



# Istruzioni per l'uso

## Olerup SSP<sup>®</sup> senza Taq polimerasi

© 2023 CareDx, Inc. Tutti i marchi di servizio o marchi commerciali sono di proprietà di - o concessi in licenza da - CareDx, Inc. Tutti i diritti riservati.

0418-LBL v05 Olerup SSP<sup>®</sup> HLA kit di tipizzazione senza Taq polimerasi

Per uso diagnostico *in vitro*

Rivisto settembre 2023



Pagina 1 di 30

## Per uso diagnostico *in vitro*

### USO PREVISTO

I kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® sono kit diagnostici qualitativi *in vitro* per la tipizzazione del DNA degli alleli HLA di Classe I e di Classe II. I prodotti sono usati da tecnici specializzati all'interno di strutture mediche, allo scopo di determinare il fenotipo HLA. Il materiale di origine testato è il DNA.

### RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

In passato, gli antigeni leucocitari umani (HLA) venivano determinati mediante il test di linfocitotossicità. Tuttavia, questo test è stato sostituito da tecniche di tipizzazione del DNA basate sulla PCR (reazione a catena della polimerasi) a causa della sua percentuale di errore e della mancanza di accuratezza nel rilevamento del livello degli alleli. In gran parte di queste tecniche, la PCR viene utilizzata soltanto come passaggio di amplificazione del DNA bersaglio ed è richiesto un passaggio di post-amplificazione per discriminare i diversi alleli. Diversamente, nella metodica PCR-SSP (sequence-specific primer, cioè primer con sequenza specifica) la discriminazione dei diversi alleli avviene durante la PCR. Ciò abbrevia e semplifica la fase di post-amplificazione, riducendola ad un semplice passaggio di rilevamento mediante elettroforesi su gel. I risultati del test SSP sono o positivi o negativi: ciò evita la necessità di complicate interpretazioni dei risultati. Inoltre, la risoluzione della tipizzazione col metodo PCR-SSP è superiore a quella di altre tecniche di tipizzazione basate sulla PCR, in quanto ciascuna coppia di primer definisce due motivi di sequenza posti in *cis*, cioè sullo stesso cromosoma. Infine, grazie alla natura sintetica dei reagenti SSP, è stata migliorata la loro stabilità ed è stata ridotta la variabilità da lotto a lotto.

### PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

La metodica PCR-SSP si basa sul principio per cui primer oligonucleotidici completamente o quasi completamente ibridati, senza disappaiamento delle estremità 3', sono usati in modo più efficiente nella reazione PCR - rispetto ai primer non ibridati - dalle DNA polimerasi termostabili senza proprietà di correzione. Le coppie di primer sono state progettate in modo da essere ibridate con singoli alleli o gruppi di alleli, a seconda del livello di risoluzione richiesto per la tipizzazione. In condizioni di PCR rigidamente controllate, le coppie di primer completamente o quasi completamente ibridate consentono all'amplificazione di verificarsi (risultato positivo), mentre le coppie di primer non ibridate non lo consentono (risultato negativo).

Dopo la PCR, i frammenti di DNA amplificati vengono separati in base alle dimensioni mediante elettroforesi su gel di agarosio, visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio ed esposizione alla luce ultravioletta, quindi fotografati ed interpretati. L'interpretazione dei risultati della PCR-SSP si basa sulla presenza/assenza di prodotti specifici della PCR. Le dimensioni relative dei prodotti specifici della PCR possono essere utili nell'interpretazione dei risultati. La metodica PCR-SSP per HLA è stata originariamente descritta da O. Olerup nel 1991 e 1992<sup>1,2</sup>.

Poiché la PCR può essere influenzata sfavorevolmente da vari fattori (ad esempio, errori di pipettaggio, concentrazione troppo bassa di DNA, DNA di scarsa qualità, presenza

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

di inibitori della PCR, accuratezza del termociclatore), in ogni reazione di PCR viene inclusa una coppia di primer di controllo positivo interno<sup>2</sup>. Tale coppia di controllo corrisponde a regioni conservate del gene dell'ormone della crescita umana, che è presente in tutti i campioni di DNA umano. In presenza di un prodotto specifico della PCR di uno o più alleli HLA, il prodotto della banda di controllo positivo interno potrebbe essere debole o assente. Gli ampliconi generati dalle coppie di primer HLA specifici sono più piccoli degli ampliconi della coppia di primer di controllo positivo interno, ma più grandi dei primer non incorporati (vedere il paragrafo Valori attesi).

## REAGENTI

### A. Identificazione

I kit di tipizzazione Olerup SSP® contengono primer con sequenza specifica essiccati e pre-ottimizzati per l'amplificazione mediante PCR degli alleli HLA e del gene dell'ormone della crescita umana, soluzione PCR Master Mix senza Taq polimerasi ("Master Mix") ed etichette adesive per PCR.

Le soluzioni di primer sono prealiquotate ed essiccate in pozzetti da 0,2 ml di piastre per PCR a pareti sottili. Ciascun pozzetto della piastra contiene una soluzione di primer essiccati costituita da una miscela di primer specifici, cioè primer HLA specifici per l'allele e per il gruppo, come pure una coppia di primer di controllo positivo interno che corrisponde alle sequenze non alleliche, pronti per l'aggiunta del campione di DNA, Master Mix e H<sub>2</sub>O.

I primer sono studiati in modo da ottenere l'amplificazione ottimale mediante PCR in caso di uso del Master Mix e del programma di amplificazione del DNA raccomandato (vedere il paragrafo Programmazione del termociclatore).

Le tabelle di specificità e interpretazione specifiche del lotto o il foglio di lavoro per gli alleli HLA specifici amplificati da ciascuna combinazione di primer sono reperibili nella pagina web [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

### B. Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Questo prodotto non può essere utilizzato come unica base per prendere decisioni cliniche.
3. **Rischio biologico**: Tutti i prodotti ematici devono essere trattati come potenzialmente infettivi. Nessun metodo di analisi noto può garantire che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi.
4. **Rischio biologico**: il bromuro di etidio, utilizzato per la colorazione del DNA nell'elettroforesi su gel di agarosio, è cancerogeno. Manipolarlo indossando indumenti protettivi adatti.
5. **Attenzione**: indossare occhiali protettivi anti-UV e non guardare direttamente la fonte luminosa UV mentre si osservano o si fotografano i gel.
6. Le pipette e altre apparecchiature utilizzate per le manipolazioni **post-PCR non** devono essere utilizzate per le manipolazioni **pre-PCR**.
7. Per informazioni dettagliate, consultare la scheda di dati di sicurezza ([www.caredx.com](http://www.caredx.com)).

**C. Istruzioni per l'uso**

Vedere il paragrafo Modalità d'uso.

**D. Istruzioni per la conservazione**

Conservare i componenti del kit al buio ed alle temperature indicate sulla confezione.

Utilizzare prima della data di scadenza stampata sulla confezione.

**E. Purificazione o trattamento richiesti per l'uso**

Vedere il paragrafo Modalità d'uso.

**F. Indicazioni di instabilità**

1. Non utilizzare le piastre di primer che presentino fessure nei pozzetti o danni al bordo superiore dei pozzetti, ciò potrebbe provocare evaporazione durante l'amplificazione. Non utilizzare strip di tappi per PCR che presentino fessure, ciò potrebbe provocare evaporazione durante l'amplificazione.
2. I pellet nei pozzetti devono essere di colore rosso. Un eventuale scolorimento giallo dei pellet potrebbe indicarne la degradazione.
3. Il Master Mix deve essere di colore da rosso a viola. Un eventuale scolorimento da giallo ad arancione potrebbe indicarne la degradazione.

**STRUMENTAZIONE RICHIESTA****A. Strumentazione**

Deve essere utilizzato un termociclatore con le seguenti specifiche minime:

- coperchio riscaldato con una temperatura di 104°C per un funzionamento senza olio
- blocco (alluminio, argento o argento placcato in oro) da utilizzare con una piastra PCR a 96 pozzetti o con provette da 0,2 ml a parete sottile
- I kit Olerup SSP sono validati sui seguenti ciclatori.

Velocità della rampa raccomandate:

- GeneAmp 9700: Termociclatore GeneAmp 9700 impostato sulla modalità 9600. Ciò corrisponde a una **velocità della rampa di campionamento** compresa tra 1,6 °C/s e 0,8 °C/s.
- ProFlex con 1 blocco da 96 pozzetti: Termociclatore ProFlex per PCR con velocità della rampa del blocco di 3,0 °C/s (ogni incremento 3,0 °C/s). Una **velocità della rampa del blocco** di 3,0 °C/s corrisponde a una velocità della rampa di campionamento compresa tra 1,52 °C/s e 1,36 °C/s.
- ProFlex con 2 blocchi da 96 pozzetti: Termociclatore ProFlex per PCR con velocità della rampa del blocco di 3,0 °C/s (ogni incremento 3,0 °C/s). Una **velocità della rampa del blocco** di 3,0 °C/s corrisponde a una velocità della rampa di campionamento compresa tra 1,9 °C/s e 1,6 °C/s.

***Nota: velocità di rampa più elevate rispetto a quelle sopra descritte possono avere un effetto sui risultati della digitazione. Si noti inoltre che l'effetto sulla tipizzazione potrebbe differire tra vari ciclatori non validati a seconda delle impostazioni.***

- intervallo di temperatura compreso tra 4,0°C e 99,9°C
- accuratezza di temperatura di  $\pm 0,25^\circ\text{C}$  nell'intervallo compreso tra 35°C e 99,9°C
- uniformità di temperatura del blocco di  $\leq 0,75^\circ\text{C}$  nell'intervallo compreso tra 55°C e 95°C
- calibrazione della temperatura tracciabile su uno standard di riferimento (NIST)

Programmare il termociclatore utilizzando i parametri di ciclizzazione della PCR indicati qui sotto, nella sezione B.

Per le informazioni specifiche del termociclatore, consultare il manuale d'uso fornito dal produttore. I termociclatori devono essere calibrati in conformità alle norme di accreditamento ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) o EFI (European Federation of Immunogenetics).

Programmare il termociclatore prima di iniziare le modalità d'uso descritte qui sotto.

## B. Parametri di ciclizzazione della PCR

- |    |                       |      |         |                         |
|----|-----------------------|------|---------|-------------------------|
| 1. | 1 ciclo               | 94°C | 2 min   | denaturazione           |
| 2. | 10 cicli              | 94°C | 10 sec. | denaturazione           |
|    |                       | 65°C | 60 sec. | annealing ed estensione |
| 3. | 20 cicli              | 94°C | 10 sec. | denaturazione           |
|    |                       | 61°C | 50 sec. | annealing               |
|    |                       | 72°C | 30 sec. | estensione              |
| 4. | Fine - attesa T° amb. |      |         | se meno di 8 ore        |
|    |                       | 4°C  |         | se più di 8 ore         |

Volume di reazione totale in ciascun pozzetto: 10 µl.

Gli stessi parametri di ciclizzazione della PCR vengono utilizzati per tutti i kit *Olerup*

SSP®.

**RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Per le tipizzazioni SSP è necessario utilizzare DNA estratto, altamente puro. I campioni di DNA da utilizzare per la tipizzazione HLA PCR-SSP devono essere risospesi in dH<sub>2</sub>O. Per una visualizzazione ottimale della banda durante l'elettroforesi, il rapporto A<sub>260/280</sub> rilevato tramite spettrometria UV deve essere compreso tra 1,6 e 2,0.

Si raccomanda l'estrazione automatizzata del DNA utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Come materiale di partenza deve essere utilizzato sangue ACD.

In alternativa, il DNA può essere estratto con qualsiasi altro metodo che produca DNA puro. Quando vengono utilizzati metodi alternativi, la concentrazione di DNA deve essere calibrata su 30 ng/μl. **Non utilizzare sangue eparinizzato con questi metodi.**

Concentrazione di DNA raccomandata usando:  
DNA estratto con EZ1: 15 ng/μl.  
DNA estratto con altri metodi: 30 ng/μl.

Concentrazioni superiori a 50 ng/μl potrebbero aumentare il rischio di amplificazioni non specifiche e bande supplementari deboli, in particolare per tipizzazioni SSP ad alta risoluzione di HLA Classe I. Se necessario, diluire il DNA estratto in dH<sub>2</sub>O.

***I campioni di DNA non devono essere risospesi in soluzioni che contengano agenti chelanti, quali ad esempio l'EDTA, con concentrazione superiore a 0,5 mM.***

I campioni di DNA possono essere utilizzati immediatamente dopo l'estrazione oppure conservati ad una temperatura di +4°C per un periodo fino a 2 settimane senza effetti negativi sui risultati. I campioni di DNA possono essere conservati ad una temperatura di -20°C o inferiore per 9 mesi. La purezza e la concentrazione dei campioni di DNA estratti che sono stati conservati per un periodo prolungato devono essere sottoposte a test di accettabilità prima della tipizzazione HLA.

I campioni di DNA devono essere trasportati ad una temperatura di +4°C o inferiore per preservarne l'integrità durante il trasporto.

## PROCEDURA

### A. Materiali forniti

1. Piastre di primer *Olerup SSP*®.
2. Master Mix senza *Taq* polimerasi (volume appropriato per le piastre del kit).  
La stessa Master Mix viene utilizzata per tutti i kit *Olerup SSP*®.
3. Etichette adesive per PCR (quantità appropriata per le piastre del kit).

### B. Materiali richiesti ma non forniti

1. Kit/apparecchiature per l'isolamento del DNA
2. Spettrofotometro UV
3. Dispositivi di pipettaggio. Si raccomanda l'uso di un dispenser elettronico a canale singolo in grado di dispensare aliquote da 10 µl per aggiungere la miscela DNA-Master Mix-dH<sub>2</sub>O nei pozzetti della piastra.
4. Puntali per pipette monouso
5. Provette in polipropilene
6. Vortex
7. Microcentrifuga
8. Portapiastre per PCR
9. Termociclatore con coperchio riscaldato per PCR in formato da 96 pozzetti, un gradiente di temperatura nel blocco riscaldante di ≤0,75°C e adattatore per piastre di reazione da 0,2 ml a pareti sottili
10. Forno a microonde o piastra riscaldante per riscaldare la soluzione di agarosio
11. Agarosio per elettroforesi, ad esempio Lonza Seakem LE
12. Buffer TBE 0,5 x (il buffer TBE 1 x è costituito da 89 mM di Tris-borato, 2 mM di disodio EDTA, pH 8,0)
13. Flacone di bromuro di etidio con contagocce codice prodotto 103.301-10 o un flacone contagocce di GelRed codice prodotto 103.302-05
14. Dispositivo di pipettaggio per caricamento di gel. Per il caricamento del gel si raccomanda una pipetta a 8 canali, volume regolabile 5-25 µl
15. Marker di peso molecolare da 50 a 1.000 bp, ad esempio ladder da 100 coppie di basi, Marker di peso molecolare codice 103.202-100 o Marker di peso molecolare per corse brevi 103.203-100
16. Alimentatore / apparecchiatura per elettroforesi
17. Transilluminatore UV
18. Apparecchiatura fotografica o sistema di fotodocumentazione
19. *Taq* polimerasi per DNA Roche di grado GMP [numeri di catalogo 03 734 927 001 (1000 U) o 03 734 935 001 (5000 U)].

### C. Procedura in dettaglio

Vedere il paragrafo Modalità d'uso.

**MODALITÀ D'USO****A. Preparazione del campione**

1. Purificare il DNA genomico proveniente dal campione di leucociti con il metodo di preferenza (vedere il paragrafo Raccolta e preparazione dei campioni di cui sopra).
2. Per informazioni specifiche sulla preparazione e la conservazione dei campioni, vedere il paragrafo Raccolta e preparazione dei campioni qui sopra.
3. Eseguire l'amplificazione mediante PCR sul campione di DNA purificato utilizzando una piastra di tipizzazione *Olerup SSP*®, oppure conservare il campione di DNA finché non si è pronti per la tipizzazione.

**B. Preparazione dei reagenti e delle apparecchiature**

1. Programmare un termociclatore all'esecuzione del programma per la PCR *Olerup SSP*®; vedere il paragrafo Strumentazione richiesta - Parametri di ciclizzazione qui sopra.
2. Avere a disposizione la *Taq* polimerasi (5 unità/μl), da conservare a -20°C.
3. Preparare il gel per elettroforesi; vedere la sezione C - **Preparazione del gel per elettroforesi** qui sotto.

**C. Preparazione del gel per elettroforesi**

Per *Olerup SSP*® Gel System 96 (codice prodotto 103.101-01)

1. Installazione
  - Livellare la camera di preparazione per 1 gel (codice prodotto 103.101-31) oppure quella per 3 gel (codice prodotto 103.101-33) servendosi della bolla e dei tre piedini regolabili in altezza.
  - Posizionare il vassoio o i vassoi del gel nella camera di preparazione.
2. Preparazione del gel di agarosio al 2% (w/v)

Utilizzare un agarosio per elettroforesi di alta qualità, capace di risolvere frammenti da 50 a 2.000 coppie di basi di DNA.

  - A 5 ml di buffer TBE 10 x (Tris-borato EDTA), aggiungere 150 ml di acqua distillata e 2 g di agarosio in un flacone di vetro da 500 ml.
  - Dissolvere l'agarosio facendolo bollire in un forno a microonde finché non si forma una soluzione omogenea da 100 ml.
  - Lasciar raffreddare la soluzione di gel fino a 60°C, ad esempio in un armadietto riscaldante.
  - Colorare il gel prima di prepararlo con il bromuro di etidio (10 mg/ml), 5 μl per 100 ml di soluzione di gel. Per una manipolazione ottimale, si consiglia di utilizzare i flaconi di bromuro di etidio con contagocce di nostra produzione (codice prodotto 103.301-10). **Nota: il bromuro di etidio è cancerogeno. Manipolarlo indossando indumenti protettivi adatti.**
  - Versare 100 ml della soluzione di agarosio nella vaschetta del gel all'interno della camera di preparazione. Disporre 6 pettini (codice prodotto 103.101-21) nelle fessure della vaschetta del gel.
  - Lasciar solidificare il gel per 15 minuti.

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA *Olerup SSP*® senza Taq polimerasi**

- Versare 750 ml di buffer TBE 0,5 x nel serbatoio del gel. Immergere la vaschetta del gel nella cassetta e rimuovere con cura i 6 pettini sollevandoli.

In caso d'uso di sistemi elettroforetici alternativi, seguire le istruzioni del produttore. Per poter essere utilizzati con i kit di tipizzazione HLA *Olerup SSP*® tali sistemi devono essere in grado di risolvere prodotti della PCR con dimensioni comprese tra 50 e 1100 coppie di basi.

**D. Procedura in dettaglio**

1. Prelevare la quantità appropriata di campioni di DNA, la piastra o le piastre di primer e il volume di Master Mix necessario per i campioni di DNA/le piastre di primer selezionati, conservati alle rispettive temperature di conservazione indicate, nonché la *Taq* polimerasi (5 unità/μl). Scongela a temperatura ambiente (da 20 a 25°C).

Lo stesso Master Mix viene utilizzato per tutti i kit *Olerup SSP*®.

2. Usare vortex per miscelare brevemente i campioni di DNA.
3. Disporre la piastra o le piastre di primer in un portapiastre per PCR.
4. **Kit ad alta e bassa risoluzione**
  - Mescolare col vortex il Master Mix prima di prelevare le aliquote.
  - Utilizzando una pipetta manuale a canale singolo, aggiungere a temperatura ambiente la miscela di Master Mix, la *Taq* polimerasi (5 unità/μl) e dH<sub>2</sub>O in una provetta da 0,5 ml o da 1,5 ml (consultare la tabella 1 qui sotto per le quantità appropriate).
  - Tappare la provetta e mescolarla col vortex per 5 secondi. Centrifugare la provetta in una microcentrifuga per far discendere tutto il liquido dalle pareti della provetta.
  - Utilizzando una pipetta manuale a canale singolo, aggiungere 8 μl di miscela di Master Mix e dH<sub>2</sub>O e 2 μl di dH<sub>2</sub>O nel pozzetto di controllo negativo - cioè il pozzetto con le coppie di primer di controllo negativo - della piastra di primer.
  - Utilizzando una pipetta manuale a canale singolo, aggiungere a temperatura ambiente il campione di DNA alla miscela di Master Mix e dH<sub>2</sub>O rimanente (consultare la tabella 1 qui sotto per le quantità appropriate).
  - Tappare la provetta e mescolarla col vortex per 5 secondi. Centrifugare la provetta in una microcentrifuga per far discendere tutto il liquido dalle pareti della provetta.
  - Utilizzando un dispenser elettronico a canale singolo, dispensare un'aliquota da 10 μl di miscela di reazione del campione in ciascun pozzetto della piastra di primer, ad eccezione del pozzetto di controllo negativo.

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

**Tabella 1: Volumi dei componenti necessari per ciascun test per diverse quantità di pozzetti in caso di utilizzo di Master Mix senza Taq polimerasi.**

N° di pozzetti per test	Volume di Master Mix (µl)	Volume di campione di DNA (µl)	Volume di dH <sub>2</sub> O (µl)	Volume di Taq polimerasi (µl)	N° di pozzetti per test	Volume di Master Mix (µl)	Volume di campione di DNA (µl)	Volume di dH <sub>2</sub> O (µl)	Volume di Taq polimerasi (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

I volumi raccomandati sopra elencati includono il volume richiesto per compensare le variazioni delle pipette e le perdite di liquido sulle pareti interne delle provette.

**5. Kit Combi A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ e DQA-DQB-DR Enhanced e kit ad alta risoluzione per alleli frequenti HLA-C**

- Mescolare col vortex la Master Mix.
- Utilizzando una pipetta manuale a canale singolo, aggiungere a temperatura ambiente 8,3 µl di Taq polimerasi (5 unità/µl) e 511,7 µl dH<sub>2</sub>O nella provetta da 1,5 ml in dotazione contenente 312 µl di Master Mix.
- Tappare la provetta e mescolarla col vortex per 5 secondi. Centrifugare la provetta in una microcentrifuga per far discendere tutto il liquido dalle pareti della provetta.
- Utilizzando una pipetta manuale a canale singolo, aggiungere 8 µl di miscela di Master Mix - Taq polimerasi - dH<sub>2</sub>O e 2 µl di dH<sub>2</sub>O nel pozzetto di controllo negativo n° 96, cioè il pozzetto con le coppie di primer di controllo negativo.
- Utilizzando una pipetta manuale a canale singolo, aggiungere a temperatura ambiente 206 µl di campione di DNA alla miscela di Master Mix - Taq polimerasi - dH<sub>2</sub>O rimanente.

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

- Tappare la provetta e mescolarla col vortex per 5 secondi. Centrifugare la provetta in una microcentrifuga per far discendere tutto il liquido dalle pareti della provetta.
- Utilizzando un dispenser elettronico a canale singolo, dispensare un'aliquota da 10 µl di miscela di reazione in ciascun pozzetto della piastra di primer, ad eccezione del pozzetto di controllo negativo n° 96.

**Importante:**

Assicurarsi di depositare il campione al di sopra dei primer (che sono essiccati sul fondo di ciascun pozzetto della piastra) in modo da evitare la contaminazione incrociata tra pozzetti. Toccare la parete interna del pozzetto con il puntale della pipetta, affinché il campione scivoli sul fondo. Controllare che tutti i campioni si siano depositati sul fondo di ciascun pozzetto. Se ciò non accadesse, picchiettare delicatamente la piastra sul tavolo di lavoro per far scendere tutti i campioni sul fondo del pozzetto prima di iniziare la PCR.

5. Sigillare la piastra o le piastre di primer con le etichette adesive per PCR in dotazione. Verificare che tutti i pozzetti di reazione siano completamente sigillati in modo da evitare perdite dovute ad evaporazione durante l'amplificazione. Il cuscinetto di compressione *Olerup SSP® Compression Pad* (codice prodotto 103.505-06) può essere collocato al di sopra delle etichette adesive per PCR in modo da evitare l'evaporazione durante l'amplificazione.
6. Inserire la piastra o le piastre di primer nel termociclatore con un idoneo adattatore per provette-piastre. Evitare di far trascorrere più di 5 minuti tra la preparazione della PCR e l'amplificazione.
7. Selezionare il numero del programma *Olerup SSP®*. Specificare un volume di reazione di 10 µl.
8. Avviare il programma di PCR. L'esecuzione del programma richiede 1 ora e 20 minuti circa.
9. Rimuovere la piastra o le piastre di primer dal termociclatore. Controllare la piastra di PCR per assicurarsi che sia presente approssimativamente lo stesso volume di fluido in ciascun pozzetto. Sottoporre a elettroforesi i campioni; vedere la sezione E - Elettroforesi su gel qui sotto. Interpretare i risultati della tipizzazione utilizzando il ***foglio di lavoro oppure le tabelle di specificità e interpretazione del lotto specifico***; vedere il paragrafo Valori attesi qui sotto.

## E. Elettroforesi su gel

1. Dopo aver completato la reazione di PCR, orientare la piastra di primer e la cassetta del gel. L'ordine dei pozzetti deve essere da sinistra a destra e dall'alto in basso.
2. Rimuovere delicatamente i sigilli della piastra senza far fuoriuscire i prodotti della PCR.
3. Caricare i prodotti della PCR in sequenza sul gel di agarosio al 2% (non occorre aggiungere buffer di caricamento del gel). Si raccomanda di utilizzare una pipetta a 8 canali per il caricamento del gel.
4. Caricare un marker di peso molecolare (ladder da 100 coppie di basi, Marker di peso molecolare codice 103.202-100 o Marker di peso molecolare per corse brevi codice 103.203-100) in un pozzetto per fila.
5. Chiudere la cassetta del gel con l'apposito coperchio.
6. Sottoporre ad elettroforesi il gel in TBE 0,5 x, senza ricircolo del buffer, per 15-20 minuti a 8-10 V/cm.
7. Trasferire il vassoio del gel con il gel su un transilluminatore UV.
8. Fotografare il gel con o senza la vaschetta.
9. Contrassegnare la fotografia in base al protocollo del laboratorio.

## CONTROLLO QUALITÀ

Le direttive di analisi dell'HLA dell'ASHI indicano che deve essere incluso un pozzetto di controllo negativo (contaminazione) in ciascuna reazione di PCR (Norme riviste per i laboratori accreditati, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Norme finali riviste approvate da CMS: 16 febbraio 2021). Un pozzetto di controllo negativo è incluso in tutti i kit, ad eccezione dell'unità HLA-B\*27 e dei kit a pozzetto singolo HLA-B\*27.

Consultare il paragrafo Interpretazione del gel a pagina 14.

## RISULTATI

I fogli di convalida delle linee cellulari specifici per lotto e il certificato di analisi sono accessibili online, [www.caredx.com](http://www.caredx.com).

## LIMITI DELLA PROCEDURA

1. Il processo PCR-SSP richiede condizioni di analisi altamente controllate per garantire un'adeguata amplificazione discriminatoria. Deve essere rigorosamente rispettata la procedura descritta nelle Istruzioni per l'uso.
2. Il campione di DNA estratto è il modello per il processo di amplificazione specifico mediante PCR. Il DNA purificato deve avere un rapporto  $A_{260/280}$  compreso tra 1,6 e 2,0 per ottenere una visualizzazione ottimale della banda mediante elettroforesi.
3. Tutti gli strumenti (ad esempio il termociclatore e i dispositivi di pipettaggio) devono essere calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.
4. Le informazioni su un lotto specifico vengono fornite nel Foglio illustrativo: Informazioni specifiche per il lotto e nel foglio di lavoro del lotto specifico.
5. In base all'analisi eseguita, sono state valutate le seguenti sostanze con tre (3) metodi di estrazione alle concentrazioni elencate ed è stato riscontrato che non influivano sulle prestazioni del test.

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

<b>Metodo di estrazione</b>	<b>Sostanza interferente</b>	<b>Concentrazione interferente*</b>
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubina	200 mg/L
	Emoglobina	200 g/L
	Trigliceridi	30 g/L
	Proteine	110 g/L
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubina	200 mg/L
	Emoglobina	200 g/L
	Trigliceridi	18,2 g/L
	Proteine	77 - 96 g/L
Metodo Gentra PureGene	Bilirubina	200 mg/L
	Emoglobina	200 g/L
	Trigliceridi	18,2 g/L
	Proteine	119 - 146 g/L

6. Le piastre per PCR sono compatibili con gran parte dei termociclatori disponibili in commercio: consultare la tabella di compatibilità dei termociclatori qui sotto.  
*Nota: la tabella viene fornita a titolo esclusivamente indicativo. Per i ciclatori convalidati, vedere la sezione Strumentazione richiesta - Strumentazione.*

<b>Tabella di compatibilità</b>	
<b>Produttore</b>	<b>Termociclatore</b>
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)
	PTC-100 with 96-well block
Eppendorf	Mastercycler Gradient

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

	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. Le prestazioni di questo kit che utilizza il Master Mix senza Taq polimerasi sono state validate esclusivamente con la Taq polimerasi per DNA Roche di grado GMP (numeri di catalogo 03 734 927 001 o 03 734 935 001). Le prestazioni dei saggi che utilizzano eventuali altri enzimi sono sconosciute e devono essere stabilite e validate dall'utente.

**VALORI ATTESI****A. Analisi dei dati**

Esaminare con cura la foto del gel e determinare le corsie positive.

1. Una banda più corta ed a migrazione più veloce sarà visibile in una corsia del gel in caso di amplificazione di uno o più alleli HLA specifici. Ciò indica un risultato positivo del test.
  - a. Annotare la presenza/assenza di prodotti specifici della PCR.
  - b. Quando vengono interpretati i risultati del gel, è utile monitorare le lunghezze relative dei prodotti specifici della PCR secondo le indicazioni contenute nei fogli illustrativi del lotto specifico. Molte corsie hanno due o più possibili lunghezze di prodotti specifici della PCR. Questi pozzetti contengono coppie di primer multipli che generano prodotti della PCR di diverse dimensioni, a seconda degli alleli HLA del campione di DNA.
  - c. Far corrispondere il pattern delle corsie del gel con prodotti specifici della PCR alle informazioni contenute nelle tabelle di specificità e interpretazione del lotto specifico, in modo da ottenere la tipizzazione HLA del campione di DNA.
2. Una banda di controllo positivo interno, più lunga e a migrazione più lenta, deve essere visibile in tutte le corsie del gel - ad eccezione della corsia del gel di controllo negativo - come controllo dell'avvenuta amplificazione. Nelle corsie del gel positive la banda di controllo positivo interno può essere debole o assente.
  - a. Annotare la presenza e le lunghezze relative delle bande di controllo interno positivo. Le bande di controllo di dimensioni diverse agevoleranno il corretto orientamento della tipizzazione, come pure l'identificazione del kit.
  - b. L'assenza della banda di controllo interno positivo senza prodotto specifico della PCR indica una reazione non riuscita.
    - i. Se gli alleli HLA possono essere determinati in presenza di reazioni di PCR non riuscite e tali reazioni non riuscite non modificano l'assegnazione degli alleli, non è necessario ripetere il test.
    - ii. Se, però, le reazioni di PCR non riuscite dovessero modificare l'assegnazione degli alleli HLA, allora la tipizzazione deve essere ripetuta.
3. La presenza di prodotti specifici della PCR o della banda di controllo positivo interno in corsie di controllo negativo indica contaminazione con uno o più prodotti della PCR e invalida tutti i risultati del test. Nelle corsie di controllo negativo potrebbe essere riscontrata la presenza di oligomeri di primer con dimensioni comprese tra 40 e 60 coppie di basi. Ciò non rappresenta contaminazione.

## B. Interpretazione del gel

	<b>Reazione positiva</b>	<b>Reazione negativa</b>	<b>Reazione PCR non riuscita</b>
Pozzetto			
Banda di controllo positivo interno			
Banda specifica			
Banda dei primer			

1. Deve essere deposto un marker di peso molecolare (ladder di 100 coppie di basi, Marker di peso molecolare codice 103.202-100 o Marker di peso molecolare per corse brevi 103.203-100) in un pozzetto per riga del gel o in base alle direttive di accreditamento del laboratorio locale.
2. Si potrebbero ottenere bande più lunghe della banda di controllo interno positivo: tali bande non devono essere prese in considerazione nell'interpretazione dei risultati della tipizzazione.
3. I primer non utilizzati formeranno una banda diffusa più corta di 50 coppie di basi.
4. Potrebbe essere riscontrata la presenza di oligomeri di primer. Essi sono più lunghi della banda dei primer ma più corti delle bande specifiche.

## CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONI SPECIFICHE

### Controllo qualità del lotto del kit

Ogni soluzione di primer è stata analizzata a fronte di un pannello di 48 campioni di DNA provenienti da linee cellulari ben caratterizzate dell'IHWC; vedere le informazioni specifiche del lotto nelle schede di convalida delle linee cellulari contenute nel foglio illustrativo.

### Comparazione dei metodi

È stato condotto uno studio per confrontare i kit di tipizzazione HLA *Olerup* SSP® con e senza *Taq* polimerasi fornite nella soluzione PCR Master Mix. Lo scopo dello studio era quello di dimostrare che l'aggiunta manuale non influisce sui risultati dei saggi e che lotti diversi di *Taq* polimerasi producono gli stessi risultati. Lo studio ha incluso la tipizzazione a bassa risoluzione HLA-A, -B (Classe I) e -DRB (Classe II) di 15 campioni

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

di DNA con genotipo HLA conosciuto, ottenuti dalla International Histocompatibility Workshop Collection (IHCW). I campioni sono stati preparati e codificati da personale diverso da quello che ha eseguito l'analisi, che non conosceva i tipi di HLA dei campioni (analisi in cieco). Ogni campione è stato analizzato in parallelo con il Combi Tray Olerup SSP® HLA-A-B-DR con PCR Master Mix senza Taq polimerasi ("Test") e il Combi Tray Olerup SSP® HLA-A-B-DR con PCR Master Mix con Taq polimerasi ("Controllo"), in conformità alle istruzioni contenute nel foglio illustrativo di ciascun saggio. Tutte le analisi sono state eseguite presso il Laboratorio di CareDx AB a Stoccolma, Svezia, utilizzando un lotto di kit e due lotti di Taq polimerasi. Nello studio è stata utilizzata la Taq polimerasi per DNA Roche di grado GMP. L'analisi su ciascun campione era costituita dalla tipizzazione a bassa risoluzione con il Combi Tray Olerup SSP® HLA-A-B-DR, eseguita con: 1) PCR Master Mix con Taq polimerasi (saggio autorizzato dalla FDA) (saggio di controllo), 2) PCR Master Mix più Taq polimerasi per DNA Roche di grado GMP, 5 U/μL, lotto 1 (Lotto di analisi 1), e 3) PCR Master Mix più Taq polimerasi per DNA Roche di grado GMP, 5 U/μL, lotto 2 (Lotto di analisi 2). Dopo la PCR, il rilevamento è stato eseguito utilizzando l'elettroforesi su gel. I risultati sono riepilogati qui di seguito.

Confronto	Concordanza			
	Risultati di tipizzazione della Classe I (concordanti/totale)		Risultati di tipizzazione della Classe II (concordanti/totale)	% concordanza (95% IC <sup>a</sup> )
	HLA-A	HLAB	HLA-DRB	
Lotto di analisi 1 / Lotto di controllo	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 - 100,0%)
Lotto di analisi 1 / Consenso <sup>b</sup>	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 - 100,0%)
Lotto di analisi 2 / Lotto di controllo	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 - 100,0%)
Lotto di analisi 2 / Consenso	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 - 100,0%)
Lotto di analisi 1 / Lotto di analisi 2	15/15	15/15	15/15	100% (84,7 - 100,0%)

<sup>a</sup> Metodo di punteggio

<sup>b</sup>Risultato di consenso dalla International Histocompatibility Workshop Collection (IHCW)

## BIBLIOGRAFIA

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. Gli alleli HLA attuali sono disponibili su [www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)

## RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Nessuna amplificazione (né amplificazione di frammenti di controllo interno, né amplificazione specifica).</b>	Quantità di DNA insufficiente.	Misurare la concentrazione del DNA e controllare che la quantità aggiunta sia corretta. La contaminazione di RNA può causare una sopravvalutazione spettrofotometrica della concentrazione di DNA. Ripetere con cura l'estrazione del DNA con soluzioni appena preparate. Si raccomanda l'estrazione automatizzata del DNA utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Il DNA contiene inibitori della PCR, ad esempio proteine, etanolo (derivanti dalle fasi di precipitazione), matrici rimaste dai prodotti di purificazione del DNA in forma solida.	Controllare la qualità del DNA. Si raccomanda un rapporto A260/A280 rilevato tramite spettrometria UV compreso tra 1,6 e 2,0. Seguire scrupolosamente il protocollo di estrazione del DNA del fornitore. Estrarre nuovamente il DNA. Si raccomanda l'estrazione automatizzata del DNA utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Il DNA è stato estratto da sangue eparinizzato.	Utilizzare sangue non eparinizzato oppure utilizzare protocolli di estrazione del DNA per sangue eparinizzato.

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA *Olerup* SSP® senza Taq polimerasi**

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua:</b> <b>Nessuna amplificazione (né amplificazione di frammenti di controllo interno, né amplificazione specifica).</b>	Il DNA è dissolto in un buffer contenente EDTA.	Ripetere l'estrazione del DNA e dissolverlo in dH <sub>2</sub> O.
	Introduzione accidentale di candeggina nel test.	Riesaminare le aree in cui potrebbe essersi introdotta la candeggina.
	I kit non sono conservati ad una temperatura adeguata.	Conservare i kit ad una temperatura di -20°C.
	Il termociclatore non sta funzionando in modo corretto.	Calibrare il termociclatore e controllare il programma di PCR. Un termociclatore utilizzato per la tipizzazione PCR-SSP di routine deve essere calibrato ogni 6-12 mesi.
	Contatto inadeguato tra il blocco riscaldante del termociclatore e la piastra di tipizzazione SSP.	Utilizzare la piastra/blocco corretti per pozzetti di reazione da 0,2 ml a pareti sottili; consultare il manuale del termociclatore.
<b>Insuccesso casuale dell'amplificazione (perdite).</b>	Le etichette sigillanti per PCR/i tappi delle provette PCR non chiusi ermeticamente hanno provocato l'evaporazione e il conseguente insuccesso dell'amplificazione.	Assicurarsi che le etichette per PCR/tutti i tappi siano chiusi ermeticamente. Il cuscinetto di compressione <i>Olerup</i> SSP® Compression Pad (codice prodotto 103.505-06) può essere collocato al di sopra delle etichette adesive per PCR in modo da evitare l'evaporazione durante l'amplificazione.
	Errori di caricamento del gel.	Controllare che sia stato caricato il numero corretto di pozzetti e che ciascun pozzetto contenga approssimativamente lo stesso volume di reazione di PCR.

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua: Insuccesso casuale dell'amplificazione (perdite).</b>	Utilizzo di pipette non calibrate.	Calibrare tutte le pipette in modo regolare in base alle raccomandazioni del fornitore.
	Errori di pipettaggio.	Eseguire il pipettaggio con maggiore accuratezza.
	Il Master Mix ed il campione di DNA non sono stati miscelati correttamente prima dell'uso.	Miscelare brevemente col vortex prima dell'uso. Si raccomanda di mescolare col vortex dopo ciascun passaggio.
	È stato aggiunto nei pozzetti un volume disomogeneo di miscela di DNA e Master Mix.	Eseguire il pipettaggio con maggiore accuratezza.
<b>Frammenti di controllo interno deboli.</b>	DNA impuro.	Controllare la qualità del DNA. Il rapporto A260/A280 rilevato tramite spettrometria UV deve essere compreso tra 1,6 e 2,0. La contaminazione di RNA può causare una sopravvalutazione spettrofotometrica della concentrazione di DNA. Il DNA degradato provocherà smear nelle corsie del gel. Ripetere con cura l'estrazione del DNA con soluzioni appena preparate. Si raccomanda l'estrazione automatizzata del DNA utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Quantità di DNA insufficiente.	Misurare la concentrazione del DNA ed aggiustarla a 30 ng/μl o 15 ng/μl per il DNA estratto utilizzando il

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua:</b> <b>Frammenti di controllo interno deboli.</b>		QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. La contaminazione di RNA può causare una sopravvalutazione spettrofotometrica della concentrazione di DNA. Il DNA degradato provocherà smear nelle corsie del gel. Ripetere con cura l'estrazione del DNA con soluzioni appena preparate. Si raccomanda l'estrazione automatizzata del DNA utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Temperatura di annealing troppo elevata, il termociclatore non è calibrato.	Calibrare il termociclatore e controllare il programma di PCR. Un termociclatore utilizzato per la tipizzazione PCR-SSP di routine deve essere calibrato ogni 6-12 mesi.
	Il Master Mix per la PCR è stato conservato ad una temperatura di +4°C per più di 2 settimane.	Conservare in modo appropriato il Master Mix per la PCR.
<b>Amplificazione non specifica (ladder o smear).</b>	Utilizzo di campioni di DNA in eccesso.	Misurare la concentrazione di DNA ed aggiustarla a 30 ng/µl o 15 ng/µl per il DNA estratto utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Alcune soluzioni di primer hanno una maggiore tendenza a provocare un'amplificazione non specifica; consultare le note a piè di pagina in

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua:</b> <b>Amplificazione non specifica (ladder o smear).</b>		ciascuna tabella di specificità del lotto specifico.
	DNA impuro.	Quando vengono interpretati i risultati ottenuti, tutti i frammenti più grandi del frammento di controllo interno devono essere scartati. Verificare la qualità del DNA. Ripetere l'estrazione del DNA. Si raccomanda l'estrazione automatizzata del DNA utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Alcune soluzioni di primer hanno una maggiore tendenza a provocare un'amplificazione non specifica; consultare le note a piè di pagina in ciascuna tabella di specificità del lotto specifico.
<b>Segnali di amplificazione sempre più deboli con il passare del tempo.</b>	La soluzione colorante per il gel di agarosio con bromuro di etidio è vecchia.	Preparare una soluzione fresca con bromuro di etidio per ottenere una migliore colorazione del gel di agarosio ed un segnale migliore. L'alone dei primer è facilmente rilevabile se la colorazione del gel di agarosio è normale.
	Una delle lampade UV è rotta.	Controllare l'apparecchiatura UV. L'alone dei primer è facilmente rilevabile se la luce UV è normale.
	Utilizzo di un quantitativo di DNA troppo piccolo.	Misurare la concentrazione del DNA ed aggiustarla a 30 ng/µl

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua:</b> <b>Segnali di amplificazione sempre più deboli con il passare del tempo.</b>		o 15 ng/µl per il DNA estratto utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Temperatura di annealing troppo elevata, il termociclatore non è calibrato.	Calibrare il termociclatore e controllare il programma di PCR. Un termociclatore utilizzato per la tipizzazione PCR-SSP di routine deve essere calibrato ogni 6-12 mesi.
<b>Strani pattern di amplificazione.</b>	Si sta utilizzando una tabella di interpretazione / un foglio di lavoro non corretti.	Controllare che il numero di lotto del prodotto utilizzato sia identico alla tabella di interpretazione / al foglio di lavoro utilizzati.
	Ordine errato di caricamento del gel.	Controllare l'allineamento delle miscele e delle corsie del gel.
	Il pattern di amplificazione contiene un falso positivo.	Vedere sotto.
	Il pattern di amplificazione contiene un falso negativo.	Vedere sotto.
<b>Amplificazioni false positive.</b>	Contaminazione del DNA.	Utilizzare guanti, puntali contenenti barriera (puntali con filtro) e aree separate per la manipolazione pre-PCR e post-PCR. Eseguire la manipolazione di tutti i campioni in modo attento e accurato in tutte le fasi. Verificare l'eventuale contaminazione utilizzando il kit "Wipe Test" Olerup SSP®.
	DNA impuro.	Misurare la qualità del DNA. Seguire scrupolosamente il protocollo di estrazione del DNA del fornitore.

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua:</b> <b>Amplificazioni false positive.</b>		Provare altri sistemi di estrazione del DNA. Estrarre nuovamente il DNA. Si raccomanda l'estrazione automatizzata del DNA utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Utilizzo di campioni di DNA in eccesso.	Misurare la concentrazione del DNA ed aggiustarla a 30 ng/μl o 15 ng/μl per il DNA estratto utilizzando il QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Temperatura di annealing troppo bassa.	Calibrare il termociclatore e controllare il programma di PCR. Un termociclatore utilizzato per la tipizzazione PCR-SSP di routine deve essere calibrato ogni 6-12 mesi.
	Tempo troppo lungo tra la preparazione della PCR e l'avvio dell'amplificazione.	Prima dell'amplificazione possono passare al massimo 5 minuti.
	Ritardo tra il posizionamento delle piastre di tipizzazione nel termociclatore e l'avvio dell'amplificazione.	Utilizzare un termociclatore pre-riscaldato.
	Utilizzo di bromuro di etidio in eccesso.	Utilizzare la quantità raccomandata di bromuro di etidio.
	Interpretazione errata di un artefatto come banda specifica.	Consultare la tabella di interpretazione e specificità / il foglio di lavoro del lotto specifico per controllare la dimensione corretta della banda e le note a piè di pagina.
	Il pattern di amplificazione contiene un falso positivo.	Controllare se tutte le amplificazioni specifiche

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua:</b> <b>Amplificazioni false positive.</b>		sono di dimensioni corrette oppure se un artefatto (carry-over, dimero di primer) è stato erroneamente interpretato come un'amplificazione.
	Ordine errato di caricamento del gel.	Controllare l'allineamento delle miscele e delle corsie del gel.
<b>Amplificazioni false negative.</b>	Il termociclatore non è calibrato correttamente.	Calibrare il termociclatore e controllare il programma di PCR. Un termociclatore utilizzato per la tipizzazione PCR-SSP di routine deve essere calibrato ogni 6-12 mesi. In caso di mancata correzione dopo la ricalibrazione, eseguire nuovamente il test con un campione di riferimento della stessa specificità. Se il risultato si conferma negativo, contattare l'assistenza clienti.
	Ordine errato di caricamento del gel.	Controllare l'allineamento delle miscele e delle corsie del gel.
<b>Problemi generici del gel (gel sfocati e/o corsie con smear).</b>	Campione di DNA degradato.	Appare uno smear nelle corsie del gel. Purificare il DNA da un campione fresco.
	Striature importanti in pozzetti casuali.	Sospensioni disomogenee di DNA. Assicurarsi che il campione di DNA sia dissolto prima di prelevare l'aliquota. Mescolare col vortex il campione di DNA diluito.
	Prodotto della PCR caricato fuori dal pozzetto.	Allineare con cura i puntali delle pipette con i

**Istruzioni per l'uso**  
**Kit di tipizzazione HLA Olerup SSP® senza Taq polimerasi**

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
<b>Continua:</b> <b>Problemi generici del gel (gel sfocati e/o corsie con smear).</b>		pozzetti del gel e dispensare lentamente.
	Il buffer per l'elettroforesi potrebbe essere troppo caldo.	Preparare nuovo buffer TBE. Operare ad un voltaggio inferiore.
	È stata utilizzata una percentuale di gel di agarosio errata.	Assicurarsi di utilizzare il gel di agarosio consigliato al 2%.
	Agarosio non completamente dissolto.	Far ribollire brevemente per sciogliere l'agarosio.
	Concentrazione di TBE errata.	Utilizzare la concentrazione TBE 0,5 x consigliata.
	Gel preparati da troppo poco tempo.	I gel sono pronti per l'uso soltanto 15 minuti dopo essere stati preparati.
	Gel troppo vecchi.	Non preparare i gel con troppo anticipo.
	Il pettine del gel utilizzato ha denti troppo spessi.	Utilizzare pettini sottili (4 x 1 mm).
	Supporto del gel non trasparente alla luce UV.	Rimuovere il gel dal supporto prima della visualizzazione.
	Foto del gel troppo luminosa.	Utilizzo eccessivo di bromuro di etidio. Controllare le impostazioni della fotocamera.
	Foto del gel troppo scura.	Utilizzare la quantità raccomandata di bromuro di etidio. Controllare le impostazioni della fotocamera.

Problema	Possibili cause	Soluzione
<b>Problemi generali con amplificazioni false negative oppure problemi da corsa a corsa da esse dipendenti</b>	Impostazione della velocità di rampa troppo elevata.	I kit <i>Olerup SSP</i> sono validati utilizzando il ciclatore GeneAmp 9700 impostato sulla modalità 9600 e ProFlex con una velocità della rampa di 3°C/s. Velocità della rampa superiori all'equivalente di quanto descritto potrebbero avere un effetto sui risultati della tipizzazione.

### MARCHI COMMERCIALI UTILIZZATI IN QUESTO DOCUMENTO/PRODOTTO

*Olerup SSP*® è un marchio depositato di *CareDx AB*.

Qiagen™ è un marchio commerciale di QIAGEN.

**AVVISO PER L'ACQUIRENTE:** Kit *Olerup SSP*® senza Taq polimerasi: questo prodotto è ottimizzato per l'uso con la Taq polimerasi Roche di grado GMP (numeri di catalogo 03 734 927 001 o #03 734 935 001) nel processo di reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain reaction, "PCR"), che potrebbe essere coperta da brevetti di Roche Molecular Systems, Inc. e F. Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche"). Il laboratorio dovrà quindi contattare Roche Molecular Systems, Inc. per determinare se è necessaria una licenza in base a questi brevetti.

### GARANZIA

*CareDx AB* garantisce all'acquirente originale i propri prodotti contro tutti i difetti di materiali e di produzione, a condizione che siano stati utilizzati in modo corretto. Nell'ambito di tale garanzia, l'unico obbligo di *CareDx AB* sarà la sostituzione gratuita di qualsiasi prodotto che non risponda agli standard prestazionali indicati sulla scheda tecnica del prodotto.

Questa garanzia si applica esclusivamente ai prodotti manipolati e conservati secondo le raccomandazioni di *CareDx AB* e non si applica ai prodotti che sono stati oggetto di modifiche, uso improprio o abuso.

Qualsiasi reclamo nell'ambito della presente garanzia deve essere rivolto a *CareDx AB* per iscritto ed accompagnato da una copia della fattura d'acquisto. Questa garanzia sostituisce tutte le altre garanzie, esplicite o implicite, incluse quelle riguardanti la commerciabilità e l'idoneità ad usi particolari. In nessun caso *CareDx AB* potrà essere considerata responsabile per danni incidentali o consequenziali.

Questo prodotto non può essere riformulato, riconfezionato o rivenduto in alcuna forma senza l'accordo scritto di *CareDx AB*, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stoccolma, Svezia.

Manipolare tutti i campioni come se fossero in grado di trasmettere malattie infettive. Indossare imperativamente guanti e protezioni appropriate in tutte le fasi di lavoro.

## GARANZIA

CareDx AB garantisce che i primer nelle piastre di tipizzazione *Olerup SSP*<sup>®</sup> presentano le specificità indicate nelle tabelle di specificità e interpretazione e nel foglio di lavoro contenuti nella documentazione del lotto specifico.

## INDIRIZZI:

### Produttore:

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stoccolma, Svezia

**Tel.:** +46-8-508 939 00

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

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

**Sito web:** www.caredx.com

### Distribuito da:

**CareDx AB**, Franzéngatan 5, SE-112 51 Stoccolma, Svezia

**Tel.:** +46-8-508 939 00

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

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

**Sito web:** 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

**Sito web:** www.caredx.com

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

**Telefono:** +61 8 9336 4212

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

**Sito web:** www.caredx.com

### Mandatario:

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

CHRN: CHRN-AR-20002058

Per informazioni sui distributori di CareDx nel mondo, si prega di contattare CareDx AB.

0418-LBL v05 è la traduzione dell'originale inglese 0193-LBL v07 - Kit di tipizzazione HLA *Olerup SSP*<sup>®</sup> senza Taq polimerasi.

Modifiche nella revisione 0193-LBL v07 rispetto a 0193-LBL v06:

1. Aggiunta del mandatario svizzero.
2. Aggiunta di GelRed alla sezione B. Materiali richiesti ma non forniti.