



Käyttöohjeet

Olerup SSP[®] ilman Taq-polymeraasia

© 2023 CareDx, Inc. Kaikki palvelumerkit tai tavaramerkit ovat CareDx, Inc:n tai sen tytäryhtiöiden omistamia tai lisensoimia. Kaikki oikeudet pidätetään.

1588-LBL v02 Olerup SSP[®] HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

In Vitro -diagnoosiin

Tarkistettu vuoden 2023 syyskuussa



Sivu 1/26

***In vitro* -diagnostiikkaan**

KÄYTTÖTARKOITUS

Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ovat kvalitatiivisia *in vitro* -diagnostisia sarjoja HLA-luokan I ja HLA-luokan II alleelien DNA-tyypitykseen. Tuotteet on tarkoitettu koulutettujen ammattilaisten tekemiin HLA-fenotyyppimäärittäisiin lääketieteellisissä olosuhteissa. Testattavana lähdemateriaalina on DNA.

YHTEENVETO JA KUVAUS

HLA:n (Human leukocyte antigens) eli ihmisten leukosyyttiantigeenien määrittämiseen käytettiin aiemmin lymfositotoksisuuden testausta. Nykyään määrittämiseen käytetään kuitenkin polymeerasiketjureaktioon (PCR) perustuvia DNA-määrittystekniikoita aiemman testauksen virhetiheysten ja alleelitasen erottelukykypuutteiden vuoksi. Useimmissa PCR-pohjaisissa tekniikoissa PCR-prosessia hyödynnetään vain tarvittavan kohde-DNA:n monistamisessa ja monistuksen jälkeisessä alleelien erottamisessa. Sekvenssispesifisiin alukkeisiin perustuvassa PCR-SSP-tekniikassa erottelu tapahtuu kuitenkin jo PCR-prosessin aikana (SSP – Sequence-Specific Primer). Tämän ansiosta monistuksen jälkeen tarvitaan vain lyhyempi ja yksinkertaisempi geielektroforeesin havaitsemisvaihe. SSP-testin tulos on joko positiivinen tai negatiivinen, joten monimutkaisia tulkintaprosesseja ei tarvita. Lisäksi PCR-SSP:n tyypitystarkkuus on muita PCR-tekniikoita parempi, koska jokainen alukepari määrittää kaksi sekvenssimotiivia, jotka sijaitsevat samalla puolella, *cis*, eli samassa kromosomissa. Lisäksi synteettiset SSP-reagenssit ovat entistä stabiilimpia, ja siten erien välinen vaihtelu on vähäisempää.

TOIMINTAPERIAATE

PCR-SSP-tekniikka perustuu ajatukseen siitä, että kokonaan tai lähes kokonaan yhteensopivat oligonukleotidialukkeet, joiden 3'-päissä ei ole yhteensopimattomuuksia, toimivat PCR-reaktiossa tehokkaammin kuin yhteensopimattomat alukkeet termostabiilissa DNA-polymeerasissa ilman tarkistuslukuominaisuuksia. Alukeparit on suunniteltu yhteensopiviksi yksittäisten alleelien tai alleeliryhmien kanssa tyypitystarkkuusvaatimuksen mukaan. Testi tehdään tarkasti kontrolloiduissa PCR-olosuhteissa, ja kokonaan tai lähes kokonaan yhteensopivat alukeparit mahdollistavat monistuksen, eli tulos on positiivinen. Yhteensopimattomat alukeparit puolestaan estävät monistuksen, jolloin tulos on negatiivinen.

PCR-prosessin jälkeen monistetut DNA-fragmentit erotellaan koon mukaan esimerkiksi agarosigeelelektroforeesilla, visualisoidaan värjäämällä etidiumbromidilla ja ultraviolettivalotuksella, dokumentoidaan valokuvaamalla ja tulkitaan. PCR-SSP-tulosten tulkinta perustuu tietyn tai tiettyjen PCR-tuotteiden esiintymiseen tai puuttumiseen. Määrätyn tai määrättyjen PCR-tuotteiden suhteelliset koot voivat auttaa tulosten tulkinnassa. HLA-tyypityksen PCR-SSP-tekniikan esitteli alun perin O. Olerup vuosina 1991 ja 1992^{1,2}.

Koska monet tekijät, kuten pipetointivirheet, liian alhainen DNA-pitoisuus, huono DNA-laatu, PCR-estäjien esiintyminen ja lämpöblokin epätarkkuus, voivat vaikuttaa haitallisesti PCR-prosessiin, jokaiseen PCR-reaktioon sisältyy sisäinen positiivinen

Käyttöohjeet

Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

kontrollialukepari². Sisäinen positiivinen kontrollialukepari vastaa ihmisen kasvuhormonigeenin säilyneitä alueita, joita on ihmisten kaikissa DNA-näytteissä. HLA-alleelin tai -alleelien spesifisen PCR-tuotteen esiintyminen voi johtaa heikkoon tai puuttuvaan sisäiseen positiiviseen kontrolliviivaan. Tiettyjen HLA-alukeparien tuottamat amplikonit ovat lyhyempiä kuin sisäisen positiivisen kontrollin alukeparin amplikonit mutta suurempia kuin yhdistymättömät alukkeet (ks. Odotetut arvot).

REAGENSIT

A. Tunnistus

Olerup SSP® -tyypityssarjat sisältävät kuivattuja, esioptimoituja sekvenssispesifisiä alukkeita HLA-alleelien ja ihmisen kasvuhormonigeenin PCR-monistukseen, PCR Master Mix -reagenssiseoksen ("Master Mix") ilman Taq-polymeraasia ja liimautuvia PCR-tiivisteitä.

Alukeliuokset ovat määräosaeriä, jotka on kuivattu ohutseinäisten PCR-alustojen leikatuissa 0,2 ml:n syvennyksissä. Alustan kaikki syvennykset sisältävät kuivatun alukeliuoksen, joka koostuu spesifisestä alukeseoksesta eli alleeli- ja ryhmäspesifisistä HLA-alukkeista sekä sisäisestä positiivisesta, ei-alleelisia sekvenssejä vastaavasta kontrollialukeparista. Niihin voi lisätä suoraan DNA-näytteen, Master Mixin ja H₂O:ta.

Alukkeet on suunniteltu optimaaliseen PCR-monistukseen Master Mixin ja suositetun DNA-sykliohjelman kanssa (ks. Lämpöblokin ohjelmointi).

Eräkohtaiset spesifisyys- ja tulkintataulukot tai laskentataulukko spesifisille HLA-alleeleille, jotka on monistettu kullakin alukeseoksella, ovat ladattavissa sivustolta www.caredx.com.

B. Varoitukset ja varotoimet

1. *In vitro* -diagnostiikkaan.
2. Tuotetta ei voi käyttää ainoana perusteena kliinisen päätöksen tekemiselle.
3. Varoitus biologisesta vaarasta: Kaikkia verivalmisteita on käsiteltävä mahdollisesti infektiivina materiaaleina. Mikään tai mitkään tunnetut testimenetelmät eivät voi taata, että ihmisverestä johdetut tuotteet eivät välitä tartunnanaiheuttajia.
4. Varoitus biologisesta vaarasta: DNA värjätään agaroosigeelielektroforeesissa etidiumbromidilla, joka on karsinogeeni. Käsitelyssä on käytettävä henkilökohtaisia suojarusteita.
5. Varoitus: Käytä UV:lta suojaavaa silmiensuojainta äläkä suuntaa katsettasi suoraan UV-valonlähteeseen, kun tarkastelet tai valokuvaat geelejä.
6. PCR:ää **edeltävissä** toimenpiteissä **ei saa** käyttää pipettejä ja muita välineitä, joita on käytetty PCR:n **jälkeisissä** toimenpiteissä.
7. Katso tarkat tiedot käyttöturvallisuustiedotteesta (www.caredx.com).

C. Käyttöohjeet

Ks. Käyttöohje.

D. Säilytysohjeet

1588-LBL v02 Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

In Vitro -diagnostiikkaan

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Säilytä sarjan osat pimeässä ja pakkauksen etiketeissä ilmoitetuissa lämpötiloissa.

Käytä tuote ennen pakkauksen tarroihin painettua viimeistä käyttöpäivää.

E: Käytön edellyttämä puhdistus tai käsittely

Ks. Käyttöohje.

F. Epävakauden indikaatiot

1. Älä käytä alukealustoja, joissa on halkeamia syvennyksissä tai vaurioita syvennysten yläreunassa, sillä ne voivat johtaa haihtumiseen PCR-monistuksen aikana. Älä käytä PCR-kansinauhoja, joissa on halkeamia, koska ne voivat johtaa haihtumiseen PCR-monistuksen aikana.
2. Syvennyksissä olevien pellettien tulee olla punaisia. Keltainen väri pelleteissä voi viitata hajoamiseen.
3. Master Mixin tulee olla väriltään punaisesta purppuranpunaiseen. Keltainen tai oranssi väri voi viitata hajoamiseen.

TARVITTAVAT INSTRUMENTIT**A. Instrumentti**

Käytettävän lämpöblokin minimivaatimukset:

- lämpökansi, jonka lämpötila on 104 °C, öljytöntä käyttöä varten
- näyteblokki (alumiini, hopea tai kullattu hopea) käytettäväksi joko 96-paikkaisen PCR-levyn tai 0,2 ml:n ohutseinäisten reaktioputkien kanssa
- Olerup SSP -sarjat on validoitu seuraaville laitteille.

Suositetut rampinopeudet:

- GeneAmp 9700: GeneAmp 9700, asetus 9600. Tämä vastaa **näytteenottoramppinopeutta** 1,6 °C/s ylöspäin ja 0,8 °C/s alaspäin.
- ProFlex 1x96-paikkainen blokki: ProFlex PCR -laite, lohkoramppinopeus 3,0 °C/s (kukin vaihe 3,0 °C/s). **Blokkiramppinopeus** 3,0 °C/s vastaa näytteenottoramppinopeutta 1,52 °C/s ylöspäin ja 1,36 °C/s alaspäin.
- ProFlex 2x96-paikkainen blokki: ProFlex PCR -laite, lohkoramppinopeus 3,0 °C/s (kukin vaihe 3,0 °C/s). **Blokkiramppinopeus** 3,0 °C/s vastaa näytteenottoramppinopeutta 1,9 °C/s ylöspäin ja 1,6 °C/s alaspäin.

Huomaa: Edellä mainittua suuremmat rampinopeudet voivat vaikuttaa tyypitystuloksiin. Lisäksi validoimattomien laitteiden vaikutus tyypitykseen voi vaihdella asetusten mukaan.

- lämpötila-alue 4,0–99,9 °C
- lämpötilatarkkuus ±0,25 °C välillä 35–99,9 °C
- näyteblokin lämpötilan tasaisuus ≤ 0,75 °C alueella 55–95 °C
- lämpötilan kalibrointi voidaan jäljittää vertailustandardiin (NIST)

Ohjelmoi lämpöblokki alla olevan osan B PCR-sykliparametreilla.

Katso lämpöblokin tarkat tiedot valmistajan käyttöohjeista. Lämpöblokit on kalibroitava ASHI:n (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) tai EFI:n (European Federation of Immunogenetics) akkreditointisääntöjen mukaan.

Ohjelmoi lämpöblokki ennen siirtymistä alla olevaan käyttöohjeeseen.

B. PCR-sykliparametrit

1.	1 sykli	94 °C	2 min	denaturaatio
2.	10 sykliä	94 °C	10 s	denaturaatio
		65 °C	60 s	liittäminen ja pidennys
3.	20 sykliä	94 °C	10 s	denaturaatio
		61 °C	50 s	liittäminen
		72 °C	30 s	pidennys
4.	Loppu – pito RT			jos alle 8 tuntia
		4 °C		jos yli 8 tuntia

Kokonaisreaktiotilavuus kussakin paikassa: 10 µl.

Kaikille Olerup SSP® -sarjoille käytetään samoja PCR-sykliparametreja.

NÄYTTEIDEN KERÄYS JA VALMISTELU

SSP-tyypityksiin tarvitaan uutettua ja erittäin puhdasta DNA:ta. PCR-SSP HLA -tyypityksessä käytettävät DNA-näytteet on suspendoitava uudelleen dH₂O:ssa. A_{260/280}-suhteen tulisi olla UV-spektrofotometrialla 1,6–2,0, jotta viiva visualisoituu elektroforeesin aikana optimaalisesti.

Suosittelemme uuttamaan DNA:n automaattisesti QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmällä. Lähtömateriaalin tulee olla ACD-verta.

DNA:n voi myös uuttaa millä tahansa muulla menetelmällä, joka tuottaa puhdasta DNA:ta. Muita menetelmiä käytettäessä DNA-pitoisuuden arvoksi on asetettava 30 ng/µl. **Heparinisoitu veri ei sovellu näihin menetelmiin.**

DNA:n suosituspitoisuudet eri menetelmissä:
EZ1-uutettu DNA, 15 ng/µl.
Muilla menetelmillä uutettu DNA, 30 ng/µl.

Yli 50 ng/µl:n pitoisuudet lisäävät epäspesifisten monistusten ja heikkojen ylimääräisten viivojen riskiä, erityisesti HLA-luokan I suurissa SSP-tyypitystarkkuuksissa. Laimenna uutettu DNA tarvittaessa dH₂O:lla.

DNA-näytteitä ei saa suspendoida uudelleen liuoksiin, jotka sisältävät esimerkiksi EDTA:n kaltaisia kelatoivia aineita yli 0,5 mM:n pitoisuutena.

DNA-näytteet voi käyttää heti uuttamisen jälkeen, mutta ne säilyvät +4 °C:ssa enintään kaksi viikkoa ilman tuloksia heikentäviä vaikutuksia. DNA-näytteitä voidaan säilyttää –20 °C:ssa tai kylmemmässä yhdeksän kuukauden ajan. Pitkään varastoitujen uutettujen DNA-näytteiden puhtauden ja pitoisuuden hyväksyttävyyys on testattava ennen HLA-tyypitystä.

DNA-näytteiden kuljetuslämpötilan on oltava korkeintaan +4 °C, jotta näytteet säilyvät eheinä.

MENETTELY**A. Toimitetut materiaalit**

1. Olerup SSP® -alukealustat.
2. Master Mix ilman Taq-polymeraasia (sopiva määrä sarjan alustoille). Kaikille Olerup SSP® -sarjoille käytetään samaa Master Mixiä.
3. Liimautuvat PCR-tiivisteet (sopiva lukumäärä sarjan alustoille).

B. Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly toimitukseen

1. DNA-eristyssarja/-laite
2. UV-spektrofotometri
3. Pipetointilaitteet. Suosittelemme elektronista yksikanavaista annostelijaa, joka sopii 10 µl:n määröiden annosteluun DNA-Master Mix-dH₂O -seoksen lisäämiseksi alustan käsittelypaikkoihin.
4. Kertakäyttöisiä pipettikärkiä
5. Polypropeeniputkia
6. Vortex-sekoitin
7. Mikrosentrifugi
8. PCR-alustateline
9. Lämpöblokki lämpökannella 96-paikkaiselle PCR-alustalle, lämpöblokin lämpögradientti koko lämmityslohkossa ≤ 0,75 °C, sekä alusta/pidike 0,2 ml:n ohutseinäisille reaktiosyvennyksille
10. Mikroaaltouuni tai keittölevy agarosiliuosten kuumentamiseen
11. Elektroforeesilaatuinen agarosoli, esimerkiksi FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE-puskuri, 1 x TBE-puskuri on 89 mM Tris-boraattia, 2 mM dinatrium-EDTA:ta, pH 8,0
13. Etidiumbromidipisarapullo tuotenro 103.301-10 tai GelRedipisarapullo tuotenro 103.302-05
14. Geelipipetointilaitte. Suosittelemme geelin lisäämiseen kahdeksankanavaista pipettiä, säädettävä tilavuus 5–25 µl
15. DNA-kokomarkkeri, joka kattaa vaihteluvälin 50–1 000 bp, esimerkiksi sadan emäsparin tikas, DNA-kokomarkkeri tuotenro 103.202-100 tai DNA-kokomarkkeri lyhyille geelijaioille 103.203-100
16. Elektroforeesilaitte/virtalähde
17. UV-läpivalaisulaite
18. Valokuvaus- tai kuvadokumentointijärjestelmä
19. Roche Taq DNA -polymeraasi, GMP-luokka. [Luettelo # 03 734 927 001 (1000 U) tai # 03 734 935 001 (5000 U)].

C. Menettelyvaiheet

Ks. Käyttöohje.

KÄYTTÖOHJE**A. Näytteen valmistelu**

1. Puhdista genominen DNA leukosyyttinäytteestä valitulla menetelmällä, ks. edellä oleva kohta Näytteiden keräys ja valmistelu.
2. Lisätietoja näytteiden valmistelusta ja säilytyksestä on edellä kohdassa Näytteiden keräys ja valmistelu.
3. Suorita puhdistetun DNA-näytteen PCR-monistus *Olerup SSP®* -tyypitysalustalla tai siirrä DNA-näyte säilytykseen, kunnes tyypitys on ajankohtainen.

B. Reagenssin/laitteiden valmistelu

1. Ohjelmoi lämpöblokkiin ajo *Olerup SSP®* PCR -ohjelmalla, ks. Tarvittavat instrumentit – PCR-sykliparametrit edeltä.
2. *Taq*-polymeraasia on saatavilla (5 yksikköä/μl), säilytä –20 °C:ssa.
3. Valmista elektroforeesigeeli, katso kohta C – **Geelielektroforeesin valmistelu** alla.

C. Geelielektroforeesin valmistelu

Tuotteelle *Olerup SSP®* Gel System 96 (tuotenro 103.101-01)

1. Kokoonpano
 - Vaaita valukammio yhdelle geelille (tuotenro 103.101-31) tai valukammio kolmelle geelille (tuotenro 103.101-33) vaaituskuplan ja kolmen säädettävän jalan avulla.
 - Sijoita geelialusta(t) valukammioon.
2. 2 %:n (w/v) agarosigeelin valmistus

Käytä laadukasta elektroforeesiagarosia, joka pystyy erottamaan 50–2 000 DNA-emäsparifragmenttia.

 - Lisää 500 ml:n lasipullossa 5 ml:aan 10 x TBE (Tris Borate EDTA) -puskuria 150 ml tislattua vettä ja 2 g agarosia.
 - Liuota agarosia keittämällä sitä mikroaaltouunissa, kunnes homogeenistä liuosta on muodostunut 100 ml.
 - Anna liuoksen geeliliuoksen jäähtyä 60 °C:seen esimerkiksi lämpökaapissa.
 - Värjää geeli ennen valamista etidumbromidilla (10 mg/ml), 5 μl / 100 ml geeliliuosta. Helpoimmin tämä onnistuu etidumbromidipisarapulloilla (tuotenro 103.301-10). **Huomaa: Etidumbromidi on karsinogeeni. Käsittelyssä on käytettävä henkilökohtaisia suojarusteita.**
 - Kaada 100 ml geeliliuosta valukammion geelialustalle. Aseta kuusi geelikampaa (tuotenro 103.101-21) geelialustan loviin.
 - Anna geelin jähmettyä 15 minuuttia.
 - Kaada 750 ml 0,5 x TBE-puskuria geelisäiliöön. Upota geelialusta geelialtaaseen ja nosta kuusi geelikampaa varovasti ylös.

Noudata valmistajan ohjeita, mikäli käytät jotakin muuta elektroforeesijärjestelmää. Näiden järjestelmien käyttäminen *Olerup SSP®* HLA -tyypityssarjojen kanssa edellyttää, että järjestelmät pystyvät käsittelemään kooltaan 50–1 100 emäsparin PCR-tuotteita.

D. Menettelyvaiheet

1. Ota vaaditusta/vaadituista säilytyslämpötiloista: sopiva määrä DNA-näytteitä, alukealusta(t) ja valittuun/valittuihin DNA-näytteisiin / alukealustoille tarvittava määrä Master Mixiä ja Taq-polymeraasia (5 yksikköä/µl). Sulata huoneenlämmössä (20–25 °C).

Kaikille Olerup SSP® -sarjoille käytetään samaa Master Mixiä.

2. Sekoita DNA-näytteet nopeasti Vortexilla.
3. Aseta alukealustat PCR-alustatelineeseen.
4. **Sarjat pienille ja suurille tyypitystarkkuuksille**
 - Sekoita Master Mix Vortexilla ennen määräosien ottamista.
 - Lisää manuaalisella yksikanavaisella pipetillä huoneenlämmössä Master Mix, Taq-polymeraasi (5 yksikköä/µl) ja dH₂O 0,5 ml:n tai 1,5 ml:n putkeen. (Ks. oikeat määrät taulukosta 1 jäljempänä.)
 - Sulje putki ja sekoita Vortexilla 5 sekuntia. Käytä mikrosentrifugin pulssipyöritystä, jotta neste siirtyy kokonaan alas putken sivuilta.
 - Lisää manuaalisella yksikanavaisella pipetillä 8 µl Master Mix / dH₂O -seosta ja 2 µl dH₂O:ta alukealustan negatiiviseen kontrollisyvennykseen eli syvennykseen, jossa negatiiviset kontrollialukeparit ovat.
 - Lisää DNA-näyte huoneenlämmössä jäljellä olevaan Master Mix / dH₂O -seokseen manuaalisella yksikanavaisella pipetillä. (Ks. oikeat määrät taulukosta 1 jäljempänä.)
 - Sulje putki ja sekoita Vortexilla 5 sekuntia. Käytä mikrosentrifugin pulssipyöritystä, jotta neste siirtyy kokonaan alas putken sivuilta.
 - Lisää elektronisella yksikanavaisella annostelijalla 10 µl:n määräosa näytteen reaktioseosta jokaiseen syvennykseen, lukuun ottamatta alukealustan negatiivista kontrollisyvennystä.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Taulukko 1: Testiin tarvittavien komponenttien määrä eri syvennysmäärillä käytettäessä Master Mixiä ilman Taq-polymeraasia.

Syvennyksiä /testi	Master Mix -määrä (µl)	DNA-näytteen määrä (µl)	dH ₂ O-määrä (µl)	Taq-polymeraasin määrä (µl)	Syvennyksiä /testi	Master Mix -määrä (µl)	DNA-näytteen määrä (µl)	dH ₂ O-määrä (µl)	Taq-polymeraasin määrä (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

Edellä annetuissa suositusmäärissä on kompensoitu erilaisten pipettien välinen vaihtelu ja nestehäviö putkien sisäseinillä.

5. Yhdistelmäsarjat A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ ja DQA-DQB-DR Enhanced sekä suuritarkkuuksinen HLA-C usein toistuvilla alleelisarjoilla

- Sekoita Master Mix Vortexilla.
- Lisää manuaalisella yksikanavaisella pipetillä 8,3 µl Taq-polymeraasia (5 yksikköä/µl) ja 511,7 µl dH₂O:ta huoneenlämmössä mukana toimitettuun 1,5 ml:n putkeen, joka sisältää 312 µl Master Mixiä.
- Sulje putki ja sekoita Vortexilla 5 sekuntia. Käytä mikrosentrifugin pulssipyöritystä, jotta neste siirtyy kokonaan alas putken sivuilta.
- Lisää manuaalisella yksikanavaisella pipetillä 8 µl Master Mix / Taq-polymeraasi / dH₂O -seosta ja 2 µl dH₂O negatiiviseen kontrollisyvennykseen nro 96 eli samaan syvennykseen negatiivisten kontrollialukeparien kanssa.
- Lisää 206 µl DNA-näytettä jäljellä olevaan Master Mix / Taq-polymeraasi / dH₂O -seokseen manuaalisella yksikanavaisella pipetillä huoneenlämmössä.
- Sulje putki ja sekoita Vortexilla 5 sekuntia. Käytä mikrosentrifugin pulssipyöritystä, jotta neste siirtyy kokonaan alas putken sivuilta.

Käyttöohjeet Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

- Lisää elektronisella yksikanavaisella annostelijalla 10 µl:n määräosa näytteen reaktioseosta jokaiseen syvennykseen, lukuun ottamatta alukealustan negatiivista kontrollisyvennystä nro 96.

Tärkeää:

Näyte on levitettävä kunkin syvennyksen pohjassa kuivatettujen alukkeiden yläpuolelle, jottei syvennysten välillä tapahdu ristikontaminaatiota. Aseta pipetin kärki kiinni syvennyksen sisäseinään niin, että näyte liukuu suoraan syvennyksen pohjalle. Varmista, että kaikki näytteet ovat valuneet syvennysten pohjalle. Mikäli ne eivät ole valuneet sinne, napauta alustaa varovasti työtason kanteen ennen PCR:n käynnistämistä, kunnes kaikki näytteet ovat asettuneet syvennysten pohjalle.

5. Peitä alukealusta(t) mukana toimitetuilla PCR-tiivisteillä. Tarkista, että kaikki reaktiosyvennykset peittyvät kokonaan, jotta PCR-vahvistuksen aikana ei tapahdu haihtumishäviötä. *Olerup SSP® Compression Pad* (tuotenro 103.505-06) -kompresiosuojaa voi käyttää liimautuvien PCR-tiivisteiden päällä estämään haihtumista lämpösyklin aikana.
6. Aseta alukealusta(t) lämpöblokkiin sopivan putkialustasovittimen avulla. PCR-kokoonpanon ja lämpösyklin välinen aika ei saa olla yli 5 minuuttia.
7. Anna *Olerup SSP®* -ohjelman numero. Määritä reaktiitolavuudeksi 10 µl.
8. Käynnistä PCR-ohjelma. Ohjelma kestää noin tunnin ja 20 minuuttia.
9. Ota alukealusta(t) pois lämpöblokista. Tarkista PCR-alustasta, että jokaisessa PCR-syvennyksessä on suurin piirtein saman verran nestettä. Tee näytteille elektroforeesi, ks. kohta E – Geelielektroforeesi alla. Tulkitse tyyppitystulokset **eräkohtaisilla tulkinta- ja spesifisyystaulukoilla tai laskentataulukolla**, ks. alla oleva kohta Odotetut arvot.

E. Geelielektroforeesi

1. Kun PCR-reaktio on valmis, suuntaa alukealusta ja geeliallas. Syvennysten järjestys kulkee vasemmalta oikealle ja ylhäältä alas.
2. Ota kannet pois varovasti PCR-tuotteita roiskuttamatta.
3. Lisää PCR-tuotteet kaksiprosenttiseen agarosigeeliin järjestyksessä. (Geelinlatauspuskuria ei tarvita.) Suosittelemme käyttämään geelin lisäämiseen kahdeksankanavaista pipettiä.
4. Lataa DNA-kokomarkkeri (sadan emäsparin tikas, DNA-kokomarkkeri tuotenro 103.202-100 tai DNA-kokomarkkeri lyhyille geelijaioille 103.203-100) yhteen syvennykseen jokaisella rivillä.
5. Peitä geeliallas geelialtaan kannella.
6. Tee geelille elektroforeesi 0,5 x TBE-puskurilla, ilman puskurin kierrätystä, 15–20 minuuttia nopeudella 8–10 V/cm.
7. Siirrä geelialusta geelin kanssa UV-läpivalaisulaitteeseen.
8. Kuvaa geeli joko geelialustalla tai ilman sitä.
9. Merkitse valokuva laboratorion sääntöjen mukaisesti.

LAADUNVALVONTA

ASHI HLA -testausohjeissa edellytetään, että jokaisessa PCR-kokoonpanossa on negatiivinen (kontaminaatio-) kontrollisyvennys. (Tarkistetut standardit akkreditoiduille

laboratorioille, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, CMS:n hyväksyntä: 16.2.2021.) Negatiivinen kontrollisyvennys sisältyy kaikkiin sarjoihin, lukuun ottamatta HLA-B*27-yksikköannosta ja yhden syvennyksen HLA-B*27-sarjoja.

Ks. Geelin tulkinta, sivu 14.

TULOKSET

Eräkohtaisia solulinjan validointilomakkeita ja analyysitodistuksia voi ladata sivustolta www.caredx.com.

MENETTELYN RAJOITUKSET

1. PCR-SSP-prosessi edellyttää erittäin hallittuja testiolosuhteita riittävästi erottelevan monistuksen varmistamiseksi. Käyttöohjeissa kuvattua toimintatapaa on noudatettava huolellisesti.
2. Uutettu DNA-näyte toimii mallina määrättyssä PCR-monistusprosessissa. Puhdistetun DNA:n $A_{260/280}$ -suhteen tulee olla 1,6–2,0, jotta viiva visualisoituu elektroforeesilla optimaalisesti.
3. Kaikki instrumentit, kuten lämpöblokki ja pipetointilaitteet, on kalibroitava valmistajan suositusten mukaisesti.
4. Eräkohtaiset tiedot tuoteselosteessa: eräkohtaiset tiedot ja eräkohtainen laskentataulukko.
5. Suoritetun testauksen perusteella arvioitiin seuraavat kolme ainetta kolmella (3) uuttomenetelmällä alla olevilla pitoisuuksilla, eikä niiden havaittu vaikuttavan testin suorituskykyyn.

Uuttomenetelmä	Häiritsevä aine	Häiritsevä pitoisuus*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubiini	200 mg/l
	Hemoglobiini	200 g/l
	Triglyseridi	30 g/l
	Proteiini	110 g/l
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubiini	200 mg/l
	Hemoglobiini	200 g/l
	Triglyseridi	18,2 g/l
	Proteiini	77–96 g/l
Gentra PureGene -menetelmä	Bilirubiini	200 mg/l
	Hemoglobiini	200 g/l
	Triglyseridi	18,2 g/l
	Proteiini	119–146 g/l

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

6. PCR-levyt ovat fyysisesti yhteensopivia useimpien markkinoilla olevien lämpöblokkien kanssa. Ks. lämpöblokin muoviosien yhteensopivuustaulukko alta.

Huomaa: Taulukko on vain ohjeellinen. Validoidut PCR-laitteet, ks. osio Tarvittavat instrumentit – Instrumentit.

Yhteensopivuustaulukko	
Valmistaja	Lämpöblokki
Sovelletut biojärjestelmät	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-paikkainen
	ProFlex 2x96-paikkainen
	Veriti 0,2 ml 96-paikkainen blokki
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
Eppendorf	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 ja 96-paikkainen blokki
	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. Tämän Master Mixiä ilman Taq-polymeraasia käyttävän sarjan suorituskyky on validoitu vain Roche Taq DNA -polymeraasilla, GMP-laadulla (luettelo # 03 734 927 001 tai #03 734 935 001). Muita entsyymejä käyttävän määrityksen suorituskykyä ei tunneta, ja käyttäjän on määritettävä ja validoitava se.

ODOTETUT ARVOT**A. Tietojen analysointi**

Tutki geelikuvaa huolellisesti ja määritä positiiviset linjat.

1. Geelilinjalla nähdään nopeammin liikkuva, lyhyempi viiva, jos tiettyä/tiettyjä HLA-alleeleja monistettiin. Tämä osoittaa positiivisen testituloksen.
 - a. Kirjaa tiettyjen PCR-tuotteiden esiintyminen ja puuttuminen.
 - b. Geelituloksia tulkittaessa kannattaa seurata tiettyjen PCR-tuotteiden suhteellisia pituuksia eräkohtaisten tuoteselosteiden mukaisesti. Useilla linjoilla on vähintään kaksi mahdollista tiettyjen PCR-tuotteiden pituutta. Nämä syvennykset sisältävät useita alukepareja, jotka tuottavat erikokoisia PCR-tuotteita näytteen DNA:n HLA-alleelin/-alleelien mukaan.
 - c. Vertaa geelilinjojen kuviota tiettyjen PCR-tuotteiden kanssa eräkohtaisten tulkinta- ja spesifisyystaulukoiden tietoihin saadaksesi näytteen DNA:n HLA-tyypityksen.
2. Sisäisen, hitaammin siirtyvän ja pidemmän positiivisen kontrolliviivan pitäisi näkyä kaikissa muissa geelilinjoissa, paitsi negatiivisen kontrollin geelilinjassa, jolloin monistus on onnistunut. Sisäinen positiivinen kontrolliviiva voi olla heikko tai puuttua positiivisista geelilinjoista.
 - a. Kirjaa sisäisten positiivisten kontrolliviivojen esiintyminen ja suhteelliset pituudet. Erikokoiset ohjausviivat auttavat tyyppitystä oikeassa suunnassa sekä sarjan tunnistamisessa.
 - b. Sisäisen positiivisen kontrolliviivan puuttuminen ilman tiettyä PCR-tuotetta kertoo PCR-reaktion epäonnistumisesta.
 - i. Jos HLA-alleelit voidaan määrittää epäonnistuneen PCR-reaktion/-reaktioiden läsnä ollessa ja epäonnistunut PCR-reaktio/-reaktiot eivät muuta alleelin määrittystä, testiä ei tarvitse toistaa.
 - ii. Jos epäonnistuneet PCR-reaktiot voivat kuitenkin muuttaa HLA-alleelimäärittystä, tyyppitys on toistettava.
3. Tietyn PCR-tuotteen tai sisäisen positiivisen kontrolliviivan esiintyminen negatiivisella kontrollilinjalla tai -linjoilla osoittaa PCR-tuotteiden kontaminaation ja mitätöi kaikki testitulokset. Kooltaan 40–60 emäsparin alukeoligomeereja voidaan havaita negatiivisilla kontrollilinjoilla. Se ei tarkoita kontaminaatiota.

B. Geelin tulkinta

	Positiivinen reaktio	Negatiivinen reaktio	Epäonnistunut PCR-reaktio
Syvennys			
Sisäinen positiivisen kontrollin viiva			
Spesifinen viiva			
Alukeviiva			

1. DNA-kokomarkkeri (sadan emäsparin tikas, DNA-kokomarkkeri tuotenro 103.202-100 tai DNA-kokomarkkeri lyhyille geelijaioille tuotenro 103.203-100) tulee ajaa yhdessä syvennyksessä jokaisella geelirivillä tai laboratorion paikallisten akkreditointiohjeiden mukaisesti.
2. Sisäistä positiivista kontrolliviivaa pidempiä viivoja voidaan saada, ja ne tulee jättää huomiotta tyytitystulosten tulkinnassa.
3. Käyttämättömät alukkeet muodostavat diffuusin viivan, lyhyempi kuin 50 emäsparin viiva.
4. Alukeoligomeeriartefakteja saattaa olla havaittavissa. Ne ovat pidempiä kuin alukeviiva mutta lyhyempiä kuin spesifiset viivat.

ERITYISET SUORITUSKYKYMINAISUUDETSarjan erän laadunvalvonta

Jokainen alukeliuos testataan paneelilla, jossa on 48 DNA-näytettä IHWC:n hyvin tunnistettavista solulinjoista, ks. eräkohtaiset solulinjan validointiarkit tuoteselosteesta: Eräkohtaiset tiedot.

Menetelmän vertailu

Toteutetussa tutkimuksessa verrattiin *Olerup SSP® HLA -tyypityssarjoja* PCR Master Mixin kanssa toimitetulla *Taq-polymeraasilla* ja ilman sitä. Tutkimuksen tarkoituksena oli osoittaa, että manuaalinen lisäys ei vaikuta määritystuloksiin ja että eri *Taq-polymeraasierät* tuottavat samat tulokset. Tutkimus sisälsi HLA-A, -B (luokka I) ja -DRB (luokka II) matalan resoluution 15 DNA-näytteen tyyppittämisen tunnetulla HLA-genotyypillä, joka on saatu kansainvälisestä histoyhteensopivuuteen liittyvästä työpajakokoelmasta. Näytteet valmisteli ja koodasi henkilöstö, johon ei kuulunut testauksen suorittajia. Testaushenkilöstö suoritti testauksen näkemättä näytteiden HLA-tyyppejä. Jokainen näyte testattiin rinnakkain *Olerup SSP® HLA-A-B-DR*

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

-yhdistelmäalustan kanssa, jossa oli PCR Master Mix ilman Taq-polymeraasia ("testi"), ja Olerup SSP® HLA-A-B-DR -yhdistelmäalustan PCR Master Mixillä, johon sisältyi Taq-polymeraasi ("kontrolli"), kunkin määrittelyn tuoteselosteen ohjeiden mukaisesti. Kaikki testit suoritettiin ruotsalaisessa, Tukholmassa sijaitsevassa CareDx AB Laboratoryssa käyttäen yhtä pakkauserää ja kahta Taq-polymeraasierää. Tutkimuksessa käytettiin Roche Taq DNA -polymeraasia, GMP-luokkaa. Kunkin näytteen testaus koostui pienen erottelutarkkuuden tyyppityksestä Olerup SSP® HLA-A-B-DR -yhdistelmäalustalla, joka suoritettiin seuraavasti: 1) PCR Master Mixillä ja Taq-polymeraasilla (FDA:n hyväksymä määrittely) (kontrollimäärittely), 2) PCR Master Mixillä ja Roche Taq DNA -polymeraasilla, GMP Grade -tuote, 5 U/μL, erä 1 (testierä #1) ja 3) PCR Master Mixillä ja Roche Taq DNA -polymeraasilla, GMP Grade -tuote, 5 U/μL, erä #2 (testierä #2). PCR:n jälkeen havaitseminen suoritettiin geielektroforeesilla. Tulokset on esitelty alla olevassa yhteenvedossa.

Vertailu	Sopimus			
	Luokan I tyyppitystulokset (yhtäpitävyys- #/yhteensä)		Luokan II tyypitystulokset (yhtäpitävyys- #/yhteensä)	Yhtäpitävyys-% (95 %:n luottamusväli ^a)
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Testierä #1 / kontrollierä	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testierä #1 / konsensus ^b	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testierä #2 / kontrollierä	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testierä #2 / Konsensus	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)
Testierä #1 / testierä #2	15/15	15/15	15/15	100 % (84,7–100,0 %)

^a Pisteytysmenetelmä

^b Konsensustulos kansainvälisestä histoyhteensopivuuteen liittyvästä työpajakokeelmasta

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.
- Nykyiset HLA-alleelit voi tarkistaa osoitteesta www.ebi.ac.uk/imgt/hla

VIANMÄÄRITYS

Ongelma	Syy	Toimenpide
Monistumista ei tapahdu (sisäisen kontrollin fragmenteissa eikä spesifisessä monistuksessa).	DNA:ta on liian vähän.	Mittaa DNA-pitoisuus ja katso, onko lisätty määrä oikea. RNA-kontaminaatio voi aiheuttaa DNA-pitoisuuden spektrofotometrisen yliarvioinnin. Toista DNA-uutto huolellisesti juuri valmistetuilla liuoksilla. Suosittelemme uuttamaan DNA:n automaattisesti QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmällä.
	DNA sisältää PCR-estäjiä, esim. proteiineja, etanolia (saostusvaiheista) ja jäännösmatriiseja kiinteän vaiheen puhdistetuista DNA-tuotteista.	Mittaa DNA:n laatu. Suosittelemme A260/A280-suhteeksi 1,6–2,0 UV-spektrofotometrialla. Noudata huolellisesti toimittajan DNA-uuttoprotokollaa. Uuta DNA uudelleen. Suosittelemme uuttamaan DNA:n automaattisesti QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmällä.
	DNA on uutettu heparinisoidusta verestä.	Käytä heparinisoimatonta verta tai käytä DNA-uuttoprotokollia heparinisoidulle verelle.
	DNA on liotettu EDTA:ta sisältävään puskuriin.	Toista DNA-uutto ja liuota DNA dH ₂ O:hon.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Ongelma	Syy	Toimenpide
Jatkuu: Monistumista ei tapahdu (sisäisen kontrollin fragmenteissa eikä spesifisessä monistuksessa).	Testiin on joutunut vahingossa valkaisuainetta.	Tarkista alueet, joille valkaisuainetta on voinut joutua.
	Sarjoja ei ole säilytetty oikeassa lämpötilassa.	Sarjojen säilytyslämpötila on -20 °C.
	Lämpöblokki ei toimi oikealla tavalla.	Kalibroi lämpöblokki ja tarkista PCR-ohjelma. Rutiininomaiseen PCR-SSP-tyypitykseen käytettävä lämpöblokki on kalibroitava 6–12 kuukauden välein.
	Lämpöblokin lämmityslohkon ja SSP-tyypitysalustan välinen kosketus on puutteellinen.	Käytä oikeaa alustaa/pidikettä 0,2 ml:n ohutseinäisille reaktiosyvennyksille, ks. lämpöblokin käyttöohje.
Monistuksen satunnainen epäonnistuminen (keskeytymiset).	Jos PCR-tiivisteet/PCR-putkenkannet eivät ole tiiviisti kiinni, prosessissa tapahtuu haihtumista, jolloin monistus epäonnistuu.	Varmista, että PCR-tiivisteet / kaikki kannet ovat tiiviisti kiinni. <i>Olerup SSP® Compression Pad</i> (tuotenro 103.505-06) -kompressiosuojaa voi käyttää liimautuvien PCR-tiivisteiden päällä estämään haihtumista lämpösyklin aikana.
	Virheet geelin lisäämisessä.	Tarkista, että oikea määrä syvennyksiä on ladattu ja että jokainen syvennys sisältää suunnilleen saman verran PCR-seosta.
	Kalibroimattomien pipettien käyttö.	Kalibroi kaikki pipetit rutiininomaisesti toimittajan suositusten mukaisesti.
	Pipetointivirheet.	Suorita pipetointi huolellisemmin.
	Master Mixiä ja näytteen DNA:ta ei ole sekoitettu kunnolla ennen käyttöä.	Sekoita nopeasti Vortexilla ennen käyttöä. Suosittelemme Vortexin käyttöä jokaisen rivin jälkeen.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Ongelma	Syy	Toimenpide
	Syvennyksiin on lisätty epätasainen määrä DNA-Master Mix -seosta.	Suorita pipetointi huolellisemmin.
Heikot sisäisen valvonnan fragmentit.	Epäpuhdas DNA.	Mittaa DNA:n laatu. A260/A280-suhteen tulisi olla 1,6 – 2,0 UV-spektrofotometrialla. RNA-kontaminaatio voi aiheuttaa DNA-pitoisuuden spektrofotometrisen yliarvioinnin. Hajonnut DNA aiheuttaa tahroja geelilinjoilla. Toista DNA-uutto huolellisesti juuri valmistetuilla liuksilla. Suosittelemme uuttamaan DNA:n automaattisesti QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmällä.
	DNA:ta on liian vähän.	Mittaa DNA-pitoisuus ja säädä se arvoon 30 ng/µl tai 15 ng/µl QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmän uuttamalle DNA:lle. RNA-kontaminaatio voi aiheuttaa DNA-pitoisuuden spektrofotometrisen yliarvioinnin. Hajonnut DNA aiheuttaa tahroja geelilinjoilla. Toista DNA-uutto huolellisesti juuri valmistetuilla liuksilla. Suosittelemme uuttamaan DNA:n automaattisesti QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmällä.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Ongelma	Syy	Toimenpide
Jatkuu: Heikot sisäisen valvonnan fragmentit.	Liian korkea liittämislämpötila, lämpöblokkia ei ole kalibroitu.	Kalibroi lämpöblokki ja tarkista PCR-ohjelma. Rutiininomaiseen PCR-SSP-tyypitykseen käytettävä lämpöblokki on kalibroitava 6–12 kuukauden välein.
	PCR Master Mixiä on säilytetty +4 °C:ssa yli 2 viikkoa.	Aseta PCR Master Mix säilytykseen oikein.
Epäspesifinen monistus (tikkaat tai tahrat).	Liian suuren DNA-näytteen käyttö.	Mittaa DNA-pitoisuus ja säädä se arvoon 30 ng/μl tai 15 ng/μl QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmän uuttamalle DNA:lle. Joillakin alukeliuksilla on suurempi taipumus aiheuttaa epäspesifistä monistumista, ks. alaviitteet kussakin eräkohtaisessa spesifisyystaulukossa.
	Epäpuhdas DNA.	Kaikki sisäisen kontrollin fragmenttia suuremmat fragmentit on jätettävä huomiotta saatuja tuloksia tulkittaessa. Tarkista DNA:n laatu. Toista DNA-uutto. Suosittelemme uuttamaan DNA:n automaattisesti QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmällä. Joillakin alukeliuksilla on suurempi taipumus aiheuttaa epäspesifistä monistumista, ks. alaviitteet kussakin eräkohtaisessa spesifisyystaulukossa.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Ongelma	Syy	Toimenpide
Monistumissignaalit heikentyvät jatkuvasti ajan kuluessa.	Etidiumbromidiagarosigee lin värjäysliuos on vanhaa.	Valmista tuore etidiumbromidiliuos, jotta agarosigeeli värjäytyy paremmin ja signaali paranee. Alukepilvet on helppo havaita, jos agarosigeelin värjäytyminen on normaalia.
	Jokin UV-lampuista on rikki.	Tarkista UV-valolaitteet. Alukepilvet on helppo havaita, jos UV-valo on normaali.
	Käytetty DNA-näyte on liian pieni.	Mittaa DNA-pitoisuus ja säädä se arvoon 30 ng/μl tai 15 ng/μl QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmän uuttamalle DNA:lle.
	Liian korkea liittämislämpötila, lämpöblokkia ei ole kalibroitu.	Kalibroi lämpöblokki ja tarkista PCR-ohjelma. Rutiininomaiseen PCR-SSP-tyypitykseen käytettävä lämpöblokki on kalibroitava 6–12 kuukauden välein.
Outoja monistusrakenteita.	Käytössä on väärä eräkohtainen tulkinta-/laskentataulukko.	Tarkista käytetyn tuotteen eränumero ja käytetty tulkinta-/laskentataulukko.
	Väärä järjestys geelin lisäämisessä.	Tarkista seosten ja geeliviivojen kohdistus.
	Monistusrakenne sisältää väärän positiivisen tuloksen.	Ks. alla.
	Monistusrakenne sisältää väärän negatiivisen tuloksen.	Ks. alla.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Ongelma	Syy	Toimenpide
Väärät positiiviset monistukset.	DNA-kontaminaatio.	Käytä käsineitä ja suojilla (suodatintulpilla) varustettuja pipetinkärkiä sekä tee PCR:ää edeltävät ja sitä seuraavat toimet eri tiloissa. Varmista kaikkien näytteiden tarkka käsittely kaikissa vaiheissa. Tee kontaminaatiotarkistus <i>Olerup SSP®</i> -pyyhkäisytestisarjalla.
	Epäpuhdas DNA.	Mittaa DNA:n laatu. Noudata huolellisesti toimittajan DNA-uutto-protokollaa. Kokeile muita DNA-uuttojärjestelmiä. Uuta DNA uudelleen. Suosittelemme uuttamaan DNA:n automaattisesti QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmällä.
	Liian suuren DNA-näytteen käyttö.	Mittaa DNA-pitoisuus ja säädä se arvoon 30 ng/μl tai 15 ng/μl QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System -järjestelmän uuttamalle DNA:lle.
	Liian matala liittämissämpötila.	Kalibroi lämpöblokki ja tarkista PCR-ohjelma. Rutiinomaiseen PCR-SSP-tyypitykseen käytettävä lämpöblokki on kalibroitava 6–12 kuukauden välein.
	Pitkä viive PCR-kokoonpanon ja lämpösyklin alkamisen välillä.	Lämpösykli tulee aloittaa viimeistään 5 minuutin kuluttua.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Ongelma	Syy	Toimenpide
	Viive tyypitysalustojen lämpöblokkiin asettamisen ja syklin alkamisen välillä.	Käytä esilämmitettyä lämpöblokkia.
Jatkuu: Väärät positiiviset monistukset.	Liiallinen etidiumbromidin käyttö.	Käytä etidiumbromidin suositusmäärää.
	Artefaktin tulkinta virheellisesti spesifiseksi viivaksi.	Tarkista eräkohtaisesta tulkinta- /laskentataulukosta ja spesifisyystaulukosta oikea viivakoko ja alaviitteet.
	Monistusrakenne sisältää väärän positiivisen tuloksen.	Tarkista, onko kaikkien spesifisten monistusten koko oikea tai onko artefakti (kulkeutuminen, alukkeiden dimeeri) tulkittu väärin monistumiseksi.
	Väärä järjestys geelin lisäämisessä.	Tarkista seosten ja geeliviivojen kohdistus.
Väärät negatiiviset monistukset.	Lämpöblokkia ei ole kalibroitu oikein.	Kalibroi lämpöblokki ja tarkista PCR-ohjelma. Rutiinomaiseen PCR-SSP-tyypitykseen käytettävä lämpöblokki on kalibroitava 6–12 kuukauden välein. Jos sitä ei korjata uudelleenkalibroimalla, testi tyypitetään uudelleen vertailunäytteellä, jolla on sama spesifisyys. Jos se vahvistetaan negatiiviseksi, ota yhteyttä asiakastukeen.
	Väärä järjestys geelin lisäämisessä.	Tarkista seosten ja geeliviivojen kohdistus.

Käyttöohjeet
Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

Ongelma	Syy	Toimenpide
Yleiset geeliongelmat (sumeat geelit ja/tai tahriintuneet linjat).	Hajonnut DNA-näyte.	Näkyvä tahrana geelilinjoilla. Eristä DNA tuoreesta näytteestä.
	Raskas juova satunnaisissa syvennyksissä.	Epätasaiset DNA-suspensiot. Varmista, että näytteen DNA on liennut, ennen kuin otat määräosanäytteen. Vortex laimensi DNA-näytteen.
	PCR-tuotetta valui syvennyksestä.	Kohdista pipetin kärjet varovasti geelisyvänteisiin ja annostele hitaasti.
	Elektroforeesipuskuri voi olla liian lämmintä.	Valmista uusi TBE-puskuri. Suorita ajo pienemmällä jännitteellä.
	Agaroosigeelin prosenttipitoisuus on ollut väärä.	Varmista, että käytössä on suosituksen mukainen kaksiprosenttinen agaroosigeeli.
	Agaroosi ei ole täysin liennut.	Keitä nopeasti uudelleen niin, että agaroosi sulaa.
	Väärä TBE-pitoisuus.	Käytä suositettua 0,5 x TBE -pitoisuutta.
	Geelit on valettu liian vähän aikaa sitten.	Geelit ovat käyttövalmiita vasta 15 minuutin kuluttua valusta.
	Geelit ovat liian vanhoja.	Älä vala geelejä liian pitkälle etukäteen.
	Käytetyssä geelikammassa on liian paksut lovet.	Käytä ohuita kampoja (4 x 1 mm).
	Geelialusta ei ole UV-läpinäkyvä.	Poista geeli geelialustalta ennen tarkastelua.
	Geelikuva on liian kirkas.	Etidiumbromidia on liikaa. Tarkista kameran asetukset.
Geelikuva on liian tumma.	Käytä etidiumbromidin suositusmäärää. Tarkista kameran asetukset.	

Ongelma	Syy	Toimenpide
Yleiset ongelmat, jotka liittyvät väriin negatiivisiin monistuksiin tai sen kaltaisiin ajojen toistamisesta riippuviin ongelmiin	Ramppinopeus on asetettu liian suureksi.	Olerup SSP -sarjat validoidaan 9600-tilaan asetetulla GeneAmp 9700 -laitteella ja ProFlexillä, jonka ramppinopeus on 3 °C/s. Tätä suurempi ramppinopeus voi vaikuttaa tyypitystuloksiin.

TÄSSÄ ASIAKIRJASSA/TUOTTEESSA KÄYTETYT TAVARAMERKIT

Olerup SSP® on CareDx AB:n rekisteröity tavaramerkki.
Qiagen™ on QIAGENin tavaramerkki.

ILMOITUS OSTAJALLE: Olerup SSP® -sarjat ilman Taq-polymeraasia – tämä tuote on optimoitu käytettäväksi Roche Taq -polymeraasin, GMP-luokka (luettelo # 03 734 927 001 tai #03 734 935 001), kanssa polymeerasiketjureaktioprosessissa (PCR), joka voi kuulua Roche Molecular Systems, Inc:n ja F. Hoffmann-La Roche Ltd:n ("Roche") patenttien piiriin. Laboratorion vastuulla on ottaa yhteyttä Roche Molecular Systems, Inc:iin sen selvittämiseksi, tarvitaanko näiden patenttien nojalla lisenssiä.

TAKUU

CareDx AB antaa tuotteidensa alkuperäiselle ostajalle takuun materiaali- ja valmistusvirheiden varalta tavallisessa käytössä ja sovelluksessa. CareDx AB:n ainoana velvollisuutena on tämän takuun mukaisesti vaihtaa maksutta tuotteet, jotka eivät täytä tuote-erittelyssä ilmoitettuja suorituskykyvaatimuksia.

Takuu koskee vain tuotteita, joita on käsitelty ja säilytetty CareDx AB:n suositusten mukaisesti. Se ei koske tuotteita, joita on muutettu, käytetty väärin tai käsitelty asiattomalla tavalla.

Kaikki tämän takuun mukaiset reklamaatiot on osoitettava CareDx AB:lle kirjallisesti, ja niihin on liitettävä kopio ostajan laskusta. Takuu korvaa kaikki muut nimenomaiset tai oletetut takuut, mukaan lukien takuut tuotteen myyntikelpoisuudesta ja sopivuudesta tiettyyn tarkoitukseen. CareDx AB ei ole missään tilanteissa vastuussa satunnaisista tai välillisistä vahingoista.

Tämän tuotteen koostumusta ei saa muuttaa eikä tuotetta saa pakata uudelleen eikä jälleenmyydä missään muodossa ilman CareDx AB:n, Franzégatan 5, SE-112 51 Tukholma, Ruotsi, kirjallista suostumusta.

Käsittele kaikkia näytteitä mahdollisina tartunnanaiheuttajina. Kaikissa tehtävissä on käytettävä käsineitä ja asianmukaisia suojuksia.

TAKUU

CareDx AB takaa, että Olerup SSP® -tyypitysalustojen alukkeet sisältävät ne spesifisyydet, jotka on ilmoitettu tuotteen laskentataulukossa sekä tuoteselosteen eräkohtaisessa spesifisyystaulukossa ja tulkintataulukossa.

1588-LBL v02 Olerup SSP® HLA -tyypityssarjat ilman Taq-polymeraasia

In Vitro -diagnostiikkaan

OSOITTEET:

Valmistaja:

CareDx AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Tukholma, Ruotsi
Puh: +46-8-508 939 00
Faksi: +46-8-717 88 18
Sähköposti: orders-se@caredx.com
Sivusto: www.caredx.com

Jakelijat:

CareDx AB, Franzégatan 5, SE-112 51 Tukholma, Ruotsi
Puh: +46-8-508 939 00
Faksi: +46-8-717 88 18
Sähköposti: orders-se@caredx.com
Sivusto: www.caredx.com

CareDx Lab Solutions Inc., 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Puh: 1-877-653-7871
Faksi: 610-344-7989
Sähköposti: orders-us@caredx.com
Sivusto: www.caredx.com

CareDx Pty Ltd., 20 Collie Street, Fremantle WA 6160, Australia.
Puh: +61 8 9336 4212
Sähköposti: orders-aus@caredx.com
Sivusto: www.caredx.com

Valtuutetulla edustajalla:

Qarad Suisse S.A., World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausanne, Sveitsi.
CHRN: CHRN-AR-20002058

Lisätietoja CareDx-jakelijoista muualla maailmassa saat ottamalla yhteyttä CareDx AB:hen.

1588-LBL v02 on käännetty englanninkielisistä alkuperäisversiosta "0193-LBL v07 Olerup SSP® HLA typing kits without Taq polymerase".

Muutokset versiossa 0193-LBL v07 verrattuna versioon 0193-LBL v06:

1. Sveitsin valtuutetun edustajan lisääminen.
2. Gelred:n lisääminen osaan B. Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly toimitukseen.