr. 103.505-06) kan påføres oven på de klæbende PCR-tætninger for at forhindre fordampning under termisk cycling.
6. Anbring primerpladen/-erne i termocycleren med en passende rørpladeadapter. Tillad ikke mere end 5 minutters forsinkelse mellem PCR-opsætning og termisk cycling.
7. Indtast dit *Olerup SSP®*-programnummer. Angiv en reaktionsmængde på 10 µl.
8. Start PCR-programmet. Programmet tager cirka 1 time og 20 minutter.
9. Fjern primerpladen/-pladerne fra termocycleren. Undersøg PCR-pladen for at sikre, at der er omtrent den samme mængde væske i hver PCR-brønd. Kør elektroforese på prøverne, se afsnittet E - Gelelektroforese nedenfor. Fortolk typebestemmelsesresultaterne med de **partispecifikke fortolknings- og specificitetstabeller eller regneark**, se Forventede værdier nedenfor.

**E. Gelelektroforese**

1. Efter afslutning af PCR-reaktionen, orienteres primerpladen og gelboksen. Brøndens rækkefølge er fra venstre mod højre og top til bund.
2. Fjern forsigtigt strimmellågene uden at sprøjte med PCR-produkterne.
3. Indfør PCR-produkterne i rækkefølge til 2 % agarosegelen. (Det er ikke nødvendigt at tilsætte gelindføringsbuffer.) Det anbefales at bruge en 8-kanals pipette til gelindføring.
4. Læg en DNA-størrelsesmarkør (100 baseparstige, DNA-størrelsesmarkør produkt nr. 103.202-100 eller DNA-størrelsesmarkør for korte gelkørsler 103.203-100) i en brønd pr. Række.
5. Dæk gelboksen med gelboksens låg.
6. Kør elektroforese af gelen i 0,5 × TBE-buffer uden recirkulation af bufferen i 15-20 minutter ved 8-10 V/cm.
7. Overfør gelpladen med gelen til en UV-transilluminator.
8. Fotografér gelen med eller uden gelpladen.
9. Marker fotografiet i henhold til laboratoriets regler.

### KVALITETSKONTROL

ASHI HLA-testretningslinjer indikerer, at en negativ (forurenings) kontrolbrønd skal inkluderes i hver PCR-opsætning. (Revised Standards for Accredited Laboratories, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Final Revised Standards Approved by CMS: 16. februar, 2021). En negativ kontrolbrønd er inkluderet i alle sæt, med undtagelse af HLA-B \* 27 - enhedsdosis og HLA-B \* 27 enkeltbrøndssæt.

Se Gelfortolkning på side 14.

### RESULTATER

Partispecifikke cellelinjevalideringsark og analysecertifikat kan tilgås online, [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### BEGRÆNSNINGER I PROCEDUREN

1. PCR-SSP-processen kræver stærkt kontrollerede testbetingelser for at sikre tilstrækkelig diskriminatorisk amplifikation. Fremgangsmåden beskrevet i brugsvejledningen skal følges nøje.
2. Den ekstraherede DNA-prøve er skabelonen for den specifikke PCR-amplifikationsproces. Det oprensede DNA skal have et A<sub>260/280</sub>-forhold mellem 1,6 og 2,0 for at opnå optimal båndvisualisering ved elektroforese.
3. Alle instrumenter, f.eks. termocycler, pipetteringsanordninger, skal kalibreres i henhold til producentens anbefalinger.
4. Partispecifikke oplysninger findes i Produktindlægget: Partispecifikke oplysninger og i det partispecifikke regneark.
5. På grundlag af udførte test blev følgende stoffer evalueret med tre (3) ekstraktionsmetoder i de anførte koncentrationer og viste sig ikke at påvirke testens ydeevne.

Ekstraktionsmetode	Forstyrrende stof	Forstyrrende koncentration*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubin	200 mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Triglycerid	30 g/L
	Protein	110 g/L
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubin	200 mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Triglycerid	18,2 g/L
	Protein	77 - 96 g/L
Gentra PureGene metode	Bilirubin	200 mg/L
	Hemoglobin	200 g/L
	Triglycerid	18,2 g/L
	Protein	119 -146 g/L

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

6. PCR-pladerne er fysisk kompatible med de fleste termocyclere på markedet. Se tabellen over termocyclerplasts kompatibilitet nedenfor.

*Bemærk: Tabellen er kun beregnet som en vejledning. For validerede cykler henvises til afsnittet Instrumentkrav – Instrument.*

<b>Kompatibilitetstabel</b>	
<b>Producent</b>	<b>Termocycler</b>
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-brønde
	ProFlex 2x96-brønde
	Veriti 0,2ml 96-brønde blok
Agilent (Stratagene)	GeneAmp 2700, 2720, 9600
	SureCycler 8800
	RoboCycler
Biometra	Gradient Cycler
	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
	TGradient/TAdvanced
Bio-Rad	TRobot
	TProfessional
	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
	C1000, S1000
Eppendorf	PTC-2(xx)
	PTC-100 med 96-brønde blok
	Mastercycler Gradient
MWG	Mastercycler EP Gradient, Pro, Nexus
	Primus 96
Thermo Scientific	TheQ Lifecycler
	Arktik
	Flexigene, TC-412, TC-4000
Techne	Genius, Touchgene, TC-512, TC-5000
	TC-PLUS, Prime, PrimeG, Prime Elite
	PCR Express, Px2, PxE
Thermo Scientific Hybaid	MultiBlock System & MBS
	Omnigene, Omn-E
Gene Technologies	GS1, GS4, GSX
Takara	TP 3000

7. Ydeevnen for dette sæt ved hjælp af Master Mix uden Taq-polymerase er kun blevet valideret med Roche Taq DNA-polymerasen, GMP-kvalitet (katalog nr. 03 734 927 001 eller #03 734 935 001). Assay-ydeevne ved hjælp af andre enzymer er ukendt og skal etableres og valideres af brugeren.










**FORVENTEDE VÆRDIER****A. Dataanalyse**

Undersøg gelfotoet omhyggeligt og bestem de positive baner.

1. Et hurtigere migrerende, kortere bånd kan ses i en gelbane, hvis specifikke HLA-allel(er) blev forstærket. Dette indikerer et positivt testresultat.
  - a. Registrer tilstedeværelsen og fraværet af specifikke PCR-produkter.
  - b. Det er nyttigt at overvåge de relative længder af de specifikke PCR-produkter som angivet i de partispecifikke produktindsatser, når gelresultaterne fortolkes. Flere baner har to eller flere mulige længder af specifikke PCR-produkter. Disse brønde indeholder flere primerpar, der genererer PCR-produkter i forskellige størrelser afhængigt af HLA-allel(er) i prøve-DNA'et.
  - c. Match mønsteret af gelbaner med specifikke PCR-produkter med oplysningerne i de partispecifikke fortolknings- og specificitetstabeller for at opnå HLA-genotypebestemmelse af prøve-DNA'et.
2. Et internt positivt kontrolbånd, langsomt-migrerende og længere, bør være synligt i alle gelbaner, undtagen i den negative kontrolgelbane, som en kontrol af vellykket amplifikation. Det interne positive kontrolbånd kan være svagt eller fraværende i positive gelbaner.
  - a. Registrer tilstedeværelsen og de relative længder af de interne positive kontrolbånd. Kontrolbåndene i forskellig størrelse hjælper med den korrekte orientering af typebestemmelsen såvel som i sæt-identifikation.
  - b. Fravær af internt positivt kontrolbånd uden specifikt PCR-produkt indikerer mislykket PCR-reaktion.
    - i. Hvis HLA-alleler kan bestemmes i nærvær af mislykkede PCR-reaktioner, og den eller de mislykkede PCR-reaktioner ikke ændrer alleltildelingen, behøver testen ikke gentages.
    - ii. Hvis den eller de mislykkede PCR-reaktioner imidlertid kan ændre HLA-alleltildelingen, skal typebestemmelsen gentages.
3. Tilstedeværelsen af et specifikt PCR-produkt eller et internt positivt kontrolbånd i negative kontrolbaner indikerer kontaminering med PCR-produkt(er) og annullerer alle testresultater. Primereoligomerer fra 40 til 60 basepar i størrelse kan observeres i den eller de negative kontrolbaner. Dette repræsenterer ikke kontaminering.



## B. Gel fortolkning

	Positiv reaktion	Negativ reaktion	Mislykket PCR- reaktion
Brønd			
Internt positivt kontrolbånd			
Specifikt bånd			
Primerbånd			

1. En DNA-størrelsesmarkør (100 baseparstige, DNA-størrelsesmarkør produkt nr. 103.202-100 eller DNA-størrelsesmarkør for korte gelkørsler 103.203-100) skal køres i en brønd pr. række af gelen eller i henhold til lokale retningslinjer for laboratorieakkreditering.
2. Bånd, der er længere end det interne positive kontrolbånd, kan opnås, og der bør ses bort fra disse ved fortolkningen af typebestemmelsesresultaterne.
3. Ubrugte primere vil danne et diffust bånd kortere bånd 50 basepar.
4. Primer oligomer-artefakter kan observeres. Disse er længere end primerbåndet, men kortere end de specifikke bånd.

## SPECIFIKKE YDEEVNEEGENSKABER

### Kvalitetskontrol af sætparti

Hver primeropløsning testes mod et panel på 48 DNA-prøver fra velkarakteriserede cellelinjer i IHWC, se de(t) partispecifikke cellelinjevalideringsark i produktindlæggets, partispecific Information.

### Metodesammenligning

Der blev udført en undersøgelse for at sammenligne Olerup SSP® HLA Typing Kits med og uden Taq-polymerase leveret i PCR Master Mix. Formålet med undersøgelsen var at påvise, at manuel tilsætning ikke påvirker analyseresultaterne, og at forskellige Taq-polymerasepartier giver de samme resultater. Undersøgelsen omfattede HLA-A, -B (klasse I) og -DRB (klasse II) lavopløsnings-typebestemmelse af 15 DNA-prøver med kendt HLA-genotype opnået fra International Histocompatibility Workshop Collection. Prøverne blev udarbejdet og kodet af personale, som var forskelligt fra dem, der udførte testen; testpersonalet blev blindet for prøvernes HLA-



**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

typer. Hver prøve blev testet parallelt med Olerup SSP® HLA-A-B-DR Combi Tray med PCR Master Mix uden Taq-polymerase ("Test") og Olerup SSP® HLA-A-B-DR Combi Tray med PCR Master Mix inklusive Taq-polymerase ("Kontrol") i overensstemmelse med hvert assays produktindlægs-vejledninger. Alle test blev udført på CareDx AB Laboratory i Stockholm, Sverige, ved hjælp af et sætparti og to Taq-polymerasepartier. Roche Taq DNA-polymerasen, GMP Grade, blev anvendt i undersøgelsen. Test på hver prøve bestod af typebestemmelse i lav opløsning med Olerup SSP® HLA-A-B-DR Combi Tray udført med: 1) PCR Master Mix inklusive Taq-polymerase (FDA-cleared assay) (kontrolassay), 2) PCR Master Mix plus Roche Taq DNA-polymerase, GMP-klasse produkt, 5 enheder/µl; Parti #1 (testparti nr. 1) og 3) PCR Master Mix plus Roche Taq DNA-polymerase, GMP-klasse produkt, 5 enheder/µl; Parti nr. 2 (Testparti nr. 2). Efter PCR blev detektion udført ved anvendelse af gelelektroforese. Resultaterne er opsummeret nedenfor.

Sammenligning	Aftale			
	Klasse I resultater af typebestemmelse (# aftaler/samlet)		Klasse II resultater af typebestemmelse (# aftaler/samlet)	% Aftale (95 % konfidensinterval <sup>a</sup> )
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Testparti nr. 1 / Kontrolparti	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 % – 100,0 %)
Testparti nr. 1 / Konsensus <sup>b</sup>	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 % – 100,0 %)
Testparti nr. 2 / Kontrolparti	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 % – 100,0 %)
Testparti nr. 2 / Konsensus	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 % – 100,0 %)
Testparti nr. 1 / Testparti nr. 2	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7 % – 100,0 %)

<sup>a</sup> Scoremetode

<sup>b</sup>Konsensusresultat fra International Histocompatibility Workshop Collection

## **BIBLIOGRAFI**

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. Aktuelle HLA-alleler kan findes på <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>

## FEJLFINDING

Problem	Årsag	Handling
<b>Ingen amplifikation (hverken amplifikation af de interne kontrolfragmenter eller specifikke amplifikationer).</b>	For lille mængde DNA.	Mål DNA-koncentrationen og se, om den tilsatte mængde er korrekt. RNA-kontaminering kan forårsage en spektrofotometrisk overvurdering af DNA-koncentrationen. Gentag DNA-ekstraktionen omhyggeligt med frisklavede opløsninger. Vi anbefaler automatiseret DNA-ekstraktion med QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA'et indeholder PCR-hæmmere, f.eks. proteiner, ethanol (fra udfældningstrin), resterende matrixer fra fastfasede DNA-oprensingsprodukter.	Mål DNA-kvaliteten. Vi anbefaler et $A_{260}/A_{280}$ -forhold på 1,6 – 2,0 ved UV-spektrofotometri. Følg nøjagtigt leverandørens DNA-ekstraktionsprotokol. Genudtræk DNA'et. Vi anbefaler automatiseret DNA-ekstraktion med QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA'et er blevet ekstraheret fra hepariniseret blod.	Brug ikke-hepariniseret blod, eller brug DNA-ekstraktionsprotokoller for hepariniseret blod.
	DNA'et opløses i en buffer indeholdende EDTA.	Gentag DNA-ekstraktionen og opløs DNA'et i dH <sub>2</sub> O.

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt:</b> <b>Ingen amplifikation</b> <b>(hverken amplifikation af de interne kontrolfragmenter eller specifikke amplifikationer).</b>	Utilsigtet introduktion af blegemiddel i test.	Gennemgå områder, hvor blegemiddel muligvis kan indføres.
	Sæt opbevares ikke ved tilstrækkelig temperatur.	Opbevar sættene ved -20 °C.
	Termiske cykler fungerer ikke korrekt.	Kalibrer den termiske cykler, og kontroller PCR-programmet. En termisk cykler, der anvendes til rutinemæssig PCR-SSP-typebestemmelse, skal kalibreres hver 6-12 måneder.
<b>Tilfældig svigt af amplifikation. (dropouts).</b>	Utilstrækkelig kontakt mellem termisk cyclervarmeblok og SSP-typebestemmelsesplade.	Brug korrekt plade/holder til 0,2 ml tyndvæggede reaktionsbrønde, se manualen til termiske cykler.
	PCR-tætninger/PCR-rørhætter, der ikke er tæt lukket, vil føre til fordampning og efterfølgende svigt i amplifikationen.	Sørg for, at PCR-tætningerne/alle hætter er tæt lukket. <i>Olerup SSP®</i> -kompressionspuden (produkt nr. 103.505-06) kan påføres oven på deklæbende PCR-tætninger for at forhindre fordampning under termisk cycling.
	Fejl ved gelindføring.	Kontroller, at der er blevet indført i det korrekte antal brønde, og at hver brønd indeholder omtrent den samme mængde PCR-blanding.
	Brug af pipetter, der ikke er kalibreret.	Kalibrér alle pipetter rutinemæssigt i henhold til leverandørens anbefalinger.
	Pipetteringsfejl.	Udfør pipettering mere omhyggeligt.

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt:</b> <b>Tilfældig svigt af amplifikation. (dropouts).</b>	Master mix-blanding og prøve DNA er ikke blandet korrekt før brug.	Bland kort vha. hvirvelstrøm før brug. Vi anbefaler, at blande efter hver række.
	Ujævn volumen af DNA-mastermixblandingen er tilsat brøndene.	Udfør pipettering mere omhyggeligt.
<b>Svage interne kontrolfragmenter.</b>	Urent DNA.	Mål DNA-kvaliteten. A260/A280-forholdet skal være 1,6 – 2,0 ved UV-spektrofotometri. RNA-kontaminering kan forårsage en spektrofotometrisk overvurdering af DNA-koncentrationen. Nedbrudt DNA giver anledning til udtværing i gelbaner. Gentag DNA-ekstraktionen omhyggeligt med frisklavede opløsninger. Vi anbefaler automatiseret DNA-ekstraktion med QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	For lille mængde DNA.	Mål DNA-koncentrationen og juster til 30 ng/µl eller til 15 ng/µl for DNA ekstraheret af QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. RNA-kontaminering kan forårsage en spektrofotometrisk overvurdering af DNA-koncentrationen. Nedbrudt DNA giver anledning til udtværing i gelbaner. Gentag DNA-ekstraktionen

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt:</b> <b>Svage interne kontrolfragmenter.</b>		omhyggeligt med frisklavede opløsninger. Vi anbefaler automatiseret DNA-ekstraktion med QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	For høj hybridiseringstemperatur, den termiske cyclus er ikke kalibreret.	Kalibrer den termiske cyclus, og kontroller PCR-programmet. En termisk cyclus, der anvendes til rutinemæssig PCR-SSP-typebestemmelse, skal kalibreres hver 6-12 måneder.
	PCR Master Mix har været opbevaret ved +4 °C i mere end 2 uger.	Opbevar PCR Master Mix korrekt.
<b>Ikke-specifik amplifikation (stiger eller udtværing).</b>	Brug af overskydende DNA-prøve.	Mål DNA-koncentrationen og juster til 30 ng/µl eller til 15 ng/µl for DNA ekstraheret af QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Nogle primeropløsninger har en større tendens til at give anledning til uspecifik amplifikation, se fodnoter i hver partispecifik specificitetstabel.
	Urent DNA.	Der bør ses bort fra alle fragmenter, der er større end det interne kontrolfragment, ved fortolkningen af de opnåede resultater. Kontroller DNA-kvaliteten. Gentag DNA-ekstraktionen. Vi anbefaler automatiseret DNA-ekstraktion med QIAGEN

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt:</b> <b>Ikke-specifik</b> <b>amplifikation (stiger eller</b> <b>udtværinger).</b>		EZ1 DSP DNA Blood System. Nogle primeropløsninger har en større tendens til at give anledning til uspecifik amplifikation, se fodnoter i hver partispecifik specificitetstabel.
<b>Svagere og svagere</b> <b>amplifikationssignaler</b> <b>over tid.</b>	Ethidumbromid agarose gelfarvningsopløsningen er gammel.	Forbered frisk ethidumbromidopløsning for at opnå bedre farvning af agarosegelen og bedre signal. Primerskyerne er lette at opdage, hvis farvningen af agarosegelen er normal.
	En af UV-lamperne er gået i stykker.	Kontroller UV-lysstyret. Primerskyerne er lette at opdage, hvis UV-lyset er normalt.
	Der er brugt for lidt DNA-prøve.	Mål DNA-koncentrationen og juster til 30 ng/µl eller til 15 ng/µl for DNA ekstraheret af QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	For høj hybridiseringstemperatur, den termiske cyclus er ikke kalibreret.	Kalibrer den termiske cyclus, og kontroller PCR-programmet. En termisk cyclus, der anvendes til rutinemæssig PCR-SSP-typebestemmelse, skal kalibreres hver 6-12 måneder.
<b>Mærkelige</b> <b>amplifikationsmønstre.</b>	Forkert partispecifik fortolkningstabel / der er brugt et regneark.	Kontroller partinummeret på det anvendte produkt og Fortolkningstabel / anvendt regneark.
	Forkert rækkefølge i gelindføring.	Kontroller justering af blandinger og gelbaner.

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt: Mærkelige amplifikationsmønstre.</b>	Amplifikationsmønsteret indeholder en falsk positiv.	Se nedenfor.
	Amplifikationsmønsteret indeholder en falsk negativ.	Se nedenfor.
<b>Falsk positive amplifikationer.</b>	DNA-forurening.	Brug handsker, pipettespidser der indeholder barrierer (filterpropper) og separate rum til præ-PCR håndtering og efter-PCR-håndtering. Sørg for en nøjagtig håndtering af alle prøver, i alle trin. Kontroller for forurening ved hjælp af <i>Olerup SSP® Wipe Test sæt</i> .
	Urent DNA.	Mål DNA-kvaliteten. Følg nøjagtigt leverandørens DNA-ekstraktionsprotokol. Prøv andre DNA-ekstraktionssystemer. Genudtræk DNA'et. Vi anbefaler automatiseret DNA-ekstraktion med QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Brug af overskydende DNA-prøve.	Mål DNA-koncentrationen og juster til 30 ng/µl eller til 15 ng/µl for DNA ekstraheret af QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	For lav hybridiseringsstemperatur.	Kalibrer den termiske cyclus, og kontroller PCR-programmet. En termisk cyclus, der anvendes til rutinemæssig PCR-SSP-typebestemmelse, skal kalibreres hver 6. - 12. måned.



**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt: Falsk positive amplifikationer.</b>	Omfattende forsinkelse mellem PCR-opsætning og start af termisk cyclus.	Der bør ikke tillades mere end 5 minutters forsinkelse før termisk cyclus.
	Forsinkelse mellem placering af typebestemmelsesplader i termisk cyclus og start af cyclus.	Brug forvarmet termisk cyclus.
	Anvendelse af overskydende ethidiumbromid.	Brug den anbefalede mængde af ethidiumbromid.
	Forkert fortolkning af en artefakt som et specifikt bånd.	Tjek den partispecifikke fortolkningstabel / regneark og specificitetstabel for korrekt båndstørrelse og fodnoter.
	Amplifikationsmønsteret indeholder en falsk positiv.	Tjek, om alle specifikke amplifikationer er korrekte i størrelse, eller om en artefakt (carry-over, primer-dimer) er blevet fejlfortolket som en amplifikation.
	Forkert rækkefølge i gelindføring.	Kontroller justering af blandinger og gelbaner.
<b>Falsk negative amplifikationer.</b>	Den termiske cyclus er ikke kalibreret korrekt.	Kalibrer den termiske cyclus, og kontroller PCR-programmet. En termisk cyclus, der anvendes til rutinemæssig PCR-SSP-typebestemmelse, skal kalibreres hver 6. - 12. måned. Hvis det ikke korrigeres ved recalibrering, skal testen gen-typebestemmes med en referenceprøve af samme specificitet. Hvis den bekræftes negativt,

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt:</b> <b>Falsk negative</b> <b>amplifikationer.</b>		skal du kontakte kundesupport.
	Forkert rækkefølge i gelindføring.	Kontroller justering af blandinger og gelbaner.
<b>Overordnede</b> <b>gelproblemer (fuzzy geler</b> <b>og/eller udtværede</b> <b>baner).</b>	Nedbrudt DNA-prøve.	Fremstår som en udtværing i gelbanerne. Isolér DNA fra en frisk prøve.
	Kraftige striber i tilfældige brønde.	Ujævne DNA-suspensioner. Sørg for, at prøve-DNA er opløst, før du tager din alikvot. Vortex fortyndet DNA-prøve.
	PCR-produkt flød ud af brønden.	Juster forsigtigt pipettespidserne med gelbrønde, og dispenser langsomt.
	Elektroforesebufferen kan være for varm.	Forbered ny TBE-buffer. Kør ved en lavere spænding.
	Der blev anvendt en forkert procentdel agarosegel.	Sørg for, at der anvendes den anbefalede 2 % agarosegel.
	Agarose ikke helt opløst.	Kog kort igen for at smelte agarosen.
	Forkert TBE-koncentration.	Brug den anbefalede 0,5 x TBE-koncentration.
	Geler for nystøbt.	Geler er ikke klar til brug før 15 minutter efter støbning.
	Geler for gamle.	Støb ikke geler for lang tid i forvejen.
	Den anvendte gelkam har for tykke åbninger.	Brug tynde kamme (4 x 1 mm).
	Gelpladen er ikke UV-gennemsigtig.	Fjern gelen fra gelpladen inden visning.
	Gelbillede for lyst.	Overdreven brug af ethidiumbromid. Kontroller kameraindstillingerne.

<b>Problem</b>	<b>Årsag</b>	<b>Handling</b>
<b>Fortsæt:</b> <b>Overordnede gelproblemer (fuzzy geler og/eller udtværede baner).</b>	Gelbillede for mørkt.	Brug den anbefalede mængde af ethidiumbromid. Kontroller kameraindstillingerne.
<b>Generelle problemer med falsk negativ amplifikation eller kørsel-til-kørsel afhængige problemer af en sådan art</b>	Reaktionshastighedsindstilling for høj.	Olerup SSP-sæt valideres ved hjælp af GeneAmp 9700 cykler indstillet til 9600-tilstand og ProFlex med en rampehastighed på 3 °C/s. Højere reaktionshastigheder end det, der svarer til det, kan have en effekt på typebestemmelsesresultaterne.

### **VAREMÆRKER, DER ANVENDES I DETTE DOKUMENT/PRODUKT**

Olerup SSP® er et registreret varemærke tilhørende CareDx AB.  
Qiagen™ er et varemærke tilhørende QIAGEN.

**MEDDELELSE TIL KØBER:** Olerup SSP-sæt® uden Taq-polymerase – dette produkt er optimeret til brug sammen med Roche Taq-polymerasen, GMP-kvalitet (katalog nr. 03 734 927 001 eller #03 734 935 001) i polymerasekædereaktionsprocessen ("PCR"), som kan være omfattet af patenter fra Roche Molecular Systems, Inc. og F. Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche"). Laboratoriet er ansvarligt for at kontakte Roche Molecular Systems, Inc. for at afgøre, om der er behov for en licens i henhold til disse patenter.

### **GARANTI**

CareDx AB garanterer over for den oprindelige køber, at deres produkter er uden defekter i materialer og udførelse under normal brug og anvendelse. CareDx AB's seneste forpligtelse i henhold til denne garanti er gratis at udskifte ethvert produkt, der ikke opfylder de ydelsesstandarder, som er angivet på produktspecifikationsarket. Denne garanti gælder kun for produkter, der er håndteret og opbevaret i overensstemmelse med CareDx AB's anbefalinger, og den gælder ikke for produkter, der har været udsat for ændring, forkert anvendelse eller misbrug. Alle krav i henhold til denne garanti skal rettes skriftligt til CareDx AB og skal ledsages af en kopi af købers faktura. Denne garanti træder i stedet for alle andre garantier, udtrykt eller underforstået, herunder garantier for salgbarhed og egnethed til et bestemt formål. CareDx AB hæfter under ingen omstændigheder for hændelige uheld eller følgeskader.

**Brugsanvisning**  
**Olerup SSP® HLA-typebestemmelsessæt uden Taq-polymerase**

Dette produkt må ikke omformuleres, pakkes om eller videresælges i nogen form uden skriftligt samtykke fra *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sverige. Håndter alle prøver, som om de er i stand til at overføre sygdom. Alt arbejde skal udføres iført handsker og passende beskyttelse.

**GARANTI**

*CareDx AB* garanterer, at primerne i *Olerup SSP®*-typebestemmelsespladerne har de specificiteter, der er angivet i regnearket, partispecifikke specificitets- og fortolkningstabeller for produktindsatsen.

**ADRESSER:**

**Producent:**

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden

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

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

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

**Hjemmeside:** www.caredx.com

**Distribueret af:**

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden

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

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

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

**Hjemmeside:** www.caredx.com

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

**Tlf.:** +1 877 653 7871

**Fax:** 610-344-7989

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

**Hjemmeside:** www.caredx.com

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

**Tlf:** +61 8 9336 4212

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

**Hjemmeside:** [www.caredx.com](http://www.caredx.com)

**Autoriseret repræsentant:**

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Kontakt CareDx AB for at få mere at vide om CareDx-distributører verden over.

1587-LBK v02 er oversat fra engelsk master 0193-LBL v07 Olerup SSP® HLA typebestemmelsessæt uden Taq polymerase.

Ændringer i revision 0193-LBL v07 sammenlignet med 0193-LBL v06:

1. Tilføjelse af schweizisk autoriseret repræsentant.
2. Tilføjelse af GelRed til sektion B. Materialer, der kræves, men ikke leveres.