



Használati utasítás

Olerup SSP® Taq polimeráz nélkül

© 2023 CareDx, Inc. Minden szolgáltatási védjegy vagy védjegy a CareDx, Inc. vagy annak leányvállalatai tulajdona vagy licence. Minden jog fenntartva.

1590-LBL v02 Olerup SSP® HLA-típuszó készletek Taq polimeráz nélkül

In Vitro *diagnostikai* felhasználásra

Felülvizsgálva: 2023. szeptember



1 / 29 oldal

In Vitro diagnosztikai felhasználásra

RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT

Az Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek kvalitatív *in vitro* diagnosztikai tesztek az I. és II. osztályú HLA allélok DNS-tipizálására. A termékeket képzett szakemberek használják orvosi környezetben a HLA fenotípus meghatározása céljából. A vizsgált alapanyag a DNS.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MAGYARÁZAT

A humán leukocita antigének (HLA) meghatározására a legelterjedtebb módszer a limfocitotoxicitási vizsgálat. Ezt a tesztet azonban polimeráz láncreakció (PCR) alapú DNS-tipizálási technikák váltották fel hibaaránya és az allélszint felbontásának hiánya miatt. A legtöbb PCR-alapú technikában a PCR-folyamatot csak a szükséges cél-DNS felerősítésére használják, és a különböző allélok megkülönböztetéséhez egy posztamplifikációs lépésre van szükség. Ezzel szemben a PCR-SSP módszertanban (sequence-specific primer – SSP) a különböző allélok közötti megkülönböztetés a PCR-folyamat során történik. Ez lerövidíti és leegyszerűsíti az amplifikáció utáni lépést egy egyszerű gélelektroforézises detektálási lépésre. Az SSP teszt eredményei pozitívák vagy negatívák, ami eltörli az eredmények bonyolult értelmezésének szükségességét. Ezenkívül a PCR-SSP tipizálási felbontása magasabb, mint más PCR-alapú tipizálási technikáké, mivel minden egyes primerpár két szekvencia-motívumot határoz meg, amelyek *ciszben*, azaz ugyanazon a kromoszómán helyezkednek el. Továbbá az SSP-reagensek szintetikus jellegének köszönhetően javult a stabilitás és csökkent a lotonkénti eltérés.

AZ ELJÁRÁS ELVE

A PCR-SSP módszertana azon az elven alapul, hogy a 3'-végnél illeszkedési hibával (mismatch) nem rendelkező, teljesen vagy majdnem teljesen illeszkedő oligonukleotid primerek hatékonyabban használhatók fel a PCR reakcióban, mint a hibásan illeszkedő primerek, a hibajavító (proofreading) tulajdonságok nélküli, hőstabil DNS-polimerázok által. A primerpárok a tipizálás felbontásának szükséges mértékétől függően egyetlen alléllal vagy allélcsoporttal/allélcsoportokkal való illesztésre is alkalmasak. Szigorúan szabályozott PCR feltételek mellett az illeszkedő vagy majdnem teljesen illeszkedő primerpárok lehetővé teszik az amplifikáció bekövetkezését (pozitív eredmény), míg a hibás illeszkedésű primerpárok nem teszik lehetővé az amplifikáció bekövetkezését (pl. negatív eredmény).

A PCR-eljárás után az amplifikált DNS-fragmentumokat méret szerint szétválasztják, pl. agarózgél-elektroforézissel, etídium-bromiddal történő festéssel és ultravioleta fénynek való kitettséggel láthatóvá teszik, fényképezéssel dokumentálják és értelmezik. A PCR-SSP eredmények értelmezése az adott PCR-termék(ek) jelenlétén vagy hiányán alapul. Az adott PCR-termék(ek) relatív mérete hasznos lehet az eredmények értelmezésében. A HLA PCR-SSP módszertanát eredetileg O. Olerup írta le 1991-ben és 1992-ben^{1,2}.

Mivel a PCR-folyamatot különböző tényezők (pl. pipettázási hibák, túl alacsony DNS-koncentráció, rossz minőségű DNS, PCR-inhibitorok jelenléte, a PCR készülék pontatlansága) kedvezőtlenül befolyásolhatják, minden PCR-reakcióban szerepel egy

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

belső pozitív kontroll primerpár². A belső pozitív kontroll primerpár megfelel a humán növekedési hormon gén konzervált régióinak, amelyek minden humán DNS-mintában jelen vannak. A HLA allél(ok) konkrét PCR-terméke jelenlétében a belső pozitív kontrollsáv terméke gyenge lehet vagy hiányozhat. A konkrét HLA primerpárok által generált amplikonok rövidebbek, mint a belső pozitív kontroll primerpár amplikonjai, de nagyobbak, mint a nem beépített primereké (lásd Várható értékek).

REAGENSEK

A. Azonosítás

Az Olerup SSP® tipizáló készletek tartalma: szárított, előre optimalizált szekvencia-specifikus primerek a HLA allélok és a humán növekedési hormon gén PCR-amplifikációjához, Taq polimeráz nélküli PCR mestermix („Master Mix“), és öntapadós PCR-fóliák.

A primeroldatokat előzetesen kialikvótáltak és megszáritották a méretre vágott, vékonyfalú PCR-tálcák 0,2 ml-es mélyedéseiben. A tálca minden egyes mélyedése szárított primeroldatot tartalmaz, amely egy specifikus primerkeverékből, azaz allél- és csoport-specifikus HLA primerekből, valamint egy belső pozitív kontroll primerpárból áll, amely nem allélikus szekvenciákra specifikus, és csak DNS-mintát, a mestermixet és vizet kell hozzáadni.

A primereket optimális PCR-amplifikációra tervezték a mestermix és az ajánlott DNS-ciklusprogram használata esetén (lásd a PCR készülék programozása).

Az egyes primerkeverékek által amplifikált specifikus HLA allélokra vonatkozó lot-specifikus Specifikussági és Interpretációs Táblázat vagy Munkalap (Specificity and Interpretation Tables or Worksheet) a www.caredx.com weboldalon található.

B. Figyelmeztetések és óvintézkedések

1. *In Vitro* diagnosztikai felhasználásra.
2. A termék nem szolgálhat kizárólagos alapul klinikai döntések meghozatalánál.
3. Biológiai veszélyekre vonatkozó figyelmeztetés: Minden vérkészítményt potenciálisan fertőzőként kell kezelni. Egyetlen ismert teszt módszer sem tud biztosítékot vállalni arra, hogy az emberi vérből nyert készítmények nem terjesztenek fertőző ágenseket.
4. Biológiai veszélyekre vonatkozó figyelmeztetés: Az agaróz gélelektroforézisben a DNS festésére használt etídium-bromid rákkeltő anyag. Kezelése során megfelelő egyéni védőfelszerelést kell viselni.
5. Vigyázat: Viseljen UV-blokkoló szemvédőt, és ne nézzen közvetlenül az UV-fényforrásba, amikor géleket vizsgál vagy fényképez.
6. A PCR **utáni** manipulációkhoz használatos pipetták és egyéb eszközök **nem** használhatók PCR **előtti** manipulációkhoz.
7. Részletes információkért lásd a Biztonsági adatlapot (www.caredx.com).

C. Használati utasítás

Lásd a Használati utasítást.

D. Tárolási utasítások

1590-LBL v02 Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

In Vitro *diagnosztikai* felhasználásra

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

A készlet összetevőit sötét helyen, a csomagolás címkéjén feltüntetett hőmérsékleten tárolja.

A készletet csak a címkére nyomtatott lejárati időn belül használja fel.

E: A használathoz szükséges tisztítás vagy kezelés

Lásd a Használati utasítást.

F. Instabilitás jelzések

1. Ne használjon olyan primertálcákat, amelyeknek a mélyedéseiben repedések vannak, vagy a mélyedések felső pereme sérült, mivel ez a PCR-amplifikáció során párolgást okozhat. Ne használjon repedezett PCR-fedőlapokat, mivel ez a PCR-amplifikáció során párolgást okozhat.
2. A mélyedésekben lévő szemcséknek piros színűnek kell lenniük. A szemcse sárga elszíneződése lebomlást jelezhet.
3. A mestermixnek piros vagy lila színűnek kell lennie. A sárga-narancssárga elszíneződés lebomlást jelezhet.

MŰSZER KÖVETELMÉNYEK**A. Műszer**

A következő minimális specifikációkkal rendelkező PCR készüléket kell használni:

- 104 °C hőmérsékletű fűtött fedél az olajmentes működéshez
- mintatömb (alumínium, ezüst vagy aranyozott ezüst) 96 mélyedéssel rendelkező PCR-lemezzel vagy 0,2 ml-es vékonyfalú reakciócsövekkel való használatra
- Az Olerup SSP-készleteket a következő PCR készülékeken validálták. Ajánlott felfutási sebességek:
 - GeneAmp 9700: GeneAmp 9700 PCR készülék 9600-as üzemmódba állítva. Ez megfelel a **minta felfutási sebességének** (1,6 °C/s fel és 0,8 °C/s le).
 - ProFlex 1x96 mélyedéses tömb: ProFlex PCR készülék 3,0 °C/s-os tömbfelfutási sebességgel (minden lépcsőfok 3,0 °C/s). A 3,0 °C/s **tömbfelfutási sebesség** megfelel az 1,52 °C/s fel és 1,36 °C/s le értékű mintafelfutási sebességnek.
 - ProFlex 2x96 mélyedéses tömb: ProFlex PCR készülék 3,0 °C/s-os tömbfelfutási sebességgel (minden lépcsőfok 3,0 °C/s). A 3,0 °C/s **tömbfelfutási sebesség** megfelel az 1,9 °C/s fel és 1,6 °C/s le értékű mintafelfutási sebességnek.

Megjegyzés: A fent leírtaknál nagyobb felfutási sebességek hatással lehetnek a tipizálás eredményeire. Felhívjuk figyelmét arra is, hogy a tipizálásra gyakorolt hatás a beállításoktól függően eltérő lehet a nem validált PCR készülékeknél.

- 4,0 °C és 99,9 °C közötti hőmérséklet-tartomány
- a hőmérséklet pontossága 35° C és 99,9° C között $\pm 0,25^\circ \text{C}$
- a mintatömb hőmérsékletének egyenletessége 55 °C és 95 °C között $\leq 0,75^\circ \text{C}$
- referenciaszabványra (pl. NIST) visszavezethető hőmérséklet-kalibrálás

Programozza be a PCR készüléket az alábbi B. szakaszban található PCR ciklusparaméterek segítségével.

A PCR készülék konkrét információit lásd a gyártó felhasználói kézikönyvében. A PCR készülékeket az ASHI (Amerikai Hisztokompatibilitási és Immunogenetikai Társaság) vagy az EFI (Európai Immunogenetikai Szövetség) akkreditációs szabályai szerint kell kalibrálni.

Programozza be a PCR készüléket az alábbiakban leírt használati utasítások követésének megkezdése előtt.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-típező készletek Taq polimeráz nélkül

B. PCR ciklizálási paraméterek

- | | | | | |
|----|------------------|---------|--------|--------------------------------|
| 1. | 1 ciklus | 94 °C | 2 perc | denaturáció |
| 2. | 10 ciklus | 94 °C | 10 mp. | denaturáció |
| | | 65 °C | 60 mp. | kapcsolódás és meghosszabbítás |
| 3. | 20 ciklus | 94 °C | 10 mp. | denaturáció |
| | | 61 °C | 50 mp. | kapcsolódás |
| | | 72 °C | 30 mp. | meghosszabbítás |
| 4. | Vége – várakozás | szobahő | | ha kevesebb, mint 8 óra |
| | | 4 °C | | ha hosszabb, mint 8 óra |

Teljes reakciótérfogat minden mélyedésben, 10 µl .

Ugyanazokat a PCR ciklusparamétereket kell használni az összes *Olerup SSP®* készlet esetében.

MINTAGYÚJTÁS ÉS -ELŐKÉSZÍTÉS

Az SSP tipizáláshoz kivont, kiváló tisztaságú DNS-re van szükség. A PCR-SSP HLA tipizáláshoz felhasználandó DNS-mintákat újra szuszpendálni kell H_2O -ban. Az $A_{260/280}$ arányának 1,6-2,0-nek kell lennie UV-spektrofotometria méréssel, hogy az elektroforézis során a sávok optimálisan láthatóvá váljanak.

Javasoljuk a QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System rendszerrel történő automatizált DNS-extrakciót. Kiindulási anyagként ADC vért kell használni.

Alternatív megoldásként a DNS bármely előnyben részesített, tiszta DNS-t eredményező módszerrel extrahálható. Alternatív módszerek alkalmazása esetén a DNS-koncentrációt 30 ng/ μl -re kell beállítani. **Ne használjon heparinizált vért ezekkel a módszerekkel.**

Ajánlott DNS-koncentráció:

EZ1-extrakciós DNS, 15 ng/ μl .

Más módszerekkel kivont DNS, 30 ng/ μl .

Az 50 ng/ μl feletti koncentráció növeli a nem specifikus amplifikációk és a gyenge extra sávok kockázatát, különösen a HLA I. osztályú, nagy felbontású SSP tipizálások esetében. Szükség esetén hígítsa fel a kivont DNS-t dH_2O -ban.

A DNS-mintákat nem szabad újra szuszpendálni 0,5 mM feletti koncentrációjú kelátképző anyagokat, például EDTA-t tartalmazó oldatokban.

A DNS-minták az extrakció után azonnal felhasználhatók, vagy maximum 2 hétig 4 °C-os hőmérsékleten eltárolhatók anélkül, hogy az kedvezőtlenül befolyásolná az eredményeket. A DNS-minták 9 hónapig tárolhatók -20 °C-os vagy alacsonyabb hőmérsékleten. A hosszabb ideig tárolt, kivont DNS-minták tisztaságának és koncentrációjának elfogadhatóságát a HLA-tipizálás előtt ellenőrizni kell.

A DNS-mintákat +4 °C-on vagy hidegebb hőmérsékleten kell szállítani, hogy megőrizze integritásukat szállítás közben.

ELJÁRÁS**A. A készletben található anyagok**

1. Olerup SSP® primer tálcák.
2. Mestermix Taq polimeráz nélkül (a készlet tálcáinak megfelelő térfogat). Ugyanaz a mestermix használható minden Olerup SSP® készlethez.
3. Öntapadós PCR tömítések (a készlet tálcáinak megfelelő számú).

B. A készletben nem található, de szükséges anyagok

1. DNS izoláló készlet/berendezés
2. UV spektrofotométer
3. Pipettázó eszközök. Javasoljuk az elektronikus egycsatornás adagolót, amely képes 10 µl-es alikvotok adagolására a DNS-Master Mix-DH₂O keverék tálcamélyedésekhez való hozzáadásához.
4. Eldobható pipettahegyek
5. Polipropilén csövek
6. Vortex-keverő
7. Mikrocentrifuga
8. PCR tálcataartó
9. PCR készülék fűtött fedéllel 96 mélyedéses PCR-hez, ≤ 0,75 °C hőmérséklet-gradiens a fűtőtömbben és tálca/tároló a 0,2 ml-es vékonyfalú reakciómélyedésekhez
10. Mikrohullámú sütő vagy főzőlap az agarózoldatok melegítéséhez
11. Elektroforézis minőségű agaróz, pl. FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE puffer; 1 x TBE puffer 89 mM trisz-borát, 2 mM dinátrium EDTA, pH 8,0
13. Etídium-bromid cseppentő palack termékszám: 103.301-10 vagy GelRed cseppentő palack termékszám: 103.302-05
14. Gélbetöltő pipettázó eszköz. 8 csatornás pipettát ajánlunk a gélbetöltéshez, 5-25 µl állítható térfogattal
15. DNS méretjelző az 50-1000 bp tartomány lefedésére, pl. 100 bázispár létra, DNS méretjelző (termékszám: 103.202-100) vagy DNS méretjelző rövid gélfuttatásokhoz (103.203-100)
16. Elektroforézis-készülék/tápegység
17. UV átvilágító
18. Fotográfiai vagy képi dokumentációs rendszer
19. Roche Taq DNS-polimeráz, GMP-minőség. [Katalógusszám: # 03 734 927 001 (1000 U) vagy # 03 734 935 001 (5000 U)].

C. Lépésről lépésre

Lásd a Használati utasítást.

HASZNÁLATI UTASÍTÁS**A. A minta előkészítése**

1. Tisztítsa meg a genomi DNS-t a leukocita-mintából a választott módszerrel, lásd fentebb a mintagyűjtést és előkészítést.
2. A minta előkészítésével és tárolásával kapcsolatos konkrét információkért lásd fentebb a mintagyűjtést és előkészítést.
3. Végezze el a PCR amplifikációt tisztított DNS-mintán *Olerup SSP®* tipizáló tálcával, vagy tárolja a DNS-mintát, amíg készen áll a tipizálásra.

B. Reagens/berendezés előkészítése

1. Programozzon be egy PCR készüléket az *Olerup SSP®* PCR program futtatásához, lásd a fenti műszerkövetelmények – PCR készülékparaméterek című részt.
2. Legyen elérhető *Taq* polimeráz (5 egység/μl), tárolja -20 °C-on.
3. Készítse elő a gélt az elektroforézishez, lásd alább a C. szakasz – **Gél elektroforézis előkészítése** című részt.

C. Gél elektroforézis előkészítése

Olerup SSP® Gel System 96 termékhez (termékszám: 103.101-01)

1. Beállítás

- Egyenlítse ki az öntőkamrát 1 gélhez (termékszám: 103.101-31) vagy a 3 gélhez (termékszám: 103.101-33) a kiegyenlítő buborék és a három állítható magasságú láb segítségével.
- Helyezze a géltálcát/géltálcákat az öntőkamrába.

2. 2% (w/v) agaróz gél előkészítése

Használjon kiváló minőségű, elektroforézishez alkalmas agarózt, amely képes 50-2 000 bázispárnnyi DNS-fragmentum feloldására.

- Adjon 5 ml 10 x TBE (trisz-borát EDTA) pufferhez 150 ml desztillált vizet és 2 g agarózt egy 500 ml-es üvegpalackban.
- Az agarózt mikrohullámú sütőben melegítve oldja fel, amíg 100 ml-es homogén oldat keletkezik.
- Hagyja a feloldott géloldatot 60 °C-ra lehűlni, pl. melegítőszekrényben.
- Az öntés előtt fesse meg a gélt etidium-bromiddal (10 mg/ml), 5 μl-enként 100 ml-es géloldattal. A lehető legkönnyebb kezelhetőség érdekében használja etidium-bromid cseppentő palackjainkat (termékszám: 103.301-10). **Megjegyzés: Az etidium-bromid rákkeltő anyag. Kezelése során megfelelő egyéni védőfelszerelést kell viselni.**
- Öntsön 100 ml géloldatot az öntőkamrában lévő géltálcába. Helyezzen 6 gélfésűt (termékszám: 103.101-21) a géltálcá nyílásaiba.
- Hagyja a gélt 15 percig állni.
- Öntsön 750 ml 0,5 x TBE puffert a géltartályba. Merítse a géltálcát a géldobozba, és óvatosan emelje ki belőle a 6 gélfésűt.

Alternatív elektroforézis rendszerek használata esetén kövesse a gyártó használati utasításait. Az *Olerup SSP®* HLA tipizáló készletekkel való használathoz ezeknek a rendszereknek képesnek kell lenniük 50 és 1100 bázispár közötti méretű PCR-termékek megjelenítésére.

D. Lépcsőzetes eljárás

1. Vegye ki a megadott tárolási hőmérséklet(ek)ről: a megfelelő számú DNS-mintát, a primer tálcát/tálcákat és a kiválasztott DNS-mintához/primer tálcához szükséges mennyiségű mestermixet és Taq polimerázt (5 egység/μl). Olvassza fel szobahőmérsékleten (20-25 °C)

Ugyanaz a mestermix használható minden Olerup SSP® készlethez.

2. Rövid ideig keverje össze a DNS-mintát/mintákat vortexeléssel.
3. Helyezze a primertálcát/tálcákat egy PCR-tálcátartóra.
4. **Kis és nagy felbontású készletek**
 - Az alikvotokra osztás előtt vortexelje a mestermixet.
 - Kézi egycsatornás pipettával adagolja szobahőmérsékleten a mestermixet, a Taq polimerázt (5 egység/μl) és a dH₂O-t egy 2 ml-es vagy 0,5 ml-es kémcsőbe. (A megfelelő mennyiségeket lásd az alábbi 1. táblázatban.)
 - Zárja le a kémcsövet és vortexelje 5 másodpercig. Centrifugálja le a kémcsövet rövid ideig (pulse spin) mikrocentrifugában, hogy az összes folyadék lefolyjon a kémcső oldaláról.
 - Kézi egycsatornás pipettával adjon 8 μl mestermix – dH₂O keveréket és 2 μl dH₂O-t a primer-tálca negatív kontrollmélyedésébe, azaz a negatív kontroll primerpárokat tartalmazó mélyedésbe.
 - Kézi egycsatornás pipettával szobahőmérsékleten adja hozzá a DNS-mintát a maradék mestermix – dH₂O keverékhez. (A megfelelő mennyiségeket lásd az alábbi 1. táblázatban.)
 - Zárja le a kémcsövet és vortexelje 5 másodpercig. Centrifugálja le a kémcsövet rövid ideig (pulse spin) mikrocentrifugában, hogy az összes folyadék lefolyjon a kémcső oldaláról.
 - Egy elektronikus egycsatornás adagoló segítségével alikvotáljon 10 μl mintareakció-keveréket a primer-tálca minden egyes mélyedésébe, kivéve a negatív kontroll mélyedést.

1. táblázat: A vizsgálathoz szükséges komponensek térfogata a különböző számú mélyedésekhez, Taq polimeráz nélküli mestermix használata esetén.

A mélyedések száma vizsgálatonként	A mestermix térfogata (µl)	A DNS-minta térfogata (µl)	A dH ₂ O térfogata (µl)	A Taq polimeráz térfogata (µl)	A mélyedések száma vizsgálatonként	A mestermix térfogata (µl)	A DNS-minta térfogata (µl)	A dH ₂ O térfogata (µl)	A Taq polimeráz térfogata (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

A fent felsorolt ajánlott térfogatok tartalmazzák a pipetták eltéréseit és a kémcsövek belső falán fellépő folyadékvesztést kompenzáló térfogatokat.

5. A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ és DQA-DQB-DR Enhanced kombinált készletek, valamint a nagy felbontású, gyakori allélokhoz való HLA-C készlet

- A mestermix vortexelése.
- Kézi egycsatornás pipettával, szobahőmérsékleten adjon 8,3 µl Taq polimerázt (5 egység/µl) és 511,7 µl dH₂O-t a 312 µl mestermixet tartalmazó 1,5 ml-es kémcsőhöz.
- Zárja le a kémcsövet és vortexelje 5 másodpercig. Centrifugálja le a kémcsövet rövid ideig (pulse spin) mikrocentrifugában, hogy az összes folyadék lefolyjon a kémcső oldaláról.
- Kézi egycsatornás pipettával adjon 8 µl mestermix – Taq polimeráz – dH₂O keveréket és 2 µl dH₂O-t a primer-tálca 96. számú negatív kontrollmélyedésébe, azaz a negatív kontroll primerpárokat tartalmazó mélyedésbe.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

- Kézi egycsatornás pipettával szobahőmérsékleten adjon hozzá 206 µ DNS-mintát a maradék mestermix – Taq polimeráz – dH₂O keverékhez.
- Zárja le a kémcsövet és vortexelje 5 másodpercig. Centrifugálja le a kémcsövet rövid ideig (pulse spin), hogy az összes folyadék lefolyjon a kémcső oldaláról.
- Egy elektronikus egycsatornás adagoló segítségével alikvotáljon 10 µl mintareakció-keveréket a primer-tálca minden egyes mélyedésébe, kivéve a 96. számú negatív kontroll mélyedést.

Fontos:

Ügyeljen arra, hogy a mintát a primerek fölé vigye fel (ugyanis a szárított primerek a tálca minden mélyedésének alján vannak), hogy elkerülje a mélyedések közötti keresztszennyeződést. Érintse meg a pipetta hegyével a mélyedés belső falát, hogy a minta lecsússzon a mélyedés aljára. Ellenőrizze, hogy minden minta lecsúszott-e az egyes mélyedések aljára. Ha nem, óvatosan kocogtassa a tálcát az asztallaphoz, hogy a PCR megkezdése előtt minden minta leülepedjen a mélyedés alján.

5. Fedje le a primer tálcát/tálcákat a mellékelt öntapadó PCR-fóliákkal. A PCR-amplifikáció során a párolgási veszteség elkerülése érdekében ellenőrizze, hogy minden reakciómélyedés teljesen le van-e fedve. Az Olerup SSP® kompressziós betét (termékszám: 103.505-06) a öntapadós PCR-fóliák tetejére helyezhető, hogy megakadályozza a párolgást a ciklizálás során.
6. Helyezze a primer tálcát/tálcákat a PCR készülékbe egy megfelelő kémcső-tálca adapterrel. Ne hagyjon 5 percnél hosszabb késleltetést a PCR beállítása és a ciklizálás között.
7. Adja meg az Olerup SSP® programszámát. Adjon meg 10 µl-es reakciótérfogatot.
8. Indítsa el a PCR programot. A program körülbelül 1 órát és 20 percet vesz igénybe.
9. Távolítsa el a primer tálcát/tálcákat a PCR készülékből. Ellenőrizze a PCR-tálcát és győződjön meg arról, hogy minden PCR-mélyedésben megközelítőleg azonos mennyiségű folyadék van-e. Végezzen elektroforézist a mintákon az alábbi E – Gél elektroforézis című szakasz szerint. Értelmezze a tipizálási eredményeket a **lot-specifikus értelmezési és sajátossági táblázatokkal** vagy munkalapokkal, lásd alább a Várható értékeket.

E. Gél elektroforézis

1. A PCR-reakció befejezése után tájolja a primer tálcát és a géldobozt. A mélyedések sorrendje: balról jobbra és fentről lefelé.
2. Óvatosan távolítsa el a fedőlapokat anélkül, hogy a PCR-termékek kifröccsenének.
3. Töltse a PCR-termékeket egymás után a 2 %-os agarózgélre. (Gélbetöltő puffer hozzáadása nem szükséges.) Ajánlott egy 8 csatornás pipetta használata a gélbetöltéshez.
4. Töltsön be egy DNS méretjelzőt (100 bázispáros létra, 103.202-100 számú DNS méretjelző termék vagy 103.203-100 számú DNS méretjelző rövid gélfuttatásokhoz) soronként egy mélyedésbe.
5. Fedje le a géldobozt a fedelével.
6. Elektroforizálja a gél 0,5 x TBE pufferben, a puffer újbóli keringetése nélkül, 15-20 percig 8-10 V/cm-en.
7. Helyezze át a géltálcát a géllal egy UV átvilágítóba.
8. Fényképezze le a gél a géltálcával vagy anélkül.
9. Jelölje meg a fényképet a laboratórium szabályai szerint.

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS

Az ASHI HLA-vizsgálati irányelvei szerint minden PCR-beállításnak tartalmaznia kell egy negatív (kontaminációs) kontroll mélyedést. (Az akkreditált laboratóriumokra vonatkozó végeleges felülvizsgált szabványok, Amerikai hisztokompatibilitási és immunogenetikai társaság, jóváhagyva a CMS által: 2021. február 16.). A negatív kontroll mélyedés minden készletben megtalálható, kivéve a HLA-B*27 – egységet és a HLA-B* 27 egymélyedéssel készleteket.

Lásd a Gél értelmezése című részt a 14. oldalon.

EREDMÉNYEK

A lot-specifikus Sejtvonala-hitelesítési Lapok és az Analitikai Tanúsítványok (Cell Line Validation Sheets and Certificate of Analysis) online elérhetők a www.caredx.com weboldalon.

AZ ELJÁRÁSRA VONATKOZÓ KORLÁTOZÁSOK

1. A PCR-SSP folyamat szigorúan ellenőrzött vizsgálati feltételeket igényel a megfelelő diszkriminatív amplifikáció biztosítása érdekében. Minden esetben a használati utasításban ismertetett eljárást kell követni.
2. A kivont DNS-minta az adott PCR-amplifikációs folyamat sablonja. A tisztított DNS-nek 1,6 és 2,0 közötti $A_{260/280}$ aránnyal kell rendelkeznie ahhoz, hogy a sávok optimálisan láthatóvá váljanak elektroforézissel.
3. Valamennyi műszert, pl. PCR készüléket, pipettázó berendezést a gyártó ajánlásainak megfelelően kell kalibrálni.
4. Lot-specifikus információk és a lot-specifikus munkalap: Lot-specifikus információk és a lot-specifikus munkalap.
5. Az elvégzett vizsgálatok alapján a következő anyagokat három (3) extrakciós módszerrel értékelték a felsorolt koncentrációkban, és megállapították, hogy azok nem befolyásolják a vizsgálati teljesítményt.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-típezáló készletek Taq polimeráz nélkül

Extrakciós módszer	Interferáló anyag	Interferens koncentrációja*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubin	200 mg/l
	Hemoglobin	200 g/l
	Triglicerid	30 g/l
	Fehérje	110 g/l
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubin	200 mg/l
	Hemoglobin	200 g/l
	Triglicerid	18,2 g/l
	Fehérje	77-96 g/l
Gentra PureGene módszer	Bilirubin	200 mg/l
	Hemoglobin	200 g/l
	Triglicerid	18,2 g/l
	Fehérje	119-146 g/l

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

6. A PCR-lemezek fizikailag kompatibilisek a forgalomban lévő PCR készülékek többségével. Lásd alább a PCR készülékek műanyag-kompatibilitási táblázatát.

Megjegyzés: A táblázat csak tájékoztató jellegű. Validált PCR készülékek esetében kérjük, olvassa el a Műszerkövetelmények – Műszer részt.

Kompatibilitási táblázat	
Gyártó	PCR készülék
Applied Biosystems	GeneAmp 9700
	ProFlex 96-well
	ProFlex 2x96-well
	Veriti 0.2ml 96-well Block
Agilent (Stratagene)	GeneAmp 2700, 2720, 9600
	SureCycler 8800
	RoboCycler
Biometra	Gradient Cycler
	Uno, Uno II
	T1 Thermocycler
Bio-Rad	TGradient/TAdvanced
	TRobot
	TProfessional
	MJ Mini
	T100
	iCycler, MyCycler
Eppendorf	C1000, S1000
	PTC-2(xx)
	PTC-100 with 96-well block
	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. A készlet teljesítményét a Taq polimeráz nélküli mestermix használatával csak a GMP minőségű Roche Taq DNS-polimerázzal (katalógusszám: 03 734 927 001 vagy 03 734 935 001) validálták. Az egyéb enzimekkel végzett vizsgálatok teljesítménye nem ismert, azt a felhasználónak kell megállapítania és validálnia.

VÁRHATÓ ÉRTÉKEK**A. Adatok elemzése**

Gondosan vizsgálja meg a gélfotót, és határozza meg a pozitív sávokat.

1. Egy gélcsávban gyorsabban terjedő, rövidebb sáv látható, ha specifikus HLA allélok amplifikálódtak. Ez pozitív vizsgálati eredményt jelez.
 - a. Jegyezze fel a konkrét PCR-termékek jelenlétét és hiányát.
 - b. A géleredmények értelmezésekor hasznos figyelemmel kísérni az egyes PCR-termékek relatív hosszát a lot-specifikus terméktájékoztatókban megadottak szerint. Több sávban két vagy több lehetséges hosszúságú konkrét PCR-termék található. Ezek a mélyedések több primerpárt tartalmaznak, amelyek a minta DNS-ének HLA alléljaitól függően különböző méretű PCR-termékeket hoznak létre.
 - c. A gélcsávok mintázatát a konkrét PCR-termékekkel és a lot-specifikus értelmezési és sajátossági táblázatokban szereplő információkkal kell összevetni a minta DNS-ének HLA-típusának meghatározásához.
2. A sikeres amplifikáció ellenőrzésére a sikeres amplifikáció kontrolljaként a negatív kontroll gélcsáv kivételével minden gélcsávban láthatónak kell lennie egy belső pozitív kontrollcsávnak, amely hosszabb és lassabban terjed. Előfordulhat, hogy a belső pozitív kontrollcsáv a pozitív gélcsávokban halvány vagy nincs jelen.
 - a. Jegyezze fel a belső pozitív kontrollcsávok jelenlétét és relatív hosszát. A különböző méretű kontrollcsávok segítenek a helyes tájolásban, valamint a készlet azonosításában.
 - b. A belső pozitív kontrollcsáv hiánya konkrét PCR-termék nélkül sikertelen PCR-reakciót jelez.
 - i. Ha a HLA allélok a sikertelen PCR-reakciók jelenlétében is meghatározhatók, és a sikertelen PCR-reakciók nem változtatják meg az allél hozzárendelést, akkor a vizsgálatot nem kell megismételni.
 - ii. Ha azonban a sikertelen PCR-reakciók megváltoztathatják a HLA-allél hozzárendelést, akkor a tipizálást meg kell ismételni.
3. A konkrét PCR-termék vagy belső pozitív kontrollcsáv jelenléte a negatív kontrollcsáv(ok)ban PCR-termék(ek) általi szennyeződést jelez, és minden vizsgálati eredményt érvénytelenít. A negatív kontrollcsáv(ok)ban 40-60 bázispár méretű primer oligomerek figyelhetők meg. Ez nem jelent szennyeződést.

B. Gél értelmezése

	Pozitív reakció	Negatív reakció	Sikertelen PCR-reakció
Mélyedés			
Belső pozitív kontrollsáv			
Specifikus sáv			
Primer sáv			

1. A DNS-méretjelzőt (100 bázispár létra, 103.202-100 számú DNS méretjelző termék vagy 103.203-100 számú DNS méretjelző rövid gélfuttatásokhoz) soronként egy mélyedésben vagy a helyi laboratóriumi akkreditációs irányelveknek megfelelően kell lefuttatni.
2. Előfordulhat, hogy a belső pozitív kontrollsávnál hosszabb sávokat kapunk, és ezeket figyelmen kívül kell hagyni a tipizálási eredmények értelmezésénél.
3. A fel nem használt primerek 50 bázispárhosszon sávot alkotnak.
4. Primer oligomer műtermékek lehetnek jelen. Ezek hosszabbak, mint a primer sáv, de rövidebbek, mint a specifikus sávok.

SPECIFIKUS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

A készlet lot minőségének ellenőrzése

Minden egyes primeroldatot az IHWC jól karakterizált sejtvonalakból származó 48 DNS-mintából álló panelen teszteltek, lásd a lot-specifikus Sejtvonal-validálási Lapot/Lapokat (Cell Line Validation Sheet(s)) a Terméktájékoztatóban (Product Insert), a lot-specifikus információk között.

A technikák összehasonlítása

Vizsgálatot végeztek az Olerup SSP® HLA tipizáló készletek összehasonlítására Taq polimerázt tartalmazó és nem tartalmazó PCR mestermixszel. A vizsgálat célja annak bizonyítása volt, hogy a manuális hozzáadás nem befolyásolja a vizsgálati eredményeket, és hogy a különböző Taq polimeráz lotok azonos eredményeket adnak. A vizsgálatban 15 ismert HLA genotípussal rendelkező, a Nemzetközi Hisztokompatibilitási Műhely gyűjteményéből származó DNS-minta HLA-A, -B (I. osztály) és -DRB (II. osztály) alacsony felbontású tipizálását végezték el. A mintákat a vizsgálatot végzőktől eltérő személyzet készítette elő és kódolta; a vizsgálatot végző személyzet nem ismerte a minták HLA-típusait. Minden mintát párhuzamosan

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

teszteltek az Olerup SSP® HLA-A-B-DR kombinált tálcával és a Taq polimeráz nélküli PCR mestermixszel („Teszt“), valamint az Olerup SSP® HLA-A-B-DR kombinált tálcával és a Taq polimerázt tartalmazó PCR mestermixszel („Kontroll“), az egyes vizsgálatok terméktájékoztatóinak utasításai szerint. Minden vizsgálatot az CareDx AB laboratóriumában végeztek Stockholmban, Svédországban, egy készlet és két Taq polimeráz lot felhasználásával. A vizsgálatban a GMP minőségű Roche Taq DNS-polimerázt használták. Az egyes minták vizsgálata az Olerup SSP® HLA-A-B-DR kombinált tálcával végzett alacsony felbontású tipizálásból állt: 1) PCR mestermix Taq polimerázzal (FDA által jóváhagyott vizsgálat) (kontroll vizsgálat), 2) PCR mestermix plusz Roche Taq DNS polimeráz, GMP minőségű termék, 5 U/μl; lot #1 (Teszt lot #1), és 3) PCR mestermix plusz Roche Taq DNS polimeráz, GMP minőségű termék, 5 U/μl; lot #2 (Teszt lot #2). A PCR után a detektálást gél elektroforézissel végezték. Az eredmények összefoglalása az alábbiakban található.

Összehasonlítás	Egyezés			
	I. osztály tipizálási eredményei (# egyezés/összesen)		II. osztály tipizálási eredményei (# egyezés/összesen)	% -os egyezés (95%-os konfidencia-intervallum ^a)
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
1. teszt lot / Kontroll lot	15/15	15/15	15/15	100% (84,7-100,0%)
1. teszt lot / konszenzus ^b	15/15	15/15	15/15	100% (84,7-100,0%)
2. teszt lot / Kontroll lot	15/15	15/15	15/15	100% (84,7-100,0%)
2. teszt lot / konszenzus	15/15	15/15	15/15	100% (84,7-100,0%)
1. teszt lot / 2. teszt lot	15/15	15/15	15/15	100% (84,7-100,0%)

^a Pontszám módszer

^b Konszenzusos eredmény a Nemzetközi Hisztokompatibilitási Műhely gyűjteményéből

BIBLIOGRÁFIA

- 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.
- A jelenlegi HLA allélok a <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla> címen található

HIBAELHÁRÍTÁS

Probléma	Ok	Megoldás
Nem történik amplifikáció (sem a belső kontroll fragmentumok amplifikációja, sem specifikus amplifikációk).	Túl kevés DNS.	Mérje meg a DNS-koncentrációt, és ellenőrizze, hogy a hozzáadott mennyiség helyes-e. Az RNS-szennyeződés a DNS-koncentráció spektrofotometriás túlbecslését okozhatja. Ismétlje meg gondosan a DNS-extrakciót frissen készített oldatokkal. Javasoljuk a QIAGEN EZ1 DSP DNS-vérvételi rendszerrel történő automatizált DNS-extrakciót.
	A DNS PCR-inhibitorokat tartalmaz, pl. fehérjéket, etanolt (a kicsapási lépésekből), a szilárd fázisú DNS-tisztítási termékekből visszamaradt mátrixokat.	Mérje meg a DNS minőségét. Javasoljuk, hogy az A260/A280 arány 1,6-2,0 legyen UV-spektrofotometriával. Kövesse pontosan a forgalmazó DNS-extrakciós protokollját. Végezze el újra a DNS-extrakciót. Javasoljuk a QIAGEN EZ1 DSP DNS-vérvételi rendszerrel történő automatizált DNS-extrakciót.
	A DNS-t heparinizált vérből nyerték ki.	Használjon nem heparinizált vért, vagy alkalmazzon heparinizált vérhez való DNS-extrakciós protokollokat.
	A DNS-t EDTA-t tartalmazó pufferben oldották fel.	Ismétlje meg a DNS-extrakciót, és dH ₂ O-ban oldja fel a DNS-t.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-típező készletek Taq polimeráz nélkül

Probléma	Ok	Megoldás
Folytatás: Nem történik amplifikáció (sem a belső kontroll fragmentumok amplifikációja, sem specifikus amplifikációk).	Véletlenül Na-hipoklorit került a vizsgálatba.	Ellenőrizze azokat a területeket, ahová esetleg Na-hipoklorit kerülhet.
	A készleteket nem tárolják megfelelő hőmérsékleten.	A készleteket -20° C-on tárolja.
	A PCR készülék nem működik a megfelelő módon.	Kalibrálja a PCR készüléket és ellenőrizze a PCR programot. A rutinszerű PCR-SSP típezéshez használt PCR készüléket 6-12 havonta kalibrálni kell.
	Nem megfelelő érintkezés a PCR készülék fűtőtömbje és az SSP típező tálca között.	Használjon megfelelő tálcát/tartót a 0,2 ml-es vékonyfalú reakciómélyedésekhez a PCR készülék kézikönyve alapján.
Véletlenszerű hiba az amplifikáció során (kiesések).	A nem elég szorosan lezárt PCR fóliák/PCR kémcsőkupakok párolgáshoz és azt követően amplifikációs hibához vezetnek.	Győződjön meg arról, hogy a PCR fóliák/kupakok szorosan zárva vannak. Az <i>Olerup SSP®</i> kompressziós betét (termékszám: 103.505-06) az öntapadó PCR-fóliák tetejére helyezhető, hogy megakadályozza a párolgást a ciklizálás során.
	Gélbetöltési hibák.	Ellenőrizze, hogy a megfelelő számú mélyedést töltötte-e be, és hogy minden egyes mélyedés körülbelül azonos mennyiségű PCR-keveréket tartalmaz-e.
	Nem kalibrált pipetták használata.	Rutinszerűen kalibrálja az összes pipettát a forgalmazó ajánlásainak megfelelően.
	Pipettázási hibák.	Végezze óvatosabban a pipettázást.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-típező készletek Taq polimeráz nélkül

Probléma	Ok	Megoldás
Folytatás: Véletlenszerű hiba az amplifikáció során (kiesések).	A mestermixet és a DNS-mintát használat előtt nem keverték össze megfelelően.	Használat előtt rövid ideig vortexelje át. Javasoljuk, hogy minden sor után végezzen vortexelést.
	A lyukakba egyenlőtlen mennyiség került a DNS és a mestermix elegyből.	Végezze óvatosabban a pipettázást.
Gyenge belső kontrollfragmentumok	Nem tiszta DNS.	Mérje meg a DNS minőségét. Az A260/A280 aránynak UV-spektrofotometriánál 1,6-2,0-nek kell lennie. Az RNS-szennyeződés a DNS-koncentráció spektrofotometriás túlbecslését okozhatja. A degradálódott DNS kenetet eredményez a gélsávokban. Ismétlje meg gondosan a DNS-extrakciót frissen készített oldatokkal. Javasoljuk a QIAGEN EZ1 DSP DNS-vérvételi rendszerrel történő automatizált DNS-extrakciót.
	Túl kevés DNS.	Mérje meg a DNS-koncentrációt, és állítsa be 30 ng/μl-re vagy 15 ng/μl-re a QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System segítségével extrahált DNS esetében. Az RNS-szennyeződés a DNS-koncentráció spektrofotometriás túlbecslését okozhatja. A degradálódott DNS kenetet eredményez a gélsávokban. Ismétlje meg gondosan a DNS-extrakciót frissen készített oldatokkal.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

Probléma	Ok	Megoldás
Folytatás: Gyenge belső kontrollfragmentumok		Javasoljuk a QIAGEN EZ1 DSP DNS-vérvételi rendszerrel történő automatizált DNS-extrakciót.
	Túl magas hőkezelési hőmérséklet, a PCR készülék nincs kalibrálva.	Kalibrálja a PCR készüléket és ellenőrizze a PCR programot. A rutinszerű PCR-SSP tipizáláshoz használt PCR készüléket 6-12 havonta kalibrálni kell.
	A PCR mestermixet 2 hétnél hosszabb ideig tárolták +4 °C-on.	Tárolja megfelelő körülmények között a PCR mestermixet.
Nem specifikus amplifikáció (létrák vagy kenetek).	Túl sok DNS-minta használata.	Mérje meg a DNS-koncentrációt, és állítsa be 30 ng/μl-re vagy 15 ng/μl-re a QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System segítségével extrahált DNS esetében. Egyes primer oldatok nagyobb tendenciát mutatnak a nem specifikus amplifikáció előidézésére, lásd a lábjegyzeteket az egyes lot-specifikus sajátossági táblázatokban.
	Nem tiszta DNS.	A kapott eredmények értelmezésekor a belső kontrollfragmentumnál nagyobb fragmentumokat figyelmen kívül kell hagyni. Ellenőrizze a DNS minőségét. Ismétlje meg a DNS-extrakciót. Javasoljuk a QIAGEN EZ1 DSP DNS-vérvételi rendszerrel történő automatizált DNS-extrakciót.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

Probléma	Ok	Megoldás
Folytatás: Nem specifikus amplifikáció (létrák vagy kenetek).		Egyes primer oldatok nagyobb tendenciát mutatnak a nem specifikus amplifikáció előidézésére, lásd a lábjegyzeteket az egyes lot-specifikus sajátossági táblázatokban.
Idővel gyengülő amplifikációs jelek.	Az etídium-bromid agarózgél festőoldat régi.	Készítsen friss etídium-bromid oldatot az agarózgél jobb festése és a jobb jel elérése érdekében. A primerfelhők könnyen kimutathatók, ha az agarózgél festése normális.
	Az egyik UV lámpa meghibásodott.	Ellenőrizze az UV-fény berendezést. A primerfelhők könnyen kimutathatók, ha az UV-fény normális.
	Túl keveset használtak a DNS mintából.	Mérje meg a DNS-koncentrációt, és állítsa be 30 ng/μl-re vagy 15 ng/μl-re a QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System segítségével extrahált DNS esetében.
	Túl magas hőkezelési hőmérséklet, a PCR készülék nincs kalibrálva.	Kalibrálja a PCR készüléket és ellenőrizze a PCR programot. A rutinszerű PCR-SSP tipizáláshoz használt PCR készüléket 6-12 havonta kalibrálni kell.
Furcsa amplifikációs minták.	Helytelen lot-specifikus értelmezési táblázat/munkalap került használatra.	Ellenőrizze a felhasznált termék lot-számát és a használt értelmezési táblázatot/munkalapot.
	Helytelen sorrend a gél betöltésekor.	Ellenőrizze a keverékek és a gélcsívek igazodását.
	Az amplifikációs minta hamis pozitív értéket tartalmaz.	Lásd alább.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

Probléma	Ok	Megoldás
Folytatás: Furcsa amplifikációs minták.	Az amplifikációs minta hamis negatív értéket tartalmaz.	Lásd alább.
Hamis pozitív amplifikációk.	DNS-szennyeződés.	Használjon kesztyűt, gátakat (szűrődugókat) tartalmazó pipettahegyeket és külön helyiségeket a PCR előtti és utáni kezeléshez. Biztosítsa az összes minta pontos kezelését, minden lépésben. Ellenőrizze a szennyeződéseket az Olerup SSP® Törléstezt-készlet segítségével.
	Nem tiszta DNS.	Mérje meg a DNS-minőséget. Kövesse pontosan a forgalmazó DNS-extrakciós protokollját. Próbáljon ki más DNS-extrakciós rendszert. Végezze el újra a DNS-extrakciót. Javasoljuk a QIAGEN EZ1 DSP DNS-vérvételi rendszerrel történő automatizált DNS-extrakciót.
	Túl sok DNS-minta használata.	Mérje meg a DNS-koncentrációt, és állítsa be 30 ng/μl-re vagy 15 ng/μl-re a QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System segítségével extrahált DNS esetében.
	Túl alacsony hőkezelési hőmérséklet.	Kalibrálja a PCR készüléket és ellenőrizze a PCR programot. A rutinszerű PCR-SSP tipizáláshoz használt PCR készüléket 6-12 havonta kalibrálni kell.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-tipizáló készletek Taq polimeráz nélkül

Probléma	Ok	Megoldás
Folytatás: Hamis pozitív amplifikációk.	Jelentős késleltetés a PCR beállítása és a ciklizálás megkezdése között.	A ciklizálás előtt legfeljebb 5 perces késleltetés megengedett.
	Késleltetés a tipizáló tálcák PCR készülékbe való helyezése és a ciklizálás megkezdése között.	Használjon előmelegített PCR készüléket.
	Túl sok etídium-bromid használata.	Használjon ajánlott mennyiségű etídium-bromidot.
	Egy műtermék téves értelmezése egy konkrét sávként.	A helyes sávméretet és a lábjegyzeteket ellenőrizze a lot-specifikus értelmezési táblázatban / munkalapon és a sajátossági táblázatban.
	Az amplifikációs minta hamis pozitív értéket tartalmaz.	Ellenőrizze, hogy az összes konkrét amplifikáció megfelelő méretű-e, vagy egy műterméket (átvitel, primer dimer) tévesen amplifikációként értelmeztek.
	Helytelen sorrend a gél betöltésekor.	Ellenőrizze a keverékek és a gélcsatornák igazodását.
Hamis negatív amplifikációk.	A PCR készülék nincs megfelelően kalibrálva.	Kalibrálja a PCR készüléket és ellenőrizze a PCR programot. A rutinszerű PCR-SSP tipizáláshoz használt PCR készüléket 6-12 havonta kalibrálni kell. Ha újrakalibrálással nem korrigálható, akkor azonos specificitású referenciamintával ismétlje meg a tesztet. Ha negatív eredményt kap, lépjen kapcsolatba az ügyfélszolgálattal.
	Helytelen sorrend a gél betöltésekor.	Ellenőrizze a keverékek és a gélcsatornák igazodását.

Használati utasítás
Olerup SSP® HLA-típező készletek Taq polimeráz nélkül

Probléma	Ok	Megoldás
Általános gélproblémák (homályos gélek és/vagy elkenődött sávok).	Degradálódott DNS-minta.	Kenetként jelenik meg a gél sávokban. Izolálja a DNS-t új mintából.
	Vastag sávok véletlenszerű mélyedésekben.	A DNS egyenetlen szuszpenziói. Az alikvot kivétele előtt ellenőrizze, hogy a minta DNS feloldódott-e. Vortexelje a hígított DNS mintát.
	A PCR-termék kiúszott a mélyedésből.	Óvatosan igazítsa a pipettahegyeket a gél mélyedésekhez és lassan adagolja.
	Előfordulhat, hogy az elektroforézis puffer túl meleg.	Készítsen új TBE puffert. Futtassa alacsonyabb feszültséggel.
	Helytelen arányú agaróz gélt használtak.	Győződjön meg arról, hogy az ajánlott 2% agaróz gélt használja.
	Az agaróz nem oldódott fel teljesen.	Rövid ideig forralja fel újra, hogy az agaróz megolvadjon.
	Helytelen TBE koncentráció.	Használja az ajánlott 0,5 x TBE koncentrációt.
	Nem telt el elég idő a gélek kitöltése óta.	A gélek az öntés után 15 percig nem használhatók.
	A gélek túl régiek.	Ne öntse ki túl korán a géleket.
	A használt gél fésű túl vastag résekkel rendelkezik.	Használjon vékony fésűket (4 x 1 mm).
	A gél tálcája nem UV-áteresztő.	A megtekintés előtt távolítsa el a gélt a gél tálcáról.
	A gél képe túl világos.	Túl sok etídium-bromid használata. Ellenőrizze a fényképezőgép beállításait.
	A gél képe túl sötét.	Használjon ajánlott mennyiségű etídium-bromidot. Ellenőrizze a fényképezőgép beállításait.

Probléma	Ok	Megoldás
Általános problémák a hamis negatív amplifikációval vagy az ilyen jellegű, futtatásról függő problémákkal	A felfutási sebesség túl magas.	Az Olerup SSP készleteket a GeneAmp 9700 PCR készüléken 9600-as üzemmódban és a ProFlexen 3 °C/s felfutási sebességgel validálták. Az ezzel egyenértékűnél magasabb felfutási sebességek hatással lehetnek a tipizálás eredményeire.

A JELEN DOKUMENTUMBAN/TERMÉKBEN HASZNÁLT VÉDJEJEGYEK

Az *Olerup SSP®* a *CareDx AB* bejegyzett védjegye.

A Qiagen™ a QIAGEN védjegye.

MEGJEGYZÉS A VEVŐNEK: Az *Olerup SSP®* készletek *Taq* polimeráz nélkül - Ez a termék a GMP minőségű Roche *Taq* polimeráz (katalógusszám: 03 734 927 001 vagy 03 734 935 001) polimeráz láncreakció („PCR“) folyamatában való használatra optimalizált, amely a Roche Molecular Systems, Inc. („Roche“) és az F. Hoffmann-La Roche Ltd. szabadalmainak hatálya alá tartozhat. A laboratórium feladata, hogy felvegye a kapcsolatot a Roche Molecular Systems, Inc. vállalattal annak megállapítása érdekében, hogy szükség van-e engedélyre e szabadalmak alapján.

JÓTÁLLÁS

A *CareDx AB* a termékeivel kapcsolatosan, normál használat és alkalmazás mellett jótállást nyújt az eredeti vásárlónak az anyag- és gyártási hibákért. A *CareDx AB* kizárólagos kötelezettsége a jelen jótállás alapján az, hogy díjmentesen kicseréljen minden olyan terméket, amely nem felel meg a termékleíró lapon feltüntetett teljesítményszabványoknak.

A jótállás kizárólag a *CareDx AB* ajánlása szerint kezelt és tárolt termékekre vonatkozik; módosított, helytelenül használt vagy megrongált termékekre nem érvényes.

A jótállás keretén belül érvényesíteni kívánt kárigényeket közvetlenül a *CareDx AB* felé, írásban kell benyújtani, továbbá mellékelni kell a vásárlást igazoló számla egy másolatát is. Az itt feltüntetett jótállás felvált minden egyéb kifejezett vagy vélelmezett jótállást, ideértve a piacképességre és az adott célra való alkalmasságra vonatkozó jótállásokat. A *CareDx AB* semmilyen esetben nem vállal felelősséget a balesetekből eredő vagy következményes károkért.

A termék bármilyen jellegű átalakítása, újracsomagolása, illetve továbbértékesítése a *CareDx AB* (Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Svédország) írásos beleegyezése nélkül tilos.

Minden mintát úgy kezeljen, hogy az betegségeket terjeszthet. Valamennyi munkánál viseljen kesztyűt és megfelelő védőfelszerelést.

GARANCIA

A *CareDx AB* garantálja, hogy az *Olerup SSP®* tipizáló tálcákban lévő primerek a termékismertetőben található munkalapon és lot-specifikus sajátossági és értelmezési táblázatokban megadott sajátosságokkal rendelkeznek.

CÍMEK:

Gyártó:

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

Tel: +46-8-508 939 00

Fax: +46-8-717 88 18

E-mail: orders-se@caredx.com

Weboldal: www.caredx.com

Forgalmazó:

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

Tel: +46-8-508 939 00

Fax: +46-8-717 88 18

Email: orders-se@caredx.com

Weboldal: www.caredx.com

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

Tel.: 1-877-653-7871

Fax: 610-344-7989

E-mail: orders-us@caredx.com

Weboldal: www.caredx.com

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

Tel: +61 8 9336 4212

E-mail: orders-aus@caredx.com

Weblap: www.caredx.com

Meghatalmazott képviselő:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

A világszinten működő CareDx forgalmazókkal kapcsolatos tudnivalókért forduljon a CareDx AB vállalathoz.

A(z) 1590-LBL v02 a „0193-LBL v07 Olerup SSP® HLA-típusozó készletek Taq polimeráz nélkül” angol törzsszövegének fordítása.

A 0193-LBL v07 verzió változásai a 0193-LBL v06-hez képest:

1. Hozzáadva egy svájci meghatalmazott képviselő.
2. A GelRed hozzáadása a B szakaszhoz. A készletben nem található, de szükséges anyagok.