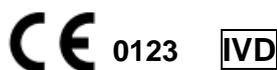


IT

Istruzioni d'uso

HISTO TYPE SSP Kits

Per le istruzioni d'uso in formato elettronico si consulti www.bag-healthcare.com



Kit per la tipizzazione tissutale degli alleli HLA (Classe I: HLA-A, B, C e Classe II: HLA-DR, DQ) in biologia molecolare

Kit prealiquotati pronti all'uso

REF 70721	HISTO TYPE A low
REF 70731	HISTO TYPE B low
REF 70741	HISTO TYPE C low
REF 70751	HISTO TYPE DR low
REF 70891	HISTO TYPE DQB low
REF 7098	HISTO TYPE ABDR low
REF 7102	HISTO TYPE ABC low
REF 7103	HISTO TYPE DR/DQB low
REF 709010	HISTO TYPE DQB high low
REF 7070	HISTO TYPE B27 (48) low
REF 7071	HISTO TYPE B27 (96) low
REF 70941	HISTO TYPE Celiac Disease low
REF 70715	HISTO TYPE B*57:01/B*51 low
REF 70716	HISTO TYPE Narcolepsy low

Indice

1.	Descrizione del prodotto	2
1.1	Informazioni di base sul kit HISTO TYPE Celiac Disease	2
1.2	Informazioni di base sul kit HISTO TYPE B*57:01/B*51	2
1.3	Informazioni di base sul kit HISTO TYPE Narcolepsy	2
1.4	Significato clinico del B27	3
2.	Materiale	3
2.1	Contenuto degli HISTO TYPE SSP kits	3
2.2	Materiale necessario supplementare	3
2.3	Conservazione e stabilità	4
3.	Dati per l'esecuzione	4
4.	Procedura del test	4
4.1	Condizioni di sicurezza ed indicazioni speciali	4
4.2	Estrazione del DNA	4
4.3	Amplificazione	5
4.4	Gel elettroforesi	7
4.5	Documentazione ed interpretazione	7
5.	Avvertenze e precauzioni	8
6.	Soluzione dei problemi	8
7.	Referenze	9
8.	Spiegazione dei simboli usati sulle etichette	10

Versione: 17/2017 / Edita il: 2017-07

1. Descrizione del prodotto

I kit **HISTO TYPE** vengono impiegati per la tipizzazione HLA in biologia molecolare (per le informazioni sui kit test disponibili per la tipizzazione di alleli HLA associati a malattie si vedano i capitoli 1.1, 1.2, 1.3 ed 1.4).

Il materiale base per la tipizzazione con gli **HISTO TYPE SSP kits** è il DNA purificato. La procedura del test prevede l'uso del metodo *Sequence Specific Primers* (SSP) -PCR (vedi Fig. 1) [2,3]. Questo metodo si basa sull'estensione del primer e perciò la riuscita della PCR dipende da un'esatto match all'estremità 3' di entrambi i primers. Perciò, solo se i primers sono complementari alla sequenza avviene l'amplificazione, che viene di seguito evidenziata dall'elettroforesi del gel di agarosio.

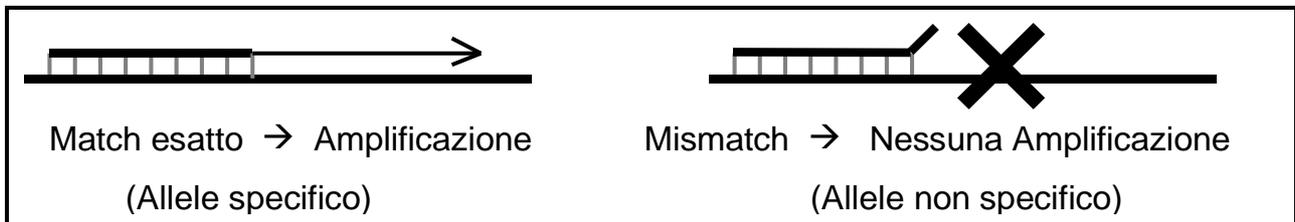


Fig. 1: Principio dell' SSP-PCR

La composizione delle positività delle mixes dei primer rende possibile una chiara identificazione della tipizzazione HLA indicata nel diagramma di interpretazione. Per ogni tipizzazione vengono usati un certo numero di mixes **prealiquotate** e **liofilizzate** nelle quali è incluso il controllo di amplificazione interno con un volume finale di 10 µl.

1.1 Informazioni di base sul kit HISTO TYPE Celiac Disease

La Malattia celiaca (CD, Celiac Disease) è una reazione autoimmune contro il glutine che è un ingrediente contenuto in vari cereali. Se non è diagnosticato precocemente può causare infiammazione cronica e distruzione dell'intestino tenue. La malattia celiaca è fortemente associata con l'aplotipo DQA1*05:01-DQB1*02:01 e DQA1*03-DQB1*03:02. In aggiunta, alleli DR3, DR7 e DR11 possono essere utilizzati come ulteriori marcatori genetici. [8-10]

1.2 Informazioni di base sul kit HISTO TYPE B*57:01/B*51

Il trattamento con farmaci antiretrovirali (ad es per terapia anti HIV) contenenti l'agente Abacavir è consentito solo se il paziente non presenta l'allele HLA-B*57:01. Ciò è dovuto a potenziale reazione di ipersensibilità associata a questo allele.[11-13]

La sindrome di Behçet è una vasculite cronica caratterizzata da ricorrenti ulcere orali, genitali, oculari, coinvolgimento a livello della pelle e altri fattori multi sistemici. Nonostante una distribuzione a livello mondiale, si nota una particolare concentrazione della sindrome di Behçet in un'area che si estende dall'Asia orientale al bacino del Mediterraneo. HLA B*51 è un fattore di rischio elevato per lo sviluppo della malattia e può essere utilizzato come strumento diagnostico. [14]

1.3 Informazioni di base sul kit HISTO TYPE Narcolepsy

La narcolessia è un disturbo del sonno con sintomi tra i quali eccessiva sonnolenza nelle ore diurne, catalessi o allucinazioni. Circa il 98% dei pazienti narcolettici di etnia caucasica presenta l'aplotipo DRB1*15:01 - DQA1*01:02 – DQB1*06:02. Pertanto, la tipizzazione HLA è utile per confermare od escludere una diagnosi. [15-17]

1.4 Significato clinico del B27

Sono state riconosciute relazioni tra determinati HLA e determinate malattie per più di 40 combinazioni diverse. La più significativa è la relazione tra l'HLA-B27 e il quadro clinico di artriti sieronegative (malattia di Bechterew, malattia di Reiter, artriti reattive). Un risultato HLA-B27 positivo viene associato ad un rischio di malattia molto elevato (vedi Tabella 1) [18,19]. In particolare, un risultato diagnostico confermato di HLA-B27 contribuisce in modo rilevante alla terapia del paziente in casi incerti di malattia di Bechterew.

Malattia	Frequenza del B27 nei pazienti	Rischio relativo
Spondilite Anchilosante (malattia di Bechterew)	90.2 %	91
Malattia di Reiter	78.8 %	37.6
Artrite reattiva post-infezione	70.2 %	

Tabella 1: HLA-B27 Frequenze e rischi.

2. Materiale

2.1 Contenuto degli HISTO TYPE SSP kits

- ◆ Piastre o striscette HISTO TYPE per tipizzazioni HLA. Le mixes prealiquotate e liofilizzate includono i primers allele-specifici, i primers del controllo interno (specifici per il gene G3PDH umano) e i nucleotidi. La prima mix di reazione è contrassegnata (si prega di controllare lo schema di dispensazione delle mix a pag. 6). Nella maggior parte dei prodotti HISTO TYPE il controllo di contaminazione si trova nella prima o ultima posizione della piastra e può essere identificata da un colore differente (blu). Il numero di lotto è stampato su ogni piastra/strip.
- ◆ striscette (composte da 8 provette PCR) per il controllo di contaminazione con i primers del controllo interno e i primers specifici amplificati (non sono separate se il controllo di contaminazione è integrato nell'ultima posizione della piastra test e nel kit HISTO TYPE B27).
- ◆ PCR-buffer 10 x.
- ◆ Strisce di tappini o fogli adesivi PCR.
- ◆ CD informativo (contiene le istruzioni per l'uso di HISTO TYPE ed HISTO MATCH**, la tabella di specificità, diagramma d'interpretazione* e fogli di lavoro, elenco dei primer "non testati", batch file per HISTO MATCH** e SCORE*, certificato di qualità).
* non per HISTO TYPE B27 low/ ** non per HISTO TYPE B27 low e HISTO TYPE Narcolepsy

2.2 Materiale necessario supplementare

- ◆ Happy Taq Kit (REF 70976) (o altra Taq Polimerasi validata dall'utilizzatore con i kit HISTO TYPE). La Happy Taq è fornita gratuitamente coi kit HISTO TYPE.
Si prega di non utilizzare una Taq polimerasi hot-start!
- ◆ **BAG EXTRA-GENE** (REF: 7059) (facoltativo) Kit per l'estrazione di DNA da sangue / linfociti / leucociti o materiale per altri metodi di estrazione di DNA.
- ◆ Pipette a pistone (0,5-250 µl).
- ◆ Puntali sterili con filtro.
- ◆ Termociclatore (per es. PTC 200 con coperchio termostato, MJ Research/BioRad; si veda a pagina 9 una lista di termociclatori validati)

Dispositivi e materiale per l'elettroforesi del gel

- ◆ DNA agarosio
- ◆ Buffer TBE 0,5x (45 mM di Tris, 45 mM di acido borico, 0,5 mM di EDTA).
- ◆ Etidio bromuro (EtBr).
- ◆ Cella elettroforetica.
- ◆ Alimentatore (200-300 V, 200 mA).
- ◆ DNA-length standard (REF: 7097)

Dispositivi per l'interpretazione e la documentazione

- ◆ Transilluminatore UV (220-310 nm)

- ◆ Macchina fotografica (per es. sistema Polaroid) con pellicole (Polaroid tipo 667) o sistema di fotodocumentazione con carta termica (per es. KP65HM-CE).
- ◆ PC con il software di interpretazione HISTO MATCH (BAG Health Care) o SCORE (versione full).

2.3. Conservazione e stabilità

Il kit HISTO TYPE è spedito a temperatura ambiente. Una volta ricevuto, conservare tutti i reagenti a temperatura inferiore o uguale a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ o a $2...8^{\circ}\text{C}$ al buio (**si consiglia di evitare frequenti cambi della temperatura di conservazione**). La Happy Taq viene spedita in ghiaccio secco o blocchi refrigerati. Conservare la Happy Taq a $< -20^{\circ}\text{C}$. Utilizzare frigoriferi a temperatura controllata.

La data di scadenza viene indicata sull'etichetta di ogni reagente ed è valida anche per i reagenti aperti. La data di scadenza indicata sull'etichetta esterna si riferisce al reagente contenuto nel kit con la stabilità più breve.

3. Dati per l'esecuzione

La composizione della miscela di primer consente una identificazione affidabile degli alleli HLA (sulla base delle informazioni di sequenza più recenti disponibili) indicate nel diagramma di valutazione. Regolarmente vengono eseguiti aggiornamenti.

L'accuratezza e ripetibilità della specificità di ogni miscela di primer è stata verificata per ciascun lotto con campioni di riferimento ad assetto antigenico HLA noto. Alleli non rilevati sono indicati nei documenti di valutazione.

E' stato condotto uno studio di prestazioni per tutti i kit HISTO TYPE SSP con almeno 50 campioni di DNA. Il confronto con i risultati dei test ottenuti con kit SSP di un altro fornitore non ha mostrato alcuna discrepanza.

La valutazione e il controllo di qualità delle mix sono stati eseguiti con campioni di DNA estratti con kit Extra Gene I (metodo salting out) o Qiagen (metodo su colonna). I kit HISTO TYPE sono stati validati con la Happy Taq (REF 70976) o con la Taq Polimerasi del kit Happy Taq (REF 70977). Nel caso in cui si vogliono utilizzare altri enzimi, è necessario che l'utilizzatore validi il reagente con i kit HISTO TYPE.

Si consiglia di utilizzare **25- 50 ng** di DNA per mix di reazione.

4. Procedura del test

4.1 Condizioni di sicurezza ed indicazioni speciali

La PCR è un metodo particolarmente sensibile e dovrebbe essere eseguito da personale debitamente addestrato con esperienza in tecniche di genetica molecolare e di istocompatibilità. Dovrebbero essere seguite le linee guida dei trapianti così come gli standard EFI per ridurre i rischi di false tipizzazioni, nel caso particolare di discrepanze tra il metodo sierologico e quello di genetica molecolare.

Si devono osservare condizioni speciali di sicurezza per evitare contaminazioni e perciò false reazioni:

- ◆ Indossare i guanti durante il lavoro (se possibile senza polvere).
- ◆ Usare nuovi puntali per ogni semina (con filtro integrato).
- ◆ Usare aree di lavoro separate per la pre-amplificazione (estrazione del DNA e preparazione delle reazioni) e post-amplificazione (elettroforesi del gel e documentazione). Usare preferibilmente due stanze separate.
- ◆ Usare dispositivi ed altro materiale solo nei rispettivi posti e non scambiarli.

4.2 Estrazione del DNA

BAG EXTRA-GENE kit è ideale per l'estrazione poiché si può ottenere DNA puro da sangue intero in breve tempo senza usare reagenti chimici tossici o solventi. Inoltre, metodiche commerciali su colonna o basate su biglie ed altri metodi descritti in letteratura sono idonei per fornire una sufficiente purezza del DNA. La presenza di eparina

potenzialmente inibisce la PCR [6]. Perciò per la tipizzazione si consiglia sangue in EDTA o citrato. Il DNA dovrebbe avere i seguenti valori di purezza:

OD_{260}/OD_{280} = contaminazione con RNA: > 1.5 e > 2.0

OD_{260}/OD_{230} = contaminazione con sali, carboidrati o solventi organici: > 1.8.

4.3 Amplificazione

Tutte le mixes prealiquotate e liofilizzate contengono i primers allele-specifici, i primers di controllo e i nucleotidi. Questi sono forniti liofilizzati nel fondo delle provette di reazione. I parametri di amplificazione sono ottimizzati ad un volume finale di 10 µl.

1. Prelevare il numero richiesto di piastre/strip e il PCR-buffer 10 x dal kit.
2. Preparare la Master-Mix composta dal PCR-buffer 10 x, soluzione di DNA, Taq-Polymerase e Acqua dist. e miscelare bene. I differenti HISTO TYPE SSP Kits lavorano con la stessa Master-Mix e perciò possono essere combinati. La composizione della Master-Mix dipende dal numero di reazioni ed è esposta nella Tabella 1 (pag. 8).

Per HISTO TYPE B27 si consiglia di allestire una **soluzione Taq-buffer-H₂O**:

0.08 µl Taq polymerase (5 U/µl) *x n. di determinazioni + 1*

1.0 µl 10 x PCR buffer *x n. di determinazioni + 1*

7.0 µl H₂O *x n. di determinazioni + 1*

Miscelare bene la soluzione ed aggiungerne **8,0 µl** alla provetta di reazione.

Quindi aggiungere **2.0 µl di soluzione DNA (12.5-25 ng/µl)** nelle provette corrispondenti.

Se si deve eseguire il **controllo di contaminazione**, preparare prima la Master-Mix senza la soluzione di DNA e seminare 10 µl di questa miscela nel controllo di contaminazione (colorato in blu). In seguito aggiungere la soluzione di DNA e seminare la Master-Mix nelle provette di reazione preseminate.

Tabella 1: Composizione della Master-Mix in funzione del numero di reazioni

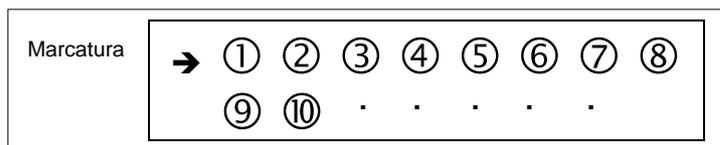
nr. di mixes	Acqua dist.	PCR buffer 10x	Soluzione DNA (25-40 ng/µl)	Happy-Taq (5 U/µl)	Volume totale	
1	8	1	1	0.08	10	µl
4	63	8	8	0.6	80	µl
8	79	10	10	0.8	100	µl
24	222	28	28	2.2	280	µl
30	269	34	34	2.7	340	µl
32	285	36	36	2.9	360	µl
48	412	52	52	4.2	520	µl
54	459	58	58	4.6	580	µl
56	475	60	60	4.8	600	µl
72	618	78	78	6.2	780	µl
80	681	86	86	6.9	860	µl
96	808	102	102	8.2	1020	µl

⇒ la quantità di DNA dovrebbe essere compresa tra **25 e 40 ng** per mix. a seconda della concentrazione di DNA, occorre variare le quantità di acqua e DNA da aggiungere.

(per es. per 24 mixes: 28 µl soluzione di DNA (50 ng/µl) e 222 µl Acqua dist.).

⇒ Nel caso in cui si vogliono utilizzare altri enzimi, è necessario che l'utilizzatore validi il reagente con i kit HISTO TYPE.

3. Dopo aver vortexato seminare immediatamente **10 µl** di questa miscela nelle provette di reazione preseminate. Cambiare il puntale dopo ogni semina. Chiudere bene le provette con i rispettivi tappi. Assicurarsi di non toccare con le dita la parte interna dei tappi ed il bordo superiore delle provette, per evitare la contaminazione. Se si usano termociclatori con coperchio a chiusura ermetica, è anche possibile usare PCR mat riciclabili.



Scuotere leggermente la piastra/striscetta verso il basso per dissolvere il pellet blu sul fondo della piastra. Tutte le soluzioni PCR devono depositarsi sul fondo. Se necessario, procedere a un preve spin della piastra/strip.

Nota per HISTO TYPE B*57:01/B*51

Qualora sia richiesta solo l'indagine su B*57:01 o B*51, aggiungere la Master mix solo alle corrispondenti microprovette di reazione (per la specificità delle mix di reazione si prega di consultare la relativa tabella inclusa nel CD informativo).

4. Mettere le provette di reazione nel termociclatore e chiudere il coperchio in modo che le provette di reazione non si deformino riscaldandosi. Iniziare il programma PCR. Se viene usato un coperchio termostato **non** è necessario aggiungere olio minerale all'interno delle provette!

Parametri di amplificazione:

Programma	Temp.	Tempo	Numero di cicli
Prima denaturazione	96°C	5 Min	1 ciclo
Denaturazione	96°C	20 Sec	5 cicli
Annealing+Estensione	68°C	1 Min	
Denaturazione	96°C	20 Sec	10 cicli
Annealing	64°C	50 Sec	
Estensione	72°C	45 Sec	
Denaturazione	96°C	20 Sec	15 cicli
Annealing	61°C	50 Sec	
Estensione	72°C	45 Sec	
Estensione finale	72°C	5 Min	1 ciclo

Termociclatori validati:

PTC 100 / 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad), GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (utilizzare modalità di riscaldamento 9600), Veriti (ABI), Mastercycler epGradient S (si prega di utilizzare la funzione "simulate Mastercycler gradient") (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra)

Si consiglia di non utilizzare blocchi riscaldanti in alluminio (come su GeneAmp PCR System 9600/9700).

Con termociclatori che hanno una velocità elevata di raffreddamento riscaldamento, si consiglia comunque di utilizzare un programma di ramping a velocità inferiore (ca. 2.5°C/sec).

Poichè i termociclatori di produttori diversi hanno performance diverse ed anche i singoli apparecchi dello stesso tipo possono funzionare in modo diverso, potrebbe essere necessario, nel caso in cui si utilizzino altri tipi di amplificatori, ottimizzare i parametri di amplificazione o validare l'amplificatore da parte dell'utente.

Per ottimizzare il vostro apparecchio seguire le istruzioni seguenti:

Con reazioni **false positive** (bande non specifiche o addizionali): aumentare la temperatura di annealing di 1°C .

Con reazioni **false negative** (bande assenti): diminuire la temperatura di annealing di 1°C e/o aumentare i tempi di annealing di 5 secondi e/o aumentare i tempi di denaturazione di 5 secondi.

Si consiglia di usare solo termociclatori regolarmente calibrati. Per questo il BAG-Cycler Check kit è ideale (REF: 7104, 71044).

I test per il controllo di qualità sono stati eseguiti su un PTC-200 / C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra).

4.4 Gel elettroforesi

La separazione dei prodotti ottenuti con l'amplificazione si effettua tramite gel di agarosio in elettroforesi orizzontale. Si consiglia come tampone per l'elettroforesi TBE 0,5 x (45 mM di tris, 45 mM di acido borico, 0.5 mM di EDTA). La concentrazione del gel dovrebbe essere 2.0 - 2.5% di agarosio. Lasciare polimerizzare il gel per almeno 30 minuti prima di caricare il campione. Al termine dell'amplificazione, prelevare i campioni dal termociclatore e caricare con attenzione ciascuna miscela di reazione (10 µl) in ogni pozzetto del gel. Inoltre caricare 10 µl di DNA length standard per la valutazione del peso molecolare. La corsa elettroforetica è eseguita a 10-12 V/cm (con elettrodi distanti 20 cm, 200-240 V circa) per 20-40 min. Al termine della corsa il gel viene immerso in una soluzione di etidiobromuro (EtBr) (circa 0.5 µg/ml di EtBr in H₂O o buffer TBE) per 30-40 min.. In alternativa l'EtBr (0.5 µg/ml) può essere aggiunto al buffer per elettroforesi o al gel di agarosio. Se necessario rimuovere l'EtBr in eccesso immergendo il gel in H₂O o buffer TBE 0,5 x per 20-30 minuti.

4.5 Documentazione ed interpretazione

Per la documentazione visualizzare il prodotto di amplificazione usando un transilluminatore UV (220-310 nm) e fotografare con una macchina fotografica, un filtro e una pellicola adatti (per es. polaroid con pellicole 667). Scegliere i tempi di esposizione e di apertura in modo che le bande siano ben visibili e risaltino sullo sfondo scuro (per esempio apertura 11, tempo di esposizione 1 secondo).

Per l'interpretazione usare la tabella delle specificità ed il diagramma d'interpretazione (vedere il CD informativo); sono da considerare positive solo le bande che hanno un peso molecolare corretto in confronto al DNA length standard.

Per HISTO TYPE B27 le bande hanno dimensioni di 420 bp e/o 85 bp.

Per gli altri kit HISTO TYPE le dimensioni corrette sono indicate nella tabella con il diagramma di specificità. Il controllo interno a **1070 bp** (o **1070 bp / 429 bp** per HISTO TYPE Celiac Disease) deve essere chiaramente visibile nei pozzetti dove non c'è amplificazione allele-specifica. In alcuni casi dove c'è un'amplificazione allele-specifica il controllo interno può essere più debole o scomparire completamente. Se non compare né una banda specifica né il controllo interno, il risultato ottenuto con tale mix non può essere utilizzato in analisi. Per determinare possibili cause di risultati non analizzabili vedere la "Risoluzione dei problemi" (6.).

Nel **controllo di contaminazione** non dovrebbe essere visibile alcuna banda. In caso di contaminazione con DNA genomico ci sarà una banda a 282 bp. Potrebbero verificarsi bande addizionali a 78 bp, 104 bp, 176 bp e 580 bp ca.. In caso di contaminazione con DNA amplificato ci sarà una banda a 78 bp e/o a 104 bp e/o a 176 bp e/o a 282 bp e/o a 580 bp.

Per l'interpretazione è necessario utilizzare il software HISTO MATCH (gratuito della BAG Health Care) o SCORE (versione full), ad eccezione del kit HISTO TYPE B27 low ed HISTO TYPE Narcolepsy. I batch file necessari per la valutazione sono presenti sul CD informativo e altresì disponibili sul server download (<http://service.bag-healthcare.com>) o telefonando al servizio di customer service (tel.: +49 (0) 6404-925-125).

5. Avvertenze e precauzioni

L'etidibromuro è un potente mutageno. Indossare i guanti quando si maneggiano gels o soluzioni contenenti EtBr! Fare riferimento alle istruzioni, alle avvertenze e alle precauzioni d'uso del produttore! Il transilluminatore UV emette onde molto corte che possono causare bruciature alla pelle e alla retina. Usare una maschera per la protezione facciale UV! Tutti i materiali biologici impiegati per l'estrazione del DNA, per es. sangue o tessuto umano, devono essere maneggiati come potenzialmente infetti. Si consigliano precauzioni di sicurezza appropriate quando si maneggiano materiali biologici (non pipettare con la bocca; indossare guanti monouso quando si maneggia materiale biologico e si esegue il test; al termine del test disinfettare le mani).

Il materiale biologico deve essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave). Il materiale smaltito deve essere autoclavato dopo l'uso.

La fuoriuscita di materiale potenzialmente infetto deve essere rimosso immediatamente con carta assorbente e le aree contaminate pulite con un disinfettante standard o con etanolo al 70%. Il materiale usato per pulire le fuoriuscite, incluso i guanti, deve essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave).

Lo smaltimento di tutti i campioni, reagenti inutilizzati e rifiuti dovrebbe effettuarsi in accordo alle leggi comunitarie, statali o locali.

E' possibile scaricare una dichiarazione riguardante le schede di sicurezza (MSDS) dal sito www.bag-healthcare.com.

6. Soluzione dei problemi

Problema	Possibile causa	Soluzione
nessuna amplificazione, length standard visibile	DNA contaminato con inibitori di PCR	ripetere l'estrazione del DNA, provare metodi diversi
	concentrazione di DNA troppo alta / troppo bassa	modificare la concentrazione di DNA / ripetere l'estrazione di DNA
	enzima mancante o concentrazione troppo bassa	ripetere la tipizzazione, modificare la concentrazione dell'enzima
	DNA da sangue in eparina	ripetere la tipizzazione con sangue in EDTA
	parametri di amplificazione errati	ottimizzare i parametri di amplificazione (vedere 4.3) ☆
Ripetuto insuccesso in ciascun pozzetto (nessun controllo di amplificazione)	perdita nelle provette di reazione; evaporazione di acqua e variazione della concentrazione durante la PCR	chiudere bene le provette con i tappi
amplificazione aspecifica, bande addizionali, (bande addizionali di dimensioni errate devono essere trascurate)	contaminazione con prodotti di amplificazione	ripetere la tipizzazione, assicurarsi dell'esatta procedura del lavoro
	DNA contaminato con sali	ripetere l'estrazione di DNA, provare metodi diversi
	concentrazione di DNA troppo alta	usare meno DNA
	concentrazione dell'enzima troppo alta	usare meno enzima
l'interpretazione mostra più di 2 specificità	parametri di amplificazione errati	ottimizzare i parametri di amplificazione (vedi 4.3) ☆
	contaminazione carry-over (prodotti di amplificazione!) nuovo allele	controllare la Master Mix (senza aggiunta di DNA) assicurarsi dell'esatta procedura del lavoro
nessuna banda visibile o molto debole, length standard invisibile	colorazione troppo debole	ripetere la colorazione
lo sfondo del gel è troppo chiaro	colorazione troppo forte, concentrazione di colorante troppo alta	immergere il gel in H ₂ O o TBE per diminuire la concentrazione di colorante
bande confuse	buffer per elettroforesi troppo caldo o riutilizzato troppe volte, composizione errata del tampone, mancata o cattiva polimerizzazione del gel	diminuire il voltaggio usare buffer TBE 0,5 x utilizzare un gel completamente polimerizzato

☆ Quando si usano i reagenti ed il materiale elencato, considerare come ultima risorsa l'ottimizzazione dei parametri di amplificazione. In molti casi, è possibile interpretare il test eliminando le bande addizionali che hanno pesi molecolari non corretti.

7. Riferimenti

1. Bodmer, J., 1993. *Immunogenetics* **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. *Tissue Antigens* **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. *Tissue Antigens* **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Nègre, S., 1993. *Trends in Genetics* **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. *BioTechniques* **9**:166
7. Bunce, M., 1995. *Tissue Antigens* **46**:355-367
8. Sacchetti et al., 1997. *Clin Chem* **43**:2204-2206
9. Edwin Liu et al., 2005. *Gastroenterology* **128**:33.37
10. Husby et al., 2012. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **54**:136-160
11. *Deutsches Ärzteblatt vom 10.03.2008*
12. Mallal et al., *Lancet* 2002; 359: 727-732
13. Mallal et al., *New England Journal of Medicine* 2008; 358: 568-579
14. Menthon et al., *Arthritis & Rheumatism* 2009; 61:1287-1296; DOI 10.1002/art.24642
15. Nishino, S. et al., 2000. *Sleep Medicine Reviews* **4**:75-99
16. Mignot, E. et al., 2001. *Am. J. Hum. Genet.* **68**:686-699
17. Overeem, S. et al. 2008. *Sleep Medicine Reviews* **12**:95-107
18. Brewerton, DA et al., 1973. *Lancet* **i**:904-907
19. Schlosstien L et al., 1973. *N. Engl. J. Med.* 288:704-706

8. Spiegazione dei simboli usati sulle etichette

	Temperatura di conservazione / Limiti di temperatura
	Temperatura di conservazione / Limite inf. di temperatura
	Utilizzare fino a
	Consultare le istruzioni d'uso
	Attenzione
	Sufficiente per n tests
	Fabbricante
CONT	Contenuto, contiene
CONTROL CC	Controllo di contaminazione
eIFU	Istruzioni d'uso elettroniche
HLA TYPING	Destinazione d'uso: tipizzazione HLA
HISTO TYPE INFORMATION CD	CD (contiene istruzioni d'uso, file per la valutazione, certificato di qualità)
IFU	Istruzioni d'uso
IVD	Per uso diagnostico in vitro
LOT	Numero di lotto
OR	Oppure
PCRBUF 10x	Buffer PCR, 10x concentrato
PCRCAP	Tappini PCR
PCRFOIL	Fogli adesivi PCR
PCRPLATE	Piastre PCR
PCRSTRIP	Strip PCR
REACTIONMIX	Mix di reazione
REF	Numero di catalogo
RTU	Pronto all'uso
TAQ POLYMERASE	Taq-Polymerase
WORKSHEET	Foglio di lavoro

Per le istruzioni d'uso in altre lingue si veda:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

o telefonare al: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 450 Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 125
Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 0 www.bag-healthcare.com
Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering: Customer Service:

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 460
verkauf@bag-healthcare.com

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 421
service@bag-healthcare.com