



Οδηγίες χρήσης

Olerup SSP® Χωρίς Ταq πολυμεράση

© 2023 CareDx, Inc. Όλα τα σήματα υπηρεσιών ή εμπορικά σήματα ανήκουν ή αδειοδοτούνται από την CareDX, Inc. ή τις θυγατρικές της. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® 0417-LBL v05 χωρίς Ταq πολυμεράση

Για *In Vitro* διαγνωστική χρήση

Αναθεωρήθηκε τον Σεπτέμβριο 2023



Σελίδα 1 από 31

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Τα κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® είναι ποιοτικά *in vitro* διαγνωστικά κιτ για την τυποποίηση DNA των αλληλόμορφων HLA κατηγορίας I και HLA κατηγορίας II. Τα προϊόντα χρησιμοποιούνται από εκπαιδευμένους επαγγελματίες σε ιατρικά περιβάλλοντα για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου του HLA. Το εξεταζόμενο υλικό πρόελευσης είναι DNA.

ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Ο προσδιορισμός των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (HLA) γινόταν στο παρελθόν με εξέταση λεμφοκυτταροτοξικότητας. Ωστόσο, η συγκεκριμένη εξέταση έχει αντικατασταθεί από τεχνικές τυποποίησης DNA με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) λόγω του ποσοστού σφαλμάτων της και της έλλειψης ανάλυσης σε επίπεδο αλληλόμορφων. Στις περισσότερες τεχνικές με βάση PCR, η διεργασία PCR χρησιμοποιείται μόνο ως βήμα ενίσχυσης του επιθυμητού DNA στόχου και απαιτείται ένα επιπλέον βήμα μετά την ενίσχυση για τη διάκριση μεταξύ των διαφορετικών αλληλόμορφων. Αντίθετα, στη μεθοδολογία PCR-SSP (sequense-specific primer, εκκινητής συγκεκριμένων αλληλουχιών), η διάκριση μεταξύ των διαφορετικών αλληλόμορφων λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της διεργασίας PCR. Αυτό συντομεύει και απλοποιεί το βήμα μετά την ενίσχυση σε ένα απλό βήμα ανίχνευσης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Τα αποτελέσματα της εξέτασης SSP είναι είτε θετικά είτε αρνητικά, γεγονός που καταργεί την ανάγκη για περίπλοκη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η ανάλυση τυποποίησης της τεχνικής PCR-SSP είναι υψηλότερη από άλλες τεχνικές τυποποίησης με βάση PCR, καθώς κάθε ζεύγος εκκινητών καθορίζει δύο μοτίβα αλληλουχίας που βρίσκονται σε θέση *cis*, δηλ. στο ίδιο χρωμόσωμα. Επιπλέον, λόγω της συνθετικής φύσης των αντιδραστηρίων SSP, η σταθερότητα έχει βελτιωθεί και οι αποκλίσεις από παρτίδα σε παρτίδα έχουν μειωθεί.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η μεθοδολογία PCR-SSP βασίζεται στην αρχή ότι στην αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται πιο αποτελεσματικοί πλήρως ή μερικώς συμπληρωματικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές χωρίς ασυμφωνίες του άκρου 3', παρά μη ταυτιζόμενοι εκκινητές από θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες (χωρίς ιδιότητες διορθωτικής ανάγνωσης - proofreading). Τα ζεύγη εκκινητών είναι σχεδιασμένα ώστε να υβριδίζονται μόνο σε συγκεκριμένα αλληλόμορφα ή ομάδα(-ες) αλληλόμορφων, ανάλογα με τον απαιτούμενο βαθμό ανάλυσης της τυποποίησης. Υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες PCR, τα ζεύγη εκκινητών που υβριδίζονται πλήρως ή μερικώς επιτρέπουν την πραγματοποίηση της ενίσχυσης, δηλ. θετικό αποτέλεσμα, ενώ τα μη ταυτιζόμενα ζεύγη εκκινητών δεν επιτρέπουν την πραγματοποίηση της ενίσχυσης, δηλ. αρνητικό αποτέλεσμα.

Μετά τη διεργασία PCR, τα ενισχυμένα τμήματα DNA διαχωρίζονται βάσει μεγέθους, π.χ. με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, και οπτικοποιούνται με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, καταγράφονται με φωτογράφιση και ερμηνεύονται. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων PCR-SSP βασίζεται

στην παρουσία ή απουσία συγκεκριμένου(-ων) προϊόντος(-ων) PCR. Το σχετικό μέγεθος του(των) συγκεκριμένου(-ων) προϊόντος(-ων) PCR μπορεί να είναι χρήσιμο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μεθοδολογία PCR-SSP για το HLA περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον O. Olerup το 1991 και το 1992^{1,2}.

Καθώς η διεργασία PCR μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από διάφορους παράγοντες (π.χ. λάθη στη χρήση της πιπέτας, πολύ χαμηλή συγκέντρωση DNA, κακή ποιότητα DNA, παρουσία αναστολέων PCR, ανακρίβεια θερμοκικού κυκλοποιητή), σε κάθε αντίδραση PCR περιλαμβάνεται ένα ζεύγος εκκινητών εσωτερικού θετικού ελέγχου². Το ζεύγος εκκινητών εσωτερικού θετικού ελέγχου υβριδίζεται στις διατηρηθείσες περιοχές του γονιδίου της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης, η οποία είναι παρούσα σε όλα τα δείγματα ανθρώπινου DNA. Παρουσία ενός συγκεκριμένου προϊόντος PCR ενός ή περισσότερων αλληλόμορφων HLA, το προϊόν της ζώνης εσωτερικού θετικού ελέγχου μπορεί να είναι ασθενές ή να απουσιάζει. Τα αμπλικόνια που δημιουργούνται από τα συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών HLA εμφανίζονται κοντύτερα από τα αμπλικόνια του ζεύγους εκκινητών θετικού εσωτερικού ελέγχου, αλλά μακρύτερα από τους μη συγχωνευμένους εκκινητές (βλ. Αναμενόμενες τιμές).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

A. Ταυτοποίηση

Τα κιτ τυποποίησης *Olerup SSP*® περιέχουν αφυδατωμένους, προβελτιστοποιημένους εκκινητές ειδικών αλληλουχιών για ενίσχυση PCR των αλληλόμορφων HLA και του γονιδίου της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης, κύριο μίγμα PCR χωρίς Taq πολυμεράση («Master Mix») και ταινίες σφράγισης PCR.

Τα διαλύματα εκκινητών είναι προκλασματοποιημένα και αφυδατωμένα σε βοθρία 0,2 ml κομμένων δίσκων PCR με λεπτά τοιχώματα. Κάθε βοθρίο του δίσκου περιέχει ένα διάλυμα αφυδατωμένων εκκινητών που αποτελείται από ένα συγκεκριμένο μίγμα εκκινητών, π.χ. εκκινητές με ειδικότητα για αλληλόμορφα και ομάδες HLA, καθώς και ένα ζεύγος εκκινητών θετικού εσωτερικού ελέγχου που υβριδίζεται στις μη αλληλομορφικές αλληλουχίες και είναι έτοιμα για την προσθήκη του δείγματος DNA, κύριου μίγματος και H₂O.

Οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι για βέλτιστη ενίσχυση PCR, εφόσον χρησιμοποιείται το κύριο μίγμα και το συνιστώμενο πρόγραμμα κυκλοποίησης DNA (βλ. Προγραμματισμός του θερμοκικού κυκλοποιητή).

Οι πίνακες ειδικότητας και ερμηνείας για κάθε συγκεκριμένη παρτίδα και το φύλλο εργασιών για τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα HLA που ενισχύονται από κάθε μίγμα εκκινητών παρέχονται στον ιστότοπο www.caredx.com.

B. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

1. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
2. Αυτό το προϊόν δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως αποκλειστική βάση για τη λήψη κλινικών αποφάσεων.
3. Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου: Όλα τα προϊόντα αίματος θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά. Καμία γνωστή μέθοδος εξέτασης δεν μπορεί να διασφαλίσει ότι τα προϊόντα που προέρχονται από ανθρώπινο αίμα δεν μεταδίδουν μολυσματικούς παράγοντες.
4. Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου: Το βρωμιούχο αιθίδιο που χρησιμοποιείται για τη χρώση του DNA στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι καρκινογόνο. Ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με ατομικό προστατευτικό εξοπλισμό.
5. Προσοχή: Κατά την επισκόπηση ή τη φωτογράφιση πηκτωμάτων φοράτε προστατευτικά ματιών με φίλτρο κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και μην κοιτάτε απευθείας στην πηγή UV.
6. Οι πιπέτες και ο άλλος εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για χειρισμό **μετά** την PCR **δεν** πρέπει να χρησιμοποιείται για χειρισμό **πριν** από την PCR.
7. Για αναλυτικές πληροφορίες βλ. φυλλάδιο δεδομένων ασφαλείας (www.caredx.com).

Γ. Οδηγίες χρήσης

Βλ. Οδηγίες χρήσης.

Δ. Οδηγίες φύλαξης

Φυλάσσετε τα υλικά του κιτ σε σκοτεινό χώρο και στη θερμοκρασία που αναγράφεται στις ετικέτες της συσκευασίας.

Χρησιμοποιείτε πριν από την Ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες της συσκευασίας.

Ε: Καθαρισμός ή επεξεργασία που απαιτείται για τη χρήση

Βλ. Οδηγίες χρήσης.

ΣΤ. Ενδείξεις αστάθειας

1. Μη χρησιμοποιείτε δίσκους εκκινήτων με ρωγμές στα βοθρία ή ζημιές στο άνω χείλος των βοθρίων, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει εξάτμιση κατά την ενίσχυση PCR. Μη χρησιμοποιείτε ταινίες πωμάτων PCR με ρωγμές, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει εξάτμιση κατά την ενίσχυση PCR.
2. Τα σφαιρίδια στα βοθρία θα πρέπει να έχουν κόκκινο χρώμα. Εάν τα σφαιρίδια έχουν αποχρωματιστεί και πλέον έχουν κίτρινο χρώμα, αυτό μπορεί να σημαίνει αλλοίωση.
3. Το κύριο μίγμα θα πρέπει να έχει κόκκινο έως μωβ χρώμα. Εάν έχει αποχρωματιστεί και πλέον έχει από κίτρινο έως πορτοκαλί χρώμα, αυτό μπορεί να σημαίνει αλλοίωση.

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΟΡΓΑΝΑ**A. Όργανο**

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένας θερμικός κυκλοποιητής με τις ακόλουθες ελάχιστες προδιαγραφές:

- θερμαινόμενο καπάκι με θερμοκρασία 104 °C για λειτουργία χωρίς έλαια
- μονάδα δειγμάτων (αλουμίνιο, άργυρος ή επιχρυσωμένος άργυρος) για χρήση με πλάκα PCR 96 βοθρίων ή σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml με λεπτά τοιχώματα
- Τα κιτ Olerup SSP έχουν επικυρωθεί στους ακόλουθους κυκλοποιητές. Συνιστώμενοι ρυθμοί κλιμάκωσης:
 - GeneAmp 9700: GeneAmp 9700 κυκλοποιητής που έχει ρυθμιστεί στη λειτουργία 9600. Αυτό αντιστοιχεί σε ανοδικό **ρυθμό κλιμάκωσης δείγματος** 1,6 °C/s και καθοδικό 0,8 °C/s.
 - ProFlex μπλοκ 1x96 βοθρίων: Ο ProFlex PCR κυκλοποιητής με ρυθμό κλιμάκωσης μπλοκ 3,0 °C/s (κάθε στάδιο 3,0 °C/s). **Ρυθμός κλιμάκωσης μπλοκ** 3,0 °C/s, αντιστοιχεί σε ανοδικό ρυθμό κλιμάκωσης δείγματος 1,52 °C/s και καθοδικό 1,36 °C/s.
 - ProFlex μπλοκ 2x96 βοθρίων: Ο ProFlex PCR κυκλοποιητής με ρυθμό κλιμάκωσης μπλοκ 3,0 °C/s (κάθε στάδιο 3,0 °C/s). **Ρυθμός κλιμάκωσης μπλοκ** 3,0 °C/s, αντιστοιχεί σε ανοδικό ρυθμό κλιμάκωσης δείγματος 1,9 °C/s και καθοδικό 1,6 °C/s.

Σημείωση: Ρυθμοί κλιμάκωσης υψηλότεροι από αυτούς που περιγράφονται μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα τυποποίησης. Σημειώστε επίσης ότι η επίδραση στις τυποποιήσεις ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών μη επικυρωμένων κυκλοποιητών, ανάλογα με τις ρυθμίσεις.

- εύρος θερμοκρασίας από 4,0 °C έως 99,9 °C
- ακρίβεια θερμοκρασίας $\pm 0,25$ °C στο εύρος 35-99,9 °C
- ομοιομορφία θερμοκρασίας στη μονάδα δειγμάτων $\leq 0,75$ °C στο εύρος 55-95 °C
- βαθμονόμηση θερμοκρασίας βάσει προτύπου αναφοράς (δηλ. NIST)

Προγραμματίστε το θερμικό κυκλοποιητή χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους κυκλοποίησης PCR της ενότητας B παρακάτω.

Για πληροφορίες σχετικά με συγκεκριμένο θερμικό κυκλοποιητή ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του κατασκευαστή. Οι θερμικοί κυκλοποιητές θα πρέπει να βαθμονομούνται σύμφωνα με τους κανόνες πιστοποίησης της ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) ή της EFI (European Federation of Immunogenetics).

Προγραμματίστε το θερμικό κυκλοποιητή πριν ξεκινήσετε να ακολουθείτε τις Οδηγίες χρήσης που περιγράφονται παρακάτω.

B. Παράμετροι κυκλοποίησης PCR

1.	1 κύκλος	94°C	2 λεπτά	αποδιάταξη
2.	10 κύκλοι	94°C	10 δευτ.	αποδιάταξη
		65°C	60 δευτ.	υβριδισμός και επέκταση
3.	20 κύκλοι	94°C	10 δευτ.	αποδιάταξη
		61°C	50 δευτ.	υβριδισμός
		72°C	30 δευτ.	επέκταση
4.	Τέλος - συγκράτηση	RT		Εάν λιγότερο από 8 ώρες
		4°C		Εάν περισσότερο από 8 ώρες

Συνολικός όγκος αντίδρασης σε κάθε βοθρίο, 10 μλ.

Οι ίδιες παράμετροι PCR χρησιμοποιούνται σε όλα τα κιτ *Olerup SSP*®.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την τυποποίηση SSP απαιτείται εκχυλισμένο DNA, υψηλής καθαρότητας. Τα δείγματα DNA προς χρήση για την τυποποίηση HLA μέσω PCR-SSP θα πρέπει να εναιωρούνται εκ νέου σε dH₂O. Ο λόγος A_{260/280} θα πρέπει να είναι 1,6 – 2,0 βάσει φασματοφωτομετρίας UV για βέλτιστη οπτικοποίηση ζώνης κατά την ηλεκτροφόρηση.

Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN. Ως υλικό έναρξης θα πρέπει να χρησιμοποιείται αίμα με ACD.

Εναλλακτικά, το DNA μπορεί να εκχυλιστεί με οποιαδήποτε προτιμώμενη μέθοδο που να δίνει DNA υψηλής καθαρότητας. Όταν χρησιμοποιούνται εναλλακτικές μέθοδοι, η συγκέντρωση DNA θα πρέπει να προσαρμόζεται σε 30 ng/μl. **Μην χρησιμοποιείτε ηπαρισμένο αίμα με αυτές τις μεθόδους.**

Συνιστώμενη συγκέντρωση DNA με χρήση:

DNA εκχυλισμένο με EZ1, 15 ng/μl.

DNA εκχυλισμένο με άλλες μεθόδους, 30 ng/μl.

Οι συγκεντρώσεις άνω των 50 ng/μl αυξάνουν τον κίνδυνο μη ειδικής ενίσχυσης και ασθενών επιπλέον ζωνών, ιδιαίτερα για τυποποιήσεις SSP υψηλής ανάλυσης HLA κατηγορίας I. Εάν χρειάζεται, αραιώστε το εκχυλισμένο DNA σε dH₂O.

Τα δείγματα DNA δεν θα πρέπει να εναιωρούνται εκ νέου σε διαλύματα που περιέχουν χηλικούς παράγοντες, όπως το EDTA, σε συγκέντρωση άνω του 0,5 mM.

Τα δείγματα DNA μπορούν να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την εκχύλιση ή να φυλάσσονται στους +4°C για έως και 2 εβδομάδες χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στα αποτελέσματα. Τα δείγματα DNA μπορούν να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -20°C ή χαμηλότερη για 9 μήνες. Η καθαρότητα και η συγκέντρωση των δειγμάτων εκχυλισμένου DNA που έχουν φυλαχθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα θα πρέπει να ελέγχονται πριν από την τυποποίηση HLA για να διαπιστώνεται εάν οι σχετικές τιμές είναι αποδεκτές.

Η αποστολή των δειγμάτων DNA θα πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία +4°C ή χαμηλότερη για να διατηρείται η ακεραιότητά τους κατά τη μεταφορά.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**A. Παρεχόμενα υλικά**

1. Δίσκοι εκκινήτων *Olerup SSP*®.
2. Κύριο μίγμα χωρίς Taq πολυμεράση (κατάλληλος όγκος για τους δίσκους του κιτ). Για όλα τα κιτ *Olerup SSP*® χρησιμοποιείται το ίδιο κύριο μίγμα.
3. Ταινίες σφράγισης PCR (κατάλληλος αριθμός για τους δίσκους του κιτ).

B. Απαιτούμενα αλλά μη παρεχόμενα υλικά

1. Κιτ/εξοπλισμός απομόνωσης DNA
2. Φασματοφωτόμετρο UV
3. Συσκευές πιπέτας. Συνιστούμε ηλεκτρονικό διανεμητή ενός καναλιού με δυνατότητα διανομής 10 μl κλασμάτων για προσθήκη του μίγματος DNA-κύριου μίγματος-dH₂O στα βοθρία του δίσκου.
4. Ρύγχη πιπετών μίας χρήσης
5. Σωληνάρια πολυπροπυλενίου
6. Αναμίκτης περιδίνησης
7. Μικροφυγοκεντρητής
8. Βάση δίσκων PCR
9. Θερμικός κυκλοποιητής με θερμαινόμενο καπάκι για PCR με διαμόρφωση 96 βοθρίων, μεταβολή θερμοκρασίας στη μονάδα θέρμανσης ≤ 0,75 °C και δίσκο/διάταξη συγκράτησης για βοθρία αντίδρασης 0,2 ml με λεπτά τοιχώματα
10. Φούρνος μικροκυμάτων ή θερμαντική βάση για τη θέρμανση των διαλυμάτων αγαρόζης
11. Αγαρόζη για ηλεκτροφόρηση. π.χ. Seakem LE της FMC
12. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5x TBE (το ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE είναι 89 mM Tris-βορικό, 2 mM δινατριούχο EDTA, pH 8,0)
13. Φιάλη βρωμιούχου αιθιδίου με σταγονόμετρο, Αρ. Προϊόντος 103.301-10, ή φιάλη GelRed με σταγονόμετρο, Αρ. Προϊόντος 103.302-05.
14. Συσκευή πιπέτας φόρτωσης πηκτώματος. Για τη φόρτωση πηκτώματος συνιστούμε πιπέτα 8 καναλιών με ρυθμιζόμενο όγκο 5-25 μl
15. Δείκτης μεγέθους DNA για κάλυψη εύρους 50-1.000 ζεύγη βάσεων, π.χ. κλίμακα 100 ζευγών βάσεων, Δείκτης Μεγέθους DNA Αρ. προϊόντος 103.202-100 ή Δείκτης μεγέθους DNA για σύντομη επεξεργασία πηκτωμάτων 103.203-100
16. Συσκευή ηλεκτροφόρησης/παροχή ενέργειας
17. Διαφανοσκόπιο UV
18. Φωτογραφικό ή απεικονιστικό σύστημα καταγραφής
19. Taq DNA polymerase της Roche, βαθμού GMP. [Κατάλογος # 03 734 927 001 (1000 U) ή # 03 734 935 001 (5000 U)].

Γ. Διαδικασία βήμα προς βήμα

Βλ. Οδηγίες χρήσης.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ**A. Προετοιμασία δείγματος**

1. Καθαρίστε το γονιδιωματικό DNA από το δείγμα λευκών αιμοσφαιρίων με μέθοδο της επιλογής σας, βλ. Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων παραπάνω.
2. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία και τη φύλαξη των δειγμάτων, βλ. Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων παραπάνω.
3. Πραγματοποιήστε ενίσχυση PCR στο δείγμα κεκαθαρμένου DNA χρησιμοποιώντας ένα δίσκο τυποποίησης *Olerup SSP*® ή φυλάξτε το δείγμα DNA μέχρι να είστε έτοιμοι να πραγματοποιήσετε την τυποποίηση.

B. Προετοιμασία αντιδραστηρίου/εξοπλισμού

1. Προγραμματίστε ένα θερμικό κυκλοποιητή ώστε να εκτελέσει το πρόγραμμα PCR της *Olerup SSP*®, βλ. Απαιτούμενα όργανα - Παράμετροι κυκλοποίησης PCR παραπάνω.
2. Να έχετε διαθέσιμη την Taq πολυμεράση (5 μονάδες/μl), φυλάσσετε στους -20°C.
3. Παρασκευάστε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, βλ. ενότητα Γ – **Προετοιμασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα** παρακάτω).

Γ. Προετοιμασία ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα

Για σύστημα πήκτωμάτων 96 *Olerup SSP*® (Αρ. προϊόντος 103.101-01)

1. Ρύθμιση
 - Οριζοντιώστε το θάλαμο χύτευσης για 1 πήκτωμα (Αρ. προϊόντος 103.101-31) ή το θάλαμο χύτευσης για 3 πήκτωμα (Αρ. προϊόντος 103.101-33) χρησιμοποιώντας την αεροστάθμη και τα τρία σκέλη ρυθμιζόμενου ύψους.
 - Τοποθετήστε το(τους) δίσκο(-ους) πήκτωμάτων στο θάλαμο χύτευσης.
2. Προετοιμασία πήκτωματος αγαρόζης 2% (w/v)

Χρησιμοποιήστε ένα υψηλής ποιότητας πήκτωμα αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση, με δυνατότητα ανάλυσης τμημάτων DNA 50-2.000 ζευγών βάσεων.

 - Σε μια γυάλινη φιάλη 500 ml, προσθέστε σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος 10x TBE (Tris-βορικό EDTA) 150 ml αποσταγμένου νερού και 2 g αγαρόζης.
 - Διαλύστε την αγαρόζη βράζοντάς τη σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να δημιουργηθεί ένα ομογενές διάλυμα 100 ml.
 - Αφήστε το αραιωμένο διάλυμα πήκτωματος να κρυώσει στους 60°C, π.χ. σε θάλαμο θέρμανσης.
 - Πριν από τη χύτευση, πραγματοποιήστε χρώση του πήκτωματος με βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml), 5 μl ανά 100 ml διαλύματος πήκτωματος. Για μεγαλύτερη ευκολία στο χειρισμό, χρησιμοποιήστε τις φιάλες βρωμιούχου αιθιδίου με σταγονόμετρο της εταιρίας μας (Αρ. προϊόντος 103.301-10). **Σημείωση: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο. Ο χειρισμός του θα πρέπει να γίνεται με ατομικό προστατευτικό εξοπλισμό.**

Οδηγίες χρήσης
Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® χωρίς Taq πολυμεράση

- Μεταφέρετε 100 ml διαλύματος πηκτώματος στο δίσκο πηκτώματος στο θάλαμο χύτευσης. Τοποθετήστε 6 κτένες πηκτώματος (Αρ. προϊόντος 103.101-21) στις υποδοχές του δίσκου πηκτώματος.
- Αφήστε το πήκτωμα να σταθεροποιηθεί για 15 λεπτά.
- Μεταφέρετε 750 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5x TBE στη δεξαμενή πηκτώματος. Βυθίστε το δίσκο πηκτώματος στο κουτί πηκτώματος και αφαιρέστε με προσοχή τις 6 κτένες πηκτώματος ανασηκώνοντάς τις.

Όταν χρησιμοποιείτε άλλα συστήματα ηλεκτροφόρησης, ακολουθείτε τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή. Για να χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα με τα κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP®, πρέπει να έχει τη δυνατότητα ανάλυσης προϊόντων PCR με εύρος μεγέθους 50-1100 ζευγών βάσεων.

Δ. Διαδικασία βήμα προς βήμα

1. Αφαιρέστε από την ενδεδειγμένη θερμοκρασία φύλαξης: τον κατάλληλο αριθμό δειγμάτων DNA, το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών, τον όγκο κύριου μίγματος και της Taq πολυμεράσης (5 μονάδες /μl) που απαιτείται για το(τα) δείγμα(-τα) DNA ή το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών της επιλογής σας. Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C)

Για όλα τα κιτ Olerup SSP® χρησιμοποιείται το ίδιο κύριο μίγμα.

2. Αναμίξτε σύντομα το(τα) δείγμα(-τα) DNA με περιδίνηση.
3. Τοποθετήστε το(τους) δίσκο(-ους) εκκινητών σε μια βάση δίσκων PCR.
4. **Κιτ χαμηλής και υψηλής ανάλυσης**
 - Περιδινήστε το κύριο μίγμα πριν λάβετε κλάσματα.
 - Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου κύριο μίγμα, Taq πολυμεράση (5 μονάδες/μl) και dH₂O σε ένα σωληνάριο 0,5 ή 1,5 ml. (για τις κατάλληλες ποσότητες βλ. πίνακα 1 παρακάτω.)
 - Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρητή για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.
 - Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε 8 μl του μίγματος κύριου μίγματος- dH₂O και 2 μl dH₂O στο βοηθίο αρνητικού ελέγχου, δηλ. στο βοηθίο με τα ζεύγη εκκινητών αρνητικού ελέγχου του δίσκου εκκινητών.
 - Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου το δείγμα DNA στο υπόλοιπο μίγμα κύριου μίγματος-dH₂O. (για τις κατάλληλες ποσότητες βλ. πίνακα 1 παρακάτω.)
 - Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρητή για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.
 - Χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρονικό διανεμητή ενός καναλιού, τοποθετήστε ένα κλάσμα 10 μl του μίγματος αντίδρασης δείγματος σε κάθε βοηθίο, εκτός από το βοηθίο αρνητικού ελέγχου, του δίσκου εκκινητών.

Οδηγίες χρήσης
Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® χωρίς Taq πολυμεράση

Πίνακας 1: Όγκοι των συστατικών που απαιτούνται ανά εξέταση για διαφορετικούς αριθμούς βοθρίων με χρήση κύριου μίγματος χωρίς Taq πολυμεράση.

Αρ. βοθρίων ανά εξέταση	Όγκος κύριου μίγματος (μl)	Όγκος δείγματος DNA (μl)	Όγκος dH ₂ O (μl)	Όγκος της Taq πολυμεράσης (μl)	Αρ. βοθρίων ανά εξέταση	Όγκος κύριου μίγματος (μl)	Όγκος δείγματος DNA (μl)	Όγκος dH ₂ O (μl)	Όγκος της Taq πολυμεράσης (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

Οι συνιστώμενοι όγκοι που αναφέρονται παραπάνω περιλαμβάνουν τον όγκο για την αντιστάθμιση των διακυμάνσεων της πιπέτας και των απωλειών υγρού στα εσωτερικά τοιχώματα των σωληναρίων.

5. Κιτ Combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ και DQA-DQB-DR Enhanced και κιτ υψηλής ανάλυσης HLA-C για κοινά αλληλόμορφα

- Περιδινήστε το κύριο μίγμα.
- Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου 8,3 μl Taq πολυμεράση (5 μονάδες/μl) dH₂O και 511,7 μl dH₂O στο παρεχόμενο σωληνάριο 1,5 ml που περιέχει 312 μl κύριου μίγματος.
- Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρική για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.
- Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε 8 μl του μίγματος κύριου μίγματος – Taq πολυμεράσης – dH₂O και 2 μl dH₂O στο βοθρίο αρνητικού ελέγχου αρ. 96, δηλ. στο βοθρίο με τα ζεύγη εκκινητών αρνητικού ελέγχου.

Οδηγίες χρήσης
Κιτ τυποποίησης HLA *Olerup SSP*® χωρίς Taq πολυμεράση

- Χρησιμοποιώντας μια μη αυτόματη πιπέτα ενός καναλιού, προσθέστε σε θερμοκρασία δωματίου 206 µl δείγμα DNA στο υπόλοιπο μίγμα κύριου μίγματος – Taq πολυμεράσης – dH₂O.
- Πωματίστε το σωληνάριο και περιδινήστε για 5 δευτερόλεπτα. Περιστρέψτε παλμικά το σωληνάριο σε ένα μικροφυγοκεντρητή για να μεταφερθεί όλο το υγρό από τις πλευρές του σωληναρίου προς τα κάτω.
- Χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρονικό διανεμητή ενός καναλιού, τοποθετήστε ένα κλάσμα 10 µl του μίγματος αντίδρασης δείγματος σε κάθε βοθρίο, εκτός από το βοθρίο αρνητικού ελέγχου αρ. 96, του δίσκου εκκινήτων.

Σημαντικό:

Βεβαιωθείτε ότι έχετε τοποθετήσει το δείγμα πάνω από τους εκκινήτες (αφυδατωμένοι στον πυθμένα κάθε βοθρίου του δίσκου εκκινήτων) για την αποφυγή επιμόλυνσης μεταξύ των βοθρίων. Ακουμπήστε το εσωτερικό τοίχωμα του σωληναρίου με το ρύγχος της πιπέτας ώστε να επιτρέψετε στο δείγμα να κυλήσει προς τον πυθμένα του βοθρίου. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα δείγματα έχουν κυλήσει προς τον πυθμένα κάθε βοθρίου. Εάν όχι, κτυπήστε ελαφρά το δίσκο πάνω στην επιφάνεια του πάγκου για να βρεθούν όλα τα δείγματα στον πυθμένα του βοθρίου πριν ξεκινήσετε την PCR.

5. Καλύψτε το/τους δίσκο/δίσκους εκκινήτων με τις παρεχόμενες ταινίες σφράγισης PCR. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα βοθρία αντίδρασης έχουν καλυφθεί πλήρως, ώστε να αποφευχθεί η απώλεια λόγω εξάτμισης κατά την διάρκεια της ενίσχυσης PCR. Για την αποφυγή της εξάτμισης κατά την διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης μπορείτε να τοποθετήσετε πάνω από τις ταινίες σφράγισης PCR επίθεμα συμπίεσης *Olerup SSP*® (Αρ. προϊόντος 103.505-06).
6. Τοποθετήστε το(τους) δίσκο(-ους) εκκινήτων στο θερμικό κυκλοποιητή με έναν κατάλληλο προσαρμογέα σωληναρίων-δίσκων. Μην αφήσετε να περάσουν περισσότερα από 5 λεπτά μεταξύ της προετοιμασίας της PCR και της θερμικής κυκλοποίησης.
7. Εισάγετε τον αριθμό προγράμματος *Olerup SSP*®. Ορίστε όγκο αντίδρασης 10 µl.
8. Ξεκινήστε το πρόγραμμα PCR. Η διάρκεια του προγράμματος είναι 1 ώρα και 20 λεπτά περίπου.
9. Αφαιρέστε το(τους) δίσκο(-ους) εκκινήτων από το θερμικό κυκλοποιητή. Ελέγξτε το δίσκο PCR για να βεβαιωθείτε ότι υπάρχει ο ίδιος περίπου όγκος υγρού σε κάθε βοθρίο PCR. Ηλεκτροφορήστε τα δείγματα, βλ. ενότητα E – Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα παρακάτω. Ερμηνεύστε τα αποτελέσματα τυποποίησης βάσει των **Πινάκων ερμηνείας και ειδικότητας ή του Φύλλου εργασίας για τη συγκεκριμένη παρτίδα**, βλ. Αναμενόμενες τιμές παρακάτω.

Ε. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα

1. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, προσανατολίστε το δίσκο εκκινήτων και το κουτί πήκτωματος. Η σειρά των βοθρίων είναι από αριστερά προς τα δεξιά και από επάνω προς τα κάτω.
2. Αφαιρέστε προσεκτικά τα καλύμματα ταινίας προσέχοντας να μη χυθούν τα προϊόντα PCR.
3. Φορτώστε τα προϊόντα PCR με τη σωστή σειρά στο πήκτωμα αγαρόζης 2%. (Δεν χρειάζεται προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης πήκτωματος.) Για τη φόρτωση του πήκτωματος συνιστάται η χρήση πιπέτας 8 καναλιών.
4. Φορτώστε ένα δείκτη μεγέθους DNA (κλίμακα 100 ζευγών βάσεων, Δείκτης μεγέθους DNA, Αρ. προϊόντος 103.202-100 ή Δείκτης μεγέθους DNA για σύντομη επεξεργασία πήκτωμάτων, Αρ. προϊόντος 103.203-100) σε ένα βοθρίο ανά σειρά.
5. Καλύψτε το κουτί πήκτωματος με το καπάκι του.
6. Ηλεκτροφορήστε το πήκτωμα σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5x TBE, χωρίς επανακυκλοφορία του ρυθμιστικού διαλύματος, για 15-20 λεπτά στα 8-10 V/cm.
7. Μεταφέρετε το δίσκο πήκτωματος με το πήκτωμα σε ένα διαφανοσκόπιο UV.
8. Φωτογραφίστε το πήκτωμα με ή χωρίς το δίσκο πήκτωματος.
9. Επιστημάνετε τη φωτογραφία σύμφωνα με τους κανόνες του εργαστηρίου.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της ASHI για την εξέταση HLA, σε κάθε προετοιμασία PCR πρέπει να περιλαμβάνεται ένας αρνητικός δείκτης ελέγχου (επιμόλυνσης). (Αναθεωρημένα Πρότυπα για Διαπιστευμένα Εργαστήρια, Αμερικανική Εταιρεία Ιστοσυμβατότητας και Ανοσογενετικής, τελικά αναθεωρημένα πρότυπα που εγκρίθηκαν από το CMS: 16 Φεβρουαρίου 2021). Ένα βοθρίο αρνητικού ελέγχου περιλαμβάνεται σε όλα τα κιτ, με εξαίρεση τη μονάδα δόσης HLA-B*27 και τα κιτ μονού βοθρίου HLA-B*27.

Ανατρέξτε στην ενότητα Ερμηνεία πήκτωματος στη σελίδα 14.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα φύλλα επικύρωσης κυτταρικών σειρών για κάθε συγκεκριμένη παρτίδα και το πιστοποιητικό ανάλυσης παρέχονται ηλεκτρονικά στη διεύθυνση www.caredx.com.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

1. Η διεργασία PCR-SSP απαιτεί υψηλά ελεγχόμενες συνθήκες εξέτασης ώστε να διασφαλίζεται επαρκής διακριτική ενίσχυση. Η διαδικασία που περιγράφεται στις Οδηγίες χρήσης πρέπει να τηρείται αυστηρά.
2. Το δείγμα εκχυλισμένου DNA είναι το πρότυπο για τη συγκεκριμένη διεργασία ενίσχυσης PCR. Το κεκαθαρμένο DNA θα πρέπει να έχει λόγο $A_{260/280}$ μεταξύ 1,6 και 2,0 για την επίτευξη βέλτιστης οπτικοποίησης ζώνης με την ηλεκτροφόρηση.
3. Όλα τα όργανα, π.χ. θερμικός κυκλοποιητής, συσκευές πιπέτας, πρέπει να βαθμονομούνται σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
4. Πληροφορίες για τη συγκεκριμένη παρτίδα υπάρχουν στο Ένθετο προϊόντος: Πληροφορίες για τη συγκεκριμένη παρτίδα και στο Φύλλο εργασίας για τη συγκεκριμένη παρτίδα.

Οδηγίες χρήσης
Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® χωρίς Ταq πολυμεράση

5. Βάσει εξέτασης που έχει πραγματοποιηθεί, οι ακόλουθες ουσίες αξιολογήθηκαν με τρεις (3) μεθόδους εκχύλισης στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζουν την απόδοση της εξέτασης.

Μέθοδος εκχύλισης	Παρεμποδίζουσα ουσία	Παρεμποδίζουσα συγκέντρωση*
EZ1 DSP DNA Blood System	Χολερυθρίνη	200mg/L
	Αιμοσφαιρίνη	200g/L
	Τριγλυκερίδια	30g/L
	Πρωτεΐνες	110g/L
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Χολερυθρίνη	200mg/L
	Αιμοσφαιρίνη	200g/L
	Τριγλυκερίδια	18,2g/L
	Πρωτεΐνες	77 - 96g/L
Μέθοδος Gentra PureGene	Χολερυθρίνη	200mg/L
	Αιμοσφαιρίνη	200g/L
	Τριγλυκερίδια	18,2g/L
	Πρωτεΐνες	119 - 146g/L

Οδηγίες χρήσης
Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® χωρίς Taq πολυμεράση

6. Οι πλάκες PCR είναι φυσικά συμβατές με τους περισσότερους θερμικούς κυκλοποιητές της αγοράς. Βλ. πίνακα συμβατότητας θερμικών κυκλοποιητών παρακάτω.

Σημείωση: Ο πίνακας προορίζεται για χρήση ως οδηγός μόνο. Για επικυρωμένους κυκλοποιητές ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις Οργάνων-Όργανο.

Πίνακας συμβατότητας	
Κατασκευαστής	Θερμικός κυκλοποιητής
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-well
	ProFlex 2x96-well
	Veriti 0.2ml 96-well Block
	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)
Eppendorf	PTC-100 with 96-well block
	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. Η απόδοση αυτού του κιτ με τη χρήση του κύριου μίγματος χωρίς την Taq πολυμεράση έχει επικυρωθεί μόνο με το Taq DNA Polymerase της Roche, βαθμού GMP (Κατάλογος # 03 734 927 001 ή #03 734 935 001). Η απόδοση της δοκιμασίας με τη χρήση οποιωνδήποτε άλλων ενζύμων δεν είναι γνωστή και πρέπει να καθοριστεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ**A. Ανάλυση δεδομένων**

Εξετάστε τη φωτογραφία του πηκτώματος με προσοχή και καθορίστε τις θετικές λωρίδες.

1. Σε περίπτωση ενίσχυσης συγκεκριμένου(-ων) αλληλόμορφου(-ων) HLA, θα φανεί σε μια λωρίδα πηκτώματος μια κοντύτερη ζώνη η οποία μετακινείται ταχύτερα. Αυτό υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα εξέτασης.
 - a. Καταγράψτε την παρουσία και την απουσία συγκεκριμένων προϊόντων PCR.
 - b. Είναι χρήσιμο να παρακολουθείτε τα σχετικά μήκη των συγκεκριμένων προϊόντων PCR, όπως δίδονται στα ένθετα προϊόντος της συγκεκριμένης παρτίδας, κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πηκτώματος. Αρκετές λωρίδες έχουν δύο ή περισσότερα πιθανά μήκη συγκεκριμένων προϊόντων PCR. Αυτά τα βοηθία περιέχουν πολλαπλά ζεύγη εκκινητών που δημιουργούν προϊόντα PCR διαφορετικών μεγεθών ανάλογα με το(τα) αλληλόμορφο(-α) του DNA δείγματος.
 - c. Για να επιτύχετε την τυποποίηση HLA του DNA δείγματος, αντιστοιχίστε το μοτίβο των λωρίδων πηκτώματος με συγκεκριμένα προϊόντα PCR με τις πληροφορίες στους Πίνακες ερμηνείας και ειδικότητας της συγκεκριμένης παρτίδας.
2. Σε όλες τις λωρίδες πηκτώματος, εκτός από τη λωρίδα πηκτώματος αρνητικού ελέγχου, θα πρέπει να είναι ορατή μια λωρίδα εσωτερικού θετικού ελέγχου, η οποία υποδεικνύει επιτυχή ενίσχυση. Η λωρίδα εσωτερικού θετικού ελέγχου μπορεί να είναι ασθενής ή να απουσιάζει στις θετικές λωρίδες πηκτώματος.
 - a. Καταγράψτε την παρουσία και τα σχετικά μήκη των ζωνών εσωτερικού θετικού ελέγχου. Οι ζώνες ελέγχου διαφορετικού μεγέθους θα βοηθήσουν στο σωστό προσανατολισμό της τυποποίησης καθώς και στην ταυτοποίηση του κιτ.
 - b. Η απουσία ζώνης εσωτερικού θετικού ελέγχου χωρίς συγκεκριμένο προϊόν PCR υποδεικνύει αποτυχία της αντίδρασης PCR.
 - i. Εάν ο προσδιορισμός των αλληλόμορφων HLA μπορεί να πραγματοποιηθεί παρά την αποτυχία της(των) αντίδρασης(-ων) PCR και η συγκεκριμένη αποτυχία δεν αλλάζει την αντιστοίχιση αλληλόμορφων, δεν χρειάζεται να επαναληφθεί η εξέταση.
 - ii. Εάν, ωστόσο, η αποτυχία των αντιδράσεων PCR θα μπορούσε να αλλάξει την αντιστοίχιση αλληλόμορφων, ο προσδιορισμός πρέπει να επαναληφθεί.
3. Η παρουσία ειδικού προϊόντος PCR ή ζώνης εσωτερικού θετικού ελέγχου σε λωρίδα(-ες) αρνητικού ελέγχου υποδεικνύει επιμόλυνση με προϊόν(-α) PCR και ακυρώνει όλα τα αποτελέσματα της εξέτασης. Στη(στις) λωρίδα(-ες) αρνητικού ελέγχου μπορεί να παρατηρηθούν ολιγομερή εκκινητών μεγέθους από 40 έως 60 ζεύγη βάσεων. Αυτό δεν αντιπροσωπεύει επιμόλυνση.

B. Ερμηνεία πηκτώματος

	Θετική αντίδραση	Αρνητική αντίδραση	Αποτυχημένη αντίδραση PCR
Βοθρίο			
Εσωτερική ζώνη θετικού ελέγχου			
Ειδική ζώνη			
Ζώνη εκκινητών			

1. Θα πρέπει να προστεθεί ένας δείκτης μεγέθους DNA (κλίμακα 100 ζευγών βάσεων, Δείκτης μεγέθους DNA, Αρ. προϊόντος 103.202-100 ή Δείκτης μεγέθους DNA για σύντομη επεξεργασία πηκτωμάτων, 103.203-100) σε ένα βοθρίο ανά σειρά του πηκτώματος ή σύμφωνα με τις τοπικές κατευθυντήριες γραμμές πιστοποίησης του εργαστηρίου.
2. Μπορεί να προκύψουν ζώνες μακρύτερα από τη ζώνη εσωτερικού θετικού ελέγχου. Αυτές οι ζώνες δεν θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων τυποποίησης.
3. Οι εκκινητές που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί θα σχηματίσουν μια διάχυτη ζώνη μικρότερη από 50 ζεύγη βάσεων.
4. Μπορεί να παρατηρηθούν παραμορφώσεις ολιγομερών των εκκινητών. Αυτές έχουν μεγαλύτερο μήκος από τη ζώνη εκκινητών αλλά μικρότερο από τις ειδικές ζώνες.

ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Ποιοτικός έλεγχος παρτίδας κιτ

Κάθε διάλυμα εκκινητών ελέγχεται βάσει ενός πάνελ 48 δειγμάτων DNA από χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές του IHWC (International Histocompatibility Workshop and Conference). Βλ. Φύλλο(-α) ελέγχου κυτταρικής σειράς της συγκεκριμένης παρτίδας στο Ένθετο προϊόντος, Πληροφορίες για τη συγκεκριμένη παρτίδα.

Σύγκριση μεθόδων

Διεξήχθη μια μελέτη για τη σύγκριση των κιτ τυποποίησης HLA *Olerup SSP*[®] με και χωρίς Taq πολυμεράση που παρέχονται με το κύριο μίγμα PCR. Σκοπός της μελέτης ήταν να αποδειχθεί ότι η μη αυτόματη προσθήκη δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της

Οδηγίες χρήσης
Κιτ τυποποίησης HLA Olerup SSP® χωρίς Taq πολυμεράση

δοκιμασίας και ότι διαφορετικές παρτίδες Taq πολυμεράσης αποδίδουν τα ίδια αποτελέσματα. Η μελέτη περιελάμβανε την τυποποίηση HLA-A, -B (Κατηγορία I) και -DRB (Κατηγορία II) χαμηλής ανάλυσης 15 δειγμάτων DNA με γνωστό γονότυπο HLA, τα οποία ελήφθησαν από το International Histocompatibility Workshop Collection. Τα δείγματα ετοιμάστηκαν και κωδικοποιήθηκαν από προσωπικό διαφορετικό από εκείνο που εκτελούσε τις δοκιμές. Το προσωπικό δοκιμών ήταν τυφλοποιημένο ως προς τους τύπους HLA των δειγμάτων. Κάθε δείγμα ελέγχθηκε παράλληλα με το Olerup SSP® HLA-A-B-DR Combi Tray με κύριο μίγμα PCR χωρίς Taq πολυμεράση («Υπό εξέταση») και το Olerup SSP® HLA-A-B-DR Combi Tray με κύριο μίγμα PCR με Taq πολυμεράση ("Έλεγχος"), σύμφωνα με τις οδηγίες του ένθετου κάθε προϊόντος της δοκιμασίας. Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο CareDx AB στη Στοκχόλμη της Σουηδίας, χρησιμοποιώντας μία παρτίδα κιτ και δύο παρτίδες Taq πολυμεράσης. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το προϊόν Taq DNA πολυμεράση της Roche, βαθμού GMP. Οι δοκιμές σε κάθε δείγμα αποτελούνταν από την τυποποίηση χαμηλής ανάλυσης με το Olerup SSP® HLA-A-B-DR Combi Tray με: 1) Κύριο μίγμα PCR με Taq πολυμεράση (δοκιμασία με έγκριση από τον FDA) (Δοκιμασία ελέγχου), 2) Κύριο μίγμα PCR συν Taq DNA πολυμεράση της Roche, προϊόν βαθμού GMP, 5 U/μL, Παρτίδα #1 (Test lot #1), και 3) Κύριο μίγμα PCR συν Taq DNA πολυμεράση της Roche, προϊόν βαθμού GMP, 5 U/μL. Παρτίδα #2 (Test lot #2). Μετά την PCR, η ανίχνευση εκτελέστηκε με πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω.

Σύγκριση	Συμφωνία			% συμφωνία (95% διάστημα εμπιστοσύνης ^α)
	Αποτελέσματα τυποποίησης κατηγορίας I (# συμφωνία/σύνολο)		Αποτελέσματα τυποποίησης κατηγορίας II (# συμφωνία/σύνολο)	
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Παρτίδα υπό εξέταση #1 / παρτίδα ελέγχου	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Παρτίδα υπό εξέταση #1 / Ομοφωνία ^β	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Παρτίδα υπό εξέταση #2 / Παρτίδα ελέγχου	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Παρτίδα υπό εξέταση #2 / Ομοφωνία	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)
Παρτίδα υπό εξέταση #1 / Παρτίδα ελέγχου #2	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 – 100,0%)

^α Μέθοδος βαθμολογίας

^β Αποτέλεσμα ομοφωνίας από το International Histocompatibility Workshop Collection

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. Τα τρέχοντα αλληλόμορφα HLA μπορούν να βρεθούν στη διεύθυνση www.ebi.ac.uk/imgt/hla

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Απουσία ενίσχυσης (ούτε των τμημάτων εσωτερικού ελέγχου, ούτε συγκεκριμένων ζωνών).	Υπερβολικά χαμηλή ποσότητα DNA.	Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και δείτε εάν η ποσότητα που έχει προστεθεί είναι σωστή. Η επιμόλυνση με RNA μπορεί να προκαλέσει φασματοφωτομετρική υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης DNA. Επαναλάβετε την εκχύλιση DNA με προσοχή, χρησιμοποιώντας φρέσκα διαλύματα. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.
	Το DNA περιέχει αναστολείς PCR, π.χ. πρωτεΐνες, αιθανόλη (από τα βήματα καθίζησης), υπολειπόμενα προϊόντα στερεής φάσης από τον καθαρισμό DNA.	Μετρήστε την ποιότητα του DNA. Συνιστούμε λόγο A260/A280 της τάξης του 1,6-2,0 βάσει φασματοφωτομετρίας UV. Ακολουθήστε με ακρίβεια το πρωτόκολλο εκχύλισης DNA του προμηθευτή. Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.
	Το DNA έχει εκχυλιστεί από ηπαρινισμένο αίμα.	Χρησιμοποιείτε μη ηπαρινισμένο αίμα ή ακολουθείτε πρωτόκολλα εκχύλισης DNA ειδικά για ηπαρινισμένο αίμα.

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Απουσία ενίσχυσης (ούτε των τμημάτων εσωτερικού ελέγχου, ούτε συγκεκριμένων ζωνών).	Το DNA έχει αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει EDTA.	Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA και αραιώστε το σε dH ₂ O.
	Ακούσια εισχώρηση λευκαντικού στην εξέταση.	Ελέγξτε τις περιοχές όπου μπορεί να έχει εισχωρήσει το λευκαντικό.
	Τα κιτ δεν φυλάσσονται στην κατάλληλη θερμοκρασία.	Φυλάσσετε τα κιτ στους -20 °C.
	Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν λειτουργεί σωστά.	Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.
	Ακατάλληλη επαφή μεταξύ της μονάδας θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή και του δίσκου τυποποίησης SSP.	Χρησιμοποιείτε το σωστό δίσκο/διάταξη συγκράτησης για βοθρία αντίδρασης 0,2 ml με λεπτά τοιχώματα. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του θερμικού κυκλοποιητή.
Τυχαία αποτυχία της ενίσχυσης (διαρροές).	Όταν οι ταινίες σφράγισης PCR/πώματα σωληναρίων PCR δεν είναι καλά κλεισμένα, προκαλείται εξάτμιση και τελικά αποτυχία της ενίσχυσης.	Βεβαιωθείτε ότι οι ταινίες σφράγισης PCR/όλα τα πώματα είναι καλά κλεισμένα. Για την αποφυγή της εξάτμισης κατά την διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης μπορείτε να τοποθετήσετε πάνω από τις ταινίες σφράγισης PCR επίθεμα συμπίεσης Olerup SSP® (Αρ. προϊόντος 103.505-06).
	Σφάλματα φόρτωσης πηκτώματος.	Βεβαιωθείτε ότι έχει φορτωθεί ο σωστός αριθμός βοθρίων και ότι όλα τα βοθρία περιέχουν

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Τυχαία αποτυχία της ενίσχυσης (διαρροές).		περίπου τον ίδιο όγκο μίγματος PCR.
	Χρήση μη βαθμονομημένων πιπτετών.	Βαθμονομήστε όλες τις πιπέτες σύμφωνα με τις συστάσεις του προμηθευτή.
	Σφάλματα στη χρήση των πιπτετών.	Χρησιμοποιείτε τις πιπέτες με μεγαλύτερη προσοχή.
	Το κύριο μίγμα και το δείγμα DNA δεν έχουν αναμιχθεί σωστά πριν από τη χρήση.	Αναμίξτε σύντομα με περιδίνηση πριν από τη χρήση. Συνιστούμε περιδίνηση μετά από κάθε σειρά.
	Τα βοηθία περιέχουν άνισο όγκο μίγματος DNA-κυρίου μίγματος.	Χρησιμοποιείτε τις πιπέτες με μεγαλύτερη προσοχή.
Ασθενή τμήματα εσωτερικού ελέγχου.	Μη κεκαθαρωμένο DNA.	Μετρήστε την ποιότητα του DNA. Ο λόγος A260/A280 θα πρέπει να είναι 1,6-2,0 βάσει φασματοφωτομετρίας UV. Η επιμόλυνση με RNA μπορεί να προκαλέσει φασματοφωτομετρική υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης DNA. Το αλλοιωμένο DNA δημιουργεί κηλίδωση στις λωρίδες τηκτώματος. Επαναλάβετε την εκχύλιση DNA με προσοχή, χρησιμοποιώντας φρέσκα διαλύματα. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.
	Υπερβολικά χαμηλή ποσότητα DNA.	Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Ασθενή τμήματα εσωτερικού ελέγχου.		DNA που έχει εκχυλιστεί με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN. Η επιμόλυνση με RNA μπορεί να προκαλέσει φασματοφωτομετρική υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης DNA. Το αλλοιωμένο DNA δημιουργεί κηλίδωση στις λωρίδες πηκτώματος. Επαναλάβετε την εκχύλιση DNA με προσοχή, χρησιμοποιώντας φρέσκα διαλύματα. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.
	Υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία υβριδισμού. Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν έχει βαθμονομηθεί.	Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.
	Το κύριο μίγμα PCR έχει φυλαχθεί στους +4° C για περισσότερο από 2 εβδομάδες.	Φυλάσσετε κατάλληλα το κύριο μίγμα PCR.
Μη ειδική ενίσχυση (διαβαθμίσεις ή κηλιδώσεις).	Χρήση υπερβολικού δείγματος DNA.	Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για DNA που έχει εκχυλιστεί με το DSP DNA Blood System της QIAGEN. Ορισμένα διαλύματα εκκινητών τείνουν να

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Μη ειδική ενίσχυση (διαβαθμίσεις ή κηλιδώσεις).		δημιουργούν συχνότερα μη ειδική ενίσχυση. Βλ. υποσημειώσεις σε κάθε Πίνακα ειδικότητας της συγκεκριμένης παρτίδας.
	Μη κεκαθαρισμένο DNA.	Όλα τα τμήματα που είναι μεγαλύτερα από το τμήμα εσωτερικού ελέγχου θα πρέπει να αγνοούνται κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν. Ελέγξτε την ποιότητα του DNA. Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN. Ορισμένα διαλύματα εκκινητών τείνουν να δημιουργούν συχνότερα μη ειδική ενίσχυση. Βλ. υποσημειώσεις σε κάθε Πίνακα ειδικότητας της συγκεκριμένης παρτίδας.
Ολοένα ασθενέστερα σήματα ενίσχυσης με την πάροδο του χρόνου.	Το διάλυμα χρώσης πηκτώματος αгарόζης με βρωμιούχο αιθίδιο δεν είναι φρέσκο.	Ετοιμάστε φρέσκο διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για να επιτύχετε καλύτερη χρώση του πηκτώματος αгарόζης και καλύτερο σήμα. Οι περιοχές θολότητας των εκκινητών μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα εάν η χρώση του πηκτώματος αгарόζης είναι φυσιολογική.
	Μία από τις λυχνίες UV έχει υποστεί βλάβη.	Ελέγξτε τον εξοπλισμό φωτισμού UV. Οι περιοχές θολότητας των εκκινητών μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα εάν

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Ολοένα ασθενέστερα σήματα ενίσχυσης με την πάροδο του χρόνου.	Χρησιμοποιήθηκε υπερβολικά μικρή ποσότητα DNA.	ο φωτισμός UV είναι φυσιολογικός. Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για DNA που έχει εκχυλιστεί με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.
	Υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία υβριδισμού. Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν έχει βαθμονομηθεί.	Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.
Περίεργα μοτίβα ενίσχυσης.	Χρησιμοποιείται εσφαλμένος Πίνακας ερμηνείας/Φύλλο εργασίας της συγκεκριμένης παρτίδας.	Ελέγξτε τον αριθμό παρτίδας του προϊόντος και τον Πίνακα ερμηνείας/Φύλλο εργασίας που χρησιμοποιείται.
	Εσφαλμένη σειρά φόρτωσης πηκτώματος.	Ελέγξτε την ευθυγράμμιση των μιγμάτων και των λωρίδων πηκτώματος.
	Το μοτίβο ενίσχυσης περιέχει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.	Βλέπε παρακάτω.
	Το μοτίβο ενίσχυσης περιέχει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα.	Βλέπε παρακάτω.
Ψευδώς θετικές ενισχύσεις.	Επιμόλυνση DNA.	Χρησιμοποιείτε γάντια, ρύγχη πιπέτας με φραγμούς (τάπες με φίλτρο) και πραγματοποιείτε το χειρισμό πριν από την PCR και μετά την PCR σε διαφορετικούς χώρους.

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Ψευδώς θετικές ενισχύσεις.		Διασφαλίστε ότι ο χειρισμός όλων των δειγμάτων πραγματοποιείται με ακρίβεια, σε όλα τα βήματα. Ελέγξτε για τυχόν επιμόλυνση με το κιτ <i>Olerup SSP</i> [®] Wipe Test.
	Μη κεκαθαμένο DNA.	Μετρήστε την ποιότητα του DNA. Ακολουθήστε με ακρίβεια το πρωτόκολλο εκχύλισης DNA του προμηθευτή. Δοκιμάστε άλλα συστήματα εκχύλισης DNA. Επαναλάβετε την εκχύλιση του DNA. Συνιστούμε την αυτοματοποιημένη εκχύλιση DNA με το EZ1 DSP DNA Blood System κιτ της QIAGEN.
	Χρήση υπερβολικού δείγματος DNA.	Μετρήστε τη συγκέντρωση DNA και προσαρμόστε τη στα 30 ng/μl ή στα 15 ng/μl για DNA που έχει εκχυλιστεί με το EZ1 DSP DNA Blood System της QIAGEN.
	Υπερβολικά χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού.	Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες.

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Ψευδώς θετικές ενισχύσεις.	Μεγάλη καθυστέρηση μεταξύ της προετοιμασίας της PCR και της έναρξης της θερμικής κυκλοποίησης.	Δεν θα πρέπει να υπάρχει καθυστέρηση πάνω από 5 λεπτά πριν από τη θερμική κυκλοποίηση.
	Καθυστέρηση μεταξύ της τοποθέτησης των δίσκων στο θερμικό κυκλοποιητή και της έναρξης της κυκλοποίησης.	Χρησιμοποιείτε προθερμασμένο θερμικό κυκλοποιητή.
	Χρήση υπερβολικής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου.	Χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου.
	Εσφαλμένη ερμηνεία μιας παραμόρφωσης ως ειδικής ζώνης.	Ελέγξτε τον Πίνακα ερμηνείας/ Φύλλο εργασίας της συγκεκριμένης παρτίδας καθώς και τον Πίνακα ειδικότητας και τις υποσημειώσεις για το σωστό μέγεθος ζωνών.
	Το μοτίβο ενίσχυσης περιέχει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.	Ελέγξτε εάν όλες οι ειδικές ενισχύσεις έχουν το σωστό μέγεθος ή εάν μια παραμόρφωση (μεταφορά, διμερές εκκινήτων) έχει παρερμηνευθεί ως ενίσχυση.
	Εσφαλμένη σειρά φόρτωσης πηκτώματος.	Ελέγξτε την ευθυγράμμιση των μιγμάτων και των λωρίδων πηκτώματος.
Ψευδώς αρνητικές ενισχύσεις.	Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν έχει βαθμονομηθεί σωστά.	Βαθμονομήστε το θερμικό κυκλοποιητή και ελέγξτε το πρόγραμμα PCR. Ένας θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τυποποίηση PCR-SSP ρουτίνας θα πρέπει να βαθμονομείται κάθε 6-12 μήνες. Εάν το πρόβλημα δεν επιλυθεί με εκ νέου

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Ψευδώς αρνητικές ενισχύσεις.		βαθμονόμηση, επαναλάβετε την εξέταση τυποποίησης με ένα δείγμα αναφοράς της ίδιας ειδικότητας. Εάν επιβεβαιωθεί το αρνητικό αποτέλεσμα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης πελατών.
	Εσφαλμένη σειρά φόρτωσης πηκτώματος.	Ελέγξτε την ευθυγράμμιση των μιγμάτων και των λωρίδων πηκτώματος.
Γενικά προβλήματα με το πήκτωμα (ασαφή πηκτώματα ή/και λωρίδες με κηλίδωση).	Αλλοιωμένο δείγμα DNA.	Εμφανίζεται ως κηλίδωση στις λωρίδες πηκτώματος. Απομονώστε DNA από ένα φρέσκο δείγμα.
	Έντονη γράμμωση σε τυχαία βοθρία.	Ανομοιόμορφα εναιωρήματα DNA. Βεβαιωθείτε ότι το δείγμα DNA έχει αραιωθεί πριν λάβετε το κλάσμα σας. Περιδινήστε το αραιωμένο δείγμα DNA.
	Προϊόν PCR που έχει διαρρεύσει από το βοθρίο.	Ευθυγραμμίστε προσεκτικά τα ρύγγη των πιπτετών με τα βοθρία πηκτώματος και πραγματοποιήστε τη διανομή αργά.
	Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι πολύ ζεστό.	Ετοιμάστε νέο ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Χρησιμοποιήστε χαμηλότερη τάση ρεύματος.
	Έχει χρησιμοποιηθεί εσφαλμένο ποσοστό πηκτώματος αγαρόζης.	Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται το συνιστώμενο ποσοστό 2% για το πήκτωμα αγαρόζης.
	Η αγαρόζη δεν έχει διαλυθεί πλήρως.	Επαναλάβετε το βρασμό για την τήξη της αγαρόζης.

Πρόβλημα	Αιτία	Ενέργεια
Συνέχεια: Γενικά προβλήματα με το πήκτωμα (ασαφή πηκτώματα ή/και λωρίδες με κηλίδωση).	Εσφαλμένη συγκέντρωση TBE.	Χρησιμοποιήστε τη συνιστώμενη συγκέντρωση TBE 0,5x.
	Τα πηκτώματα έχουν χυτευθεί πολύ πρόσφατα.	Τα πηκτώματα είναι έτοιμα για χρήση μόνο αφού περάσουν 15 λεπτά από τη χύτευση.
	Τα πηκτώματα είναι πολύ παλιά.	Μη χυτεύετε πηκτώματα πολύ νωρίτερα.
	Η κτένα πηκτωμάτων που χρησιμοποιείται έχει πολύ παχιές υποδοχές.	Χρησιμοποιείτε λεπτές κτένες (4 x 1 mm).
	Ο δίσκος πηκτώματος δεν είναι διαπερατός από την ακτινοβολία UV.	Αφαιρέστε το πήκτωμα από το δίσκο πριν από την επισκόπηση.
	Η εικόνα του πηκτώματος είναι υπερβολικά φωτεινή.	Υπερβολική χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Ελέγξτε τις ρυθμίσεις της κάμερας.
	Η εικόνα του πηκτώματος είναι υπερβολικά σκοτεινή.	Χρησιμοποιείτε τη συνιστώμενη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου. Ελέγξτε τις ρυθμίσεις της κάμερας.
Γενικά προβλήματα με ψευδώς αρνητική ενίσχυση ή παρόμοια προβλήματα από ανάλυση σε ανάλυση	Υπερβολικά υψηλή ρύθμιση ρυθμού κλιμάκωσης.	Τα κιτ Olerup SSP έχουν επικυρωθεί με ρύθμιση των κυκλοποιητών GeneAmp 9700 σε τρόπο λειτουργίας 9600 και ProFlex με ρυθμό κλιμάκωσης 3° C/s. Ρυθμοί κλιμάκωσης υψηλότεροι από αυτόν που περιγράφεται μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της τυποποίησης.

ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΓΓΡΑΦΟ/ΠΡΟΪΟΝ

Η επωνυμία *Olerup SSP*[®] είναι εμπορικό σήμα κατατεθέν της *CareDx AB*.

Η επωνυμία Qiagen[™] είναι εμπορικό σήμα της QIAGEN.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΑΓΟΡΑΣΤΗ: Τα κιτ *Olerup SSP*[®] κιτ χωρίς Ταq πολυμεράση – Αυτό το προϊόν έχει βελτιστοποιηθεί για χρήση με το προϊόν Ταq πολυμεράση της Roche, βαθμού GMP (Κατάλογος # 03 734 927 001 ή #03 734 935 001) στη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης («PCR»), η οποία μπορεί να καλύπτεται από διπλώματα ευρεσιτεχνίας από την Roche Molecular Systems, Inc. και την F. Hoffmann-La Roche Ltd. («Roche»). Το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για την επικοινωνία με την εταιρεία Roche Molecular Systems, Inc. για να προσδιοριστεί εάν απαιτείται άδεια βάσει αυτών των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας.

ΕΓΓΥΗΣΗ

Η *CareDx AB* εγγυάται στον αρχικό αγοραστή ότι τα προϊόντα της δεν φέρουν ελαττώματα στα υλικά και στην κατασκευή υπό συνθήκες φυσιολογικής χρήσης και εφαρμογής. Η μόνη υποχρέωση της *CareDx AB* βάσει της παρούσας εγγύησης έγκειται στη δωρεάν αντικατάσταση κάθε προϊόντος που δεν πληροί τα πρότυπα απόδοσης όπως αυτά ορίζονται στο φύλλο προδιαγραφών του.

Η παρούσα εγγύηση ισχύει μόνο για προϊόντα που χρησιμοποιούνται και φυλάσσονται σύμφωνα με τις συστάσεις της *CareDx AB* και δεν ισχύει για προϊόντα που έχουν υποστεί τροποποιήσεις, εσφαλμένη χρήση ή κατάχρηση.

Όλες οι αξιώσεις βάσει της παρούσας εγγύησης πρέπει να απευθύνονται στην *CareDx AB* εγγράφως και να συνοδεύονται από αντίγραφο του τιμολογίου αγοράς. Η παρούσα εγγύηση αντικαθιστά όλες τις άλλες εγγυήσεις, ρητές ή σιωπηρές, συμπεριλαμβανόμενων εγγυήσεων περί εμπορευσιμότητας και καταλληλότητας για συγκεκριμένο σκοπό. Σε καμία περίπτωση η *CareDx AB* δεν φέρει ευθύνη για παρεπόμενες ή αποθετικές ζημιές.

Το παρόν προϊόν δεν μπορεί να επανατροποποιηθεί, επανασυσκευαστεί ή επαναπωληθεί με οποιοδήποτε τρόπο χωρίς την έγγραφη συναίνεση της *CareDx AB*, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Σουηδία.

Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μέσα μετάδοσης νόσων. Όλες οι εργασίες θα πρέπει να εκτελούνται με γάντια και κατάλληλη προστασία.

ΔΗΛΩΣΗ ΕΓΓΥΗΣΗΣ

Η *CareDx AB* εγγυάται ότι οι εκκινητές στους δίσκους τυποποίησης *Olerup SSP*[®] χαρακτηρίζονται από τις ειδικότητες που αναγράφονται στο φύλλο εργασίας καθώς και στους Πίνακες ειδικότητας και ερμηνείας της συγκεκριμένης παρτίδας στο ένθετο προϊόντος.

ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ:

Κατασκευαστής:

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

Τηλ: +46-8-508 939 00

Φαξ: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Ιστότοπος: www.caredx.com

Διανέμεται από:

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

Τηλ: +46-8-508 939 00

Φαξ: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Ιστότοπος: www.caredx.com

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

Τηλ: 1-877-653-7871

Φαξ: 610-344-7989

E-mail: orders-us@caredx.com

Ιστότοπος: www.caredx.com

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

Τηλ.: +61 8 9336 4212

E-mail: orders-aus@caredx.com

Ιστότοπος: www.caredx.com

Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Για πληροφορίες σχετικά με τους διανομείς της CareDx παγκοσμίως, επικοινωνήστε με την CareDx AB.

Το 0417-LBL v05 μεταφράζεται από τα αγγλικά, κύριο κιτ τυποποίησης *Olerup SSP*[®] HLA χωρίς Ταq πολυμεράση, 0193-LBL έκδ 07.

Αλλαγές στην αναθεώρηση 0193-LBL έκδ. 07 συγκριτικά με την 0193-LBL έκδ. 06:

1. Προσθήκη του Ελβετικού εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου.
2. Προσθήκη του GelRed στον τομέα Β. Απαιτούμενα αλλά μη παρεχόμενα υλικά.