

Uputstvo za upotrebu HISTO TYPE SSP Kits

CE 0123

IVD

Pakovanja testova za tipizaciju HLA alela tkiva na osnovu molekularne genetike (Klasa I: HLA-A, B, C i Klasa II: HLA-DR, DQ)

spremno za upotrebu, već razliveno

REF 70721	HISTO TYPE A low	REF 707211	HISTO TYPE A Happy Pack
REF 70731	HISTO TYPE B low	REF 707311	HISTO TYPE B Happy Pack
REF 70741	HISTO TYPE C low	REF 707411	HISTO TYPE C Happy Pack
REF 70751	HISTO TYPE DR low	REF 707511	HISTO TYPE DR Happy Pack
REF 70891	HISTO TYPE DQB low	REF 708911	HISTO TYPE DQB Happy Pack
REF 7098	HISTO TYPE ABDR	REF 709811	HISTO TYPE ABDR Happy Pack
REF 7102	HISTO TYPE ABC	REF 710211	HISTO TYPE ABC Happy Pack
REF 7103	HISTO TYPE DR/DQB	REF 710311	HISTO TYPE DR/DQB Happy Pack
REF 709010	HISTO TYPE DQB high	REF 709011	HISTO TYPE DQB high Happy Pack
REF 7070	HISTO TYPE B27 low	REF 707011	HISTO TYPE B27 (48) Happy Pack
REF 7071	HISTO TYPE B27 low	REF 707111	HISTO TYPE B27 (96) Happy Pack
REF 70941	HISTO TYPE Celiac Disease	REF 709411	HISTO TYPE Celiac Disease Happy Pack
REF 70715	HISTO TYPE B57	REF 707151	HISTO TYPE B57 Happy Pack
REF 70716	HISTO TYPE Narcolepsy	REF 707161	HISTO TYPE Narcolepsy Happy Pack

HISTO TYPE Happy Pack pakovanja sadrže HISTO TYPE Kit i Happy Taq polimerazu.

Sadržaj

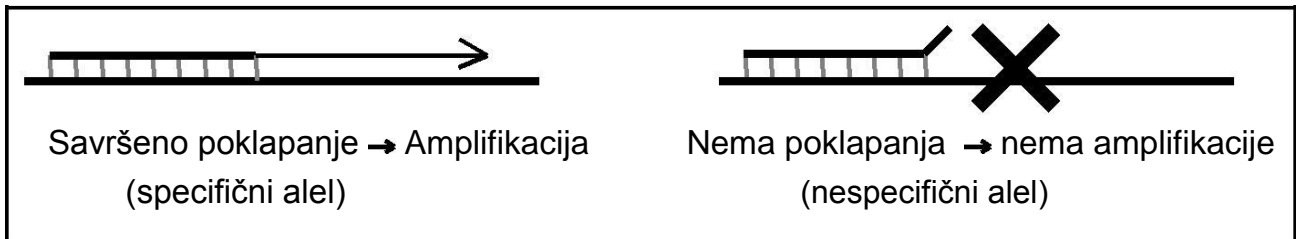
1. Opis proizvoda	2
1.1 Kratki pregled HISTO TYPE Celijačna Bolest	2
1.2 Kratki pregled HISTO TYPE B57	2
1.3 Kratki pregled HISTO TYPE Narkolepsija	2
1.4 Kratki pregled HISTO TYPE B27	2
2. Materijal	3
2.1 Sadržaj pakovanja HISTO TYPE SSP	3
2.2 Sadržaj pakovanja HISTO TYPE Happy Pack	3
2.3 Uslovi rada i dodatno potreban materijal	4
2.4 Čuvanje i stabilnost	4
3. Performanse testa	4
4. Procedura testa	5
4.1 Sigurnosne mere i posebne napomene	5
4.2 DNK izolacija	5
4.3 Amplifikacija	5
4.4 Gel elektroforeza	8
4.5 Dokumentovanje i tumačenje	8
5. Upozorenja i mere predostrožnosti	9
6. Moguće poteškoće u radu	9
7. Reference	10
8. Objašnjenja simbola korišćenih na nalepnicama	11

Verzija: 12/2014 / Izdato: 2014-05

1. Opis proizvoda

Korišćenje polimeraza lančane reakcije (PCR) u HLA tipizaciji postalo je uobičajeno. Sekvenciranje HLA alela [1] olakšalo je jasnu tipizaciju visoke rezolucije na nivou DNK i ima brojne prednosti u odnosu na tradicionalno korišćene serološke metode.

Za tipizaciju pomoću **HISTO TYPE SSP testova** početni materijal je prečišćena DNK. Test se obavlja pomoću PCR-a prajmerima specifičnim za sekvencu (Sequence Specific Primers, SSP) (videti Sliku 1) [2,3]. Ovaj metod se zasniva na činjenici da ekstenzija prajmera, i time i uspešan PCR, zahteva postojanje savršene komplementarnosti (match) na 3'- kraju oba prajmera. Shodno tome, samo ako prajmeri u potpunosti odgovaraju target sekvenci može doći do amplifikacije koja se zatim vizualizuje elektroforezom na agaroznom gelu.



Slika 1: SSP-PCR princip

Sastav mešavine pojedinačnih prajmera omogućuje nedvosmislenu identifikaciju HLA tipova, kao što je navedeno u odgovarajućim dijagramima za evaluaciju. Za svaku tipizaciju koristi se određen broj **prealikvotiranih** i **osušenih** reakcionih smeša, uključujući i internu kontrolu amplifikacije, konačne zapremine od 10 µl.

1.1 Kratak pregled HISTO TYPE kita za celijačnu bolest

Celijačna bolest je autoimuna reakcija na gluten, koji je sastojak različitih cerealija. Ukoliko se ne dijagnostikuje dovoljno rano, može dovesti do hronične inflamacije i oštećenja tankog creva. Celijačna bolest je u velikoj meri povezana sa haplotipovima DQA1*05:01-DQB1*02:01 i DQA1*03-DQB1*03:02. Pored toga, kao genetički markeri mogu se koristiti DR3, DR7 i DR11. [8-10]

1.2 Kratak pregled HISTO TYPE 57

Tretman pacijenata antiretroviralnim lekovima koji sadrže aktivnu supstancu Abacavir (kao npr. u terapiji HIV-a) dozvoljen je samo ako pacijent nema alel HLA B*57:01. Uzrok tome je moguća reakcija preosetljivosti koja je povezana sa ovim alelom. [11-13]

1.3 Kratak pregled HISTO TYPE za narkolepsiju

Narkolepsija je poremećaj sna sa simptomima kao što su preterana pospanost u toku dana, paraliza u toku sna ili halucinacije. 98 % pacijenata sa narkolepsijom, bele rase, ima haplotip DRB1*15:01 – DQA1*01:02 –DQB1*06:02. Zbog toga je HLA tipizacija od pomoći prilikom potvrđivanja ili isključivanja dijagnoze. [14-16]

1.4 Kratak pregled HISTO TYPE B27

Povezanost određenih HLA tipova sa određenim bolestima uočena je za više od 40 kombinacija. Najvažnija je povezanost HLA-B27 sa slikom bolesti seronegativnog artritisa

(Bechterew bolest, reaktivni artritis). Pozitivan HLA-B27 rezultat povezan je sa veoma visokim rizikom od bolesti (videti Tabelu 1) [17,18]. Još važnije, potvrđen dijagnostički HLA-B27 rezultat značajno doprinosi terapiji pacijenta kod nejasnih slučajeva sumnje na Bechterew-u bolest.

Bolest	B27 učestalost kod pacijenata	Relativni rizik
Ankilozantni spondilitis	90.2 %	91
Reiter-ova bolest	78.8 %	37.6
Post-infektivni reaktivni artritis	70.2 %	

Tabela 1: HLA-B27 Učestalosti i rizici.

2. Materijal

2.1 Sadržina HISTO TYPE SSP kitova

- ◆ HISTO TYPE ploče/stripovi za HLA tipizaciju. Već razlivene osušene reakcione smeše sadrže alel specifične prajmere, prajmere interne kontrole (specifične za humani G3PDH gen) i nukleotide. Prvi reakcioni miks je označen (videti raspored mikseva na stranici 8). Kod nekih HISTO TYPE proizvoda na poslednjoj poziciji ploča nalazi se kontrola kontaminacije (videti priloženu tabelu specifičnosti pojedinačnih lotova i dijagram za evaluaciju). Na svakoj ploči/stripu odštampan je broj lota.
- ◆ PCR stripovi (komada 8) za kontrolu kontaminacije sa prajmerima interne kontrole i prajmerima specifičnim za amplifikat (nisu odvojeni ako je kontrola kontaminacije sadržana u test ploči na poslednjoj poziciji, i kod HISTO TYPE B27 kita).
- ◆ 10 x PCR-pufer
- ◆ Kapice za stripove ili PCR folija
- ◆ Uputstvo za upotrebu
- ◆ Tabela specifičnosti, dijagram za evaluaciju i radna lista (nisu sadržani u HISTO TYPE B27 kitu)

2.2 Sadržina pakovanja HISTO TYPE Happy Pack

- ◆ HISTO TYPE Kit (sadržaj videti pod 2.1)
- ◆ Happy Taq (REF 70976) spremna za upotrebu, 50 µl (250 U)/bočici, 5 U/µl, rekombinantni enzim, 5' → 3' egzozukleazna aktivnost

HISTO TYPE A Happy Pack:	1 x REF 70721, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B Happy Pack:	1 x REF 70731, 2 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE C Happy Pack:	1 x REF 70741, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DR Happy Pack:	1 x REF 70751, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DQB Happy Pack:	1 x REF 70891, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE ABDR Happy Pack:	1 x REF 7098, 4 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE ABC Happy Pack:	1 x REF 7102, 4 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DR/DQB Happy Pack:	1 x REF 7103, 2 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE DQB high Happy Pack:	1 x REF 709010, 2 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B27 (48) Happy Pack:	1 x REF 7070, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B27 (96) Happy Pack:	1 x REF 7071, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE Celiac Disease Happy Pack:	1 x REF 70941, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE B57 Happy Pack:	1 x REF 70715, 1 x Happy Taq REF 70976
HISTO TYPE Narcolepsy Happy Pack:	1 x REF 70716, 1 x Happy Taq REF 70976

2.3 Dodatni materijal potreban za rad

- ◆ Happy Taq Kit (REF 70977) (ili druga taq polimeraza, koju korisnik treba da validira za rad sa HISTO TYPE kitovima). Potrebno samo za HISTO TYPE kitove. HISTO TYPE Happy Pakovanja isporučuju se sa potrebnom količinom Happy Taq polimeraze (videti 2.2)
Molimo da ne koristite Hot Start polimerazu!
- ◆ **BAG EXTRA-GENE I Kit (REF 7059)** za DNK ekstrakciju iz krvi / limfocita / leukocita ili materijal za druge metode DNK ekstrakcije
- ◆ automatske pipete (0.5-250 µl)
- ◆ sterilni nastavci za pipete sa filterom
- ◆ DNK sajklar (za listu validiranih termosajklera pogledati stranu 7)

Uređaji i materijal za gel elektroforezu

- ◆ DNK agarozna
- ◆ 0.5 x TBE pufer (45 mM Tris baze, 45 mM borne kiseline, 0.5 mM EDTA)
- ◆ Etidijum bromid (EtBr)
- ◆ kadica za elektroforezu
- ◆ napajanje (200-300 V, 200 mA)
- ◆ standard DNK-dužine (REF: 7097)

Uređaji za interpretaciju i dokumentaciju

- ◆ UV lampa (220-310 nm)
- ◆ kamera (npr. Polaroid sistem) sa filmovima (Polaroid tip 667) ili video sistem sa termalnim papirom (npr. tip KP65HM-CE)
- ◆ ako je moguće kompjuter i softver za evaluaciju HISTO MATCH (BAG Health Care) ili SCORE (kompletna verzija)

2.4. Čuvanje i stabilnost

HISTO TYPE kitovi se isporučuju na sobnoj temperaturi. Sve reagense nakon prispeća čuvajte na $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ili $2...8^{\circ}\text{C}$ u mraku, u uređajima sa nadzorom temperature (**Molimo da izbegavate često menjanje temperature čuvanja!**). U slučaju pakovanja HISTO TYPE Happy Pack, HISTO TYPE kitovi biće isporučeni na sobnoj temperaturi a Happy Taq polimeraza na suvom ledu. Sve reagense čuvajte na $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ili $2...8^{\circ}\text{C}$ u mraku, a Happy Taq polimerazu na $< -20^{\circ}\text{C}$ u uređajima sa nadzorom temperature u uređajima sa nadzorom temperature (Molimo da izbegavate često menjanje temperature čuvanja!) po prispeću. Rok trajanja je naznačen na nalepnici svakog reagensa i važi i za otvorene reagense. Rok trajanja na nalepnici spoljnog pakovanja odnosi se na reagens u kitu sa najkraćim rokom trajanja.

3. Podaci o performansima

Sastav smeše prajmera garantuje pouzdanu identifikaciju HLA-tipova (na osnovu poslednjih podataka o sekvencama) koji su navedeni u dijagramu evaluacije. Kit se redovno osavremenjuje.

Tačnost i reproducibilnost specifičnosti svake smeše prajmera verifikovane su za svaki lot korišćenjem referentnih uzoraka, sa poznatim HLA. U dijagramu za evaluaciju kao i u

tabeli specifičnosti navedeni su aleli koji nisu uključeni i koji zbog svoje retkosti nisu adekvatno testirani.

Za sve HISTO TYPE SSP kitove urađena je studija performansi na bar 30 DNK uzoraka. Poređenje sa test rezultatima drugih tipizacija, urađenih SSP kitovima drugog proizvođača, nije pokazalo neslaganja.

Evaluacija i kontrola kvaliteta mikseva rađena je na uzorcima DNK ekstrahovanim pomoću Extra Gene I (metod izoliranja) ili Qiagen kitova (metod sa kolonicama). HISTO TYPE kitovi su validirani sa Happy Taq polimerazom ([REF] 70976) ili sa Taq polimerazom iz Happy Taq Kita ([REF] 70977). Ako se koristi druga taq polimeraza, korisnik treba da validira enzim za rad sa HISTO TYPE kitovima.

Pouzdana tipiziranje se garantuje kada se koristi 25 - 50 ng DNK po reakcionoj smeši.

4. Procedura testa

4.1 Bezbednosni uslovi i posebne napomene

PCR je naročito osetljiv metod koji treba da primenjuju dobro obučene osobe, iskusne u tehnikama molekularne genetike i testovima histokompatibilnosti. Da bi se rizik od pogrešnog tipiziranja smanjio na minimum, naročito u slučaju diskrapanci između serološkog metoda i metoda molekularne genetike, treba pratiti propise za transplantaciju, kao i EFI- / DGI-standarde za transplantaciju.

Da bi se izbegla kontaminacija, a time i lažne reakcije, treba voditi računa o posebnim uslovima bezbednosti:

- ◆ Koristite rukavice tokom rada (ako je moguće bez talka).
- ◆ Za svaki korak pipetiranja uzmite nov nastavak (sa ugrađenim filterom).
- ◆ Koristite odvojene radne prostore za pre-amplifikaciju (DNK izolaciju i pripremanje reagenasa) i post-amplifikaciju (gel elektroforezu, dokumentaciju). Poželjno je koristiti dve odvojene prostorije.
- ◆ Koristite sredstva za rad i druge materijale samo na za to predviđenim mestima i nemojte ih razmenjivati.

4.2 DNK izolacija

BAG-ov EXTRA-GENE I kit je najpogodniji za izolaciju DNK jer se u kratkom roku njime dobija čista DNK iz pune krvi, bez upotrebe toksičnih hemikalija i rastvarača. Za dobijanje DNK zadovoljavajuće čistoće pogodni su i komercijalni metodi koji koriste kolonice ili partikule, kao i drugi metodi opisani u literaturi. Prisustvo heparina može da inhibira PCR [5]. Stoga se za tipizaciju preporučuje korišćenje krvi sa EDTA ili citratom.

DNK treba da ima sledeće indekse čistoće:

- $OD_{260}/OD_{280} = >1.5$ i <2.0 (indikator kontaminacije sa RNA /proteinima)
- $OD_{260}/OD_{230} = >1.8$ (indikator kontaminacije solima, ugljenim hidratima ili organskim rastvaračima)

4.3 Amplifikacija

Sve već razlivenne reakcione smeše već sadrže prajmere specifične za alele i kontrole, i nukleotide. Oni se nalaze osušeni u reakcionim posudicama. Parametri amplifikacije su optimizovani za konačnu zapreminu od 10 μ l.

1. Izvadite iz pakovanja potrebnu količinu HISTO TYPE HLA-SSP ploča ili stripova i 10 x PCR pufera.

2. Koristeći pipetu, napravite Master-Mix koji se sadrži od 10 x PCR-pufer, DNK rastvora, Taq-polimeraze i destilovane vode i dobro promešajte. Različiti HISTO TYPE SSP kitovi svi rade sa istim master miksom i stoga se mogu kombinovati. Sastav master miksa, zavisno od broja reakcionih smeša, dat je u Tabeli 1 (videti ispod).

U slučaju HISTO TYPE preporučuje se da se pripremi rastvor **Taq-pufer-H₂O**:

0.08 µl	Taq polimeraza (5 U/µl)	<i>x br. određivanja + 1</i>
1.0 µl	10 x PCR pufer	<i>x br. određivanja + 1</i>
7.0 µl	H ₂ O	<i>x br. određivanja + 1</i>

Dobro promešajte rastvor i dodajte ga po **8,0 µl** u svaku reakcionu tubicu.

Zatim dodajte **2.0 µl DNK rastvora** (12.5-25 ng/µl) u odgovarajuće reakcione tubice.

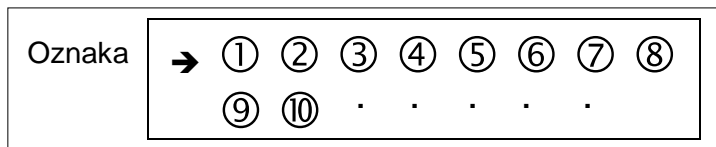
Ako treba da se radi **kontrola kontaminacije**, prvo napravite master miksa bez rastvora DNK i pipetirajte 10 µl ovog miksa u kontrolu kontaminacije (obojeno crveno). Zatim dodajte rastvor DNK i razlijte master miksa u već razlivene reakcione smeše.

Tabela 1: Sastav Master-Miksa zavisno od broja reakcionih smeša

broj mikseva	Dest.voda	10 x PCR pufer	DNK-rastvor (25-50 ng/µl)	Happy-Taq (5 U/µl)	ukupna zapremina
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

- ⇒ Količina DNK treba da je 25 – 50 ng po miksu. Količina DNK i vode treba da se podesi zavisno od koncentracije DNK. (npr. za 24 miksa: 14 µl rastvora DNK (100 ng/µl) i 236 µl destilovane vode).
- ⇒ Ako se koristi druga taq polimeraza, korisnik treba da validira enzim za rad sa HISTO TYPE kitovima.

- 3.: Nakon vorteksovanja, odmah dodati po **10 µl** ove smeše u unapred razlivene i osušene reakcione smeše. Nakon svakog koraka pipetiranja promenite nastavak. Čvrsto zatvorite tubice odgovarajućim kavicama ili folijom. Pazite da ne dotaknete prstima unutrašnju stranu kapica i gornje ivice tubica kako biste izbegli kontaminaciju. Ako koristite sajkler sa poklopcem koji se čvrsto zatvara, moguće je koristiti i PCR pokrivače za višekratnu upotrebu. Lagano protresite ploču/strip da bi se peleti sa dna ploče rastvorili. Svi PCR rastvori treba da padnu na dno ploče. Ako je potrebno treba kratko provrteti ploču/strip da bi se sadržaj oborio na dno.
- 4.: Stavite reakcione tubice u PCR sajkler i zatvorite čvrsto poklopac. Pokrenite PCR program. **Nije** potrebno pokrivati reakcione smeše mineralnim uljem ako se koristi podešen poklopac koji se greje!



Parametri amplifikacije

Programski korak	Temp.	Vreme	Broj ciklusa
Prva denaturacija	96°C	5 Min	1 Ciklus
Denaturacija	96°C	20 Sek	5 Ciklusa
Hibridiz. + ekstenzija	68°C	1 Min	
Denaturacija	96°C	20 Sek	10 Ciklusa
Hibridizacija prajmera	64°C	50 Sek	
Ekstenzija	72°C	45 Sek	
Denaturacija	96°C	20 Sek	15 Ciklusa
Hibridizacija prajmera	61°C	50 Sek	
Ekstenzija	72°C	45 Sek	
Finalna Ekstenzija	72°C	5 Min	1 Ciklus

Validirani tipovi sajklera:

PTC 100 / 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad),
GeneAmp PCR-System
9600 / 9700 (molimo da
koristite brzinu zagrevanja
9600) (ABI), Mastercycler
epGradient S (koristite
funkciju "simulate Mast
gradient") (Eppendorf),
Tprofessional (Biometra)

Molimo da ne koristite aluminijski grejni blok (npr. GeneAmp PCR-System 9600 / 9700).

Kada koristite termosajkler sa jako velikom brzinom hlađenja i zagrevanja, preporučujemo da koristite opciju sporijeg hlađenja i zagrevanja (~ 2.5°C/sec).

Budući da sajklери različitih proizvođača imaju različite performanse, pa čak i pojedine mašine istog tipa mogu biti različito kalibrisane, možda će biti neophodno da se parametri amplifikacije optimizuju. Ako se koriste modeli koji nisu na gore navedenoj listi validiranih uređaja, korisnik treba da ih validira.

Da biste optimizovali svoju mašinu, koristite sledeće preporuke:

U slučaju **lažno pozitivnih** reakcija (nespecifičnih traka, dodatnih tipova): Povećavati temperaturu hibridizacije prajmera postepeno za po 1°C.

U slučaju **lažno negativnih** reakcija (trake nedostaju): Smanjivati temperaturu hibridizacije prajmera postepeno za po 1°C i/ili povećavati periode hibridizacije postepeno za po 5 sekundi i/ili povećavati vreme denaturacije za po 5 sekundi.

Preporučuje se upotreba samo redovno kalibrisanih sajklera. Za ovo je veoma pogodan CYCLER CHECK kit (REF 7104).

Testiranje kontrole kvaliteta rađeno je na PTC-200 i C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) i Tprofessional (Biometra).

4.4 Gel elektroforeza

Razdvajanje produkata amplifikacije radi se gel elektroforezom na (horizontalnom) agaroznom gelu. Kao pufer za elektroforezu preporučuje se 0.5 x TBE (45 mM tris, 45 mM borne kiseline, 0.5 mM EDTA) pufer. Koncentracija agaroze u gelu treba da je 2.0 - 2.5%. Pustite da gel polimerizuje bar 30 minuta pre nanošenja uzoraka. Nakon što se amplifikacija završi, izvadite uzorke iz termosajklera i pažljivo unesite kompletne reakcione smeše u svaku rupicu u gelu. Dodatno nanosite 10 µl standarda DNK dužine da bi bilo moguće uporediti veličinu fragmenata. Elektroforetska separacija se radi na 10 - 12 V/cm (sa 20 cm udaljenosti između elektroda približno 200 - 240 V), tokom 20 - 40 minuta. Nakon što je razdvajanje završeno, ceo gel se boji 30 - 40 minuta u rastvoru etidijum bromida (EtBr) (približno 0.5 µg/ml EtBr u H₂O ili TBE puferu). Kao alternativa, EtBr (0.5 µg/ml) se može dodati i u pufer za elektroforezu ili u agarozni gel. Ako je potrebno, višak EtBr može se ukloniti potapanjem gela u H₂O ili 0.5 x TBE puferu 20 - 30 minuta.

4.5 Dokumentacija i interpretacija

Za dokumentovanje, vizualizujte PCR amplifikaciju koristeći UV transiluminator (220 - 310 nm) i fotografišite pogodnom kamerom, filmom i filterima (npr. Polaroid, film tip 667 ili video sistem, termalni papir KP65HM-CE). Birajte vreme ekspozicije i otvor blende tako da se trake oštro vide i ističu naspram tamne pozadine (približan otvor blende 11, vreme ekspozicije 1 sekund).

Prilikom interpretacije koristite Tabelu specifičnosti i dijagram za evaluaciju (videti dodatni papir); pozitivnima treba smatrati samo trake tačne veličine u poređenju sa standardom DNK dužine.

Kod HISTO TYPE B27, specifične trake imaju dužinu 420 bp i/ili 85 bp.

U slučaju drugih HISTO TYPE proizvoda, tačne veličine su date u Tabeli i dijagramu. U svim putanjama bez alel-specifične amplifikacije treba da je jasno vidljiva interna kontrola od **1070 bp (kod HISTO TYPE Celiac Disease 1070bp / 429bp)**. U većini slučajeva kada je alel-specifična amplifikacija prisutna, interna kontrola je slabija ili potpuno nestaje! Za neadekvatne rezultate videti poglavlje Moguće poteškoće u radu (6.).

U **kontroli kontaminacije** ne treba da bude vidljivih traka. Ako je prisutna kontaminacija genomskom DNK pojaviće se traka na 282 bp. Mogu se pojaviti dodatne trake na 78 bp, 104 bp, 176 bp i oko 580 bp. Ako je prisutna kontaminacija amplikonom, pojaviće se trake na 78 bp i/ili 104 bp i/ili 176 bp i/ili 282 bp i/ili 580 bp.

Preporučuje se da se evaluacija uradi pomoću softvera HISTO MATCH (BAG Health Care) ili SCORE (kompletna verzija). Fajlovi potrebni za evaluaciju mogu se skinuti sa servera (<http://service.bag-healthcare.com>) ili preko službe za pomoć korisniku (telefon: +49 (0)6404-925-125).

5. Upozorenja i mere predostrožnosti

Etidijum bromid je moćan mutagen. Kada radite sa gelom ili rastvorima koji sadrže EtBr koristite rukavice! Sledite uputstva za upotrebu i upozorenja i mere predostrožnosti proizvođača! Transiluminator emituje UV zrake veoma kratke talasne dužine koji mogu dovesti do opekotina na koži i oštećenja retine. Koristite masku za lice za zaštitu od UV! Sav biološki materijal, npr. krv ili ljudsko tkivo, korišćen za izolaciju DNK, treba da se smatra potencijalno infektivnim. U radu sa biološkim materijalom preporučuju se adekvatne mere predostrožnosti (ne pipetirati ustima; nositi rukavice za jednokratnu upotrebu u toku rada sa biološkim materijalom i izvođenja testa; dezinfikovati ruke nakon završetka testa).

Pre uklanjanja biološki materijal treba inaktivirati (npr. u autoklavu). Materijal za jednokratnu upotrebu treba autoklavirati ili spaliti.

Prosut potencijalno infektivan materijal treba odmah obrisati papirnim ubrusom i kontaminiranu površinu prebrisati pogodnim standardnim dezinficijensom ili 70% alkoholom. Materijal korišćen za uklanjanje prosutog sadržaja, uključujući i rukavice, treba inaktivirati pre bacanja (npr. u autoklavu).

6. Moguće poteškoće u radu i njihovo uklanjanje





Problem	Moguć uzrok	Rešenje
nema amplifikacije, standard dužine fragmenta vidljiv	DNK kontaminirana PCR inhibitorima	ponovite izolaciju DNK, probajte drugi metod
	DNK koncentracija previše visoka ili niska	promenite koncentraciju DNK, ponovite izolaciju
	enzim nije dodat ili je koncentracija preniska	ponovite tipizaciju, promenite koncentraciju enzima
	DNK iz krvi sa heparinom	ponovite tipizaciju koristeći krv sa EDTA
	pogrešni parametri amplifikacije	optimizujte parametre amplifikacije (videti 4.3) ☆
višestruka neuspešna amplifikacija u istoj putanji (nema kontrole amplifikacije)	curenje reakcionih tubica, gubitak vode i promenjena koncentracija u toku PCR	čvrsto zatvorite tubice kapičama, koristite druge tubice
nespecifična amplifikacija, dodatne trake (dodatne trake neodgovarajuće veličine treba zanemariti)	kontaminacija amplikonom	ponoviti tipizaciju, paziti da se precizno radi
	DNK kontaminirana solima	ponovite izolaciju DNK, probajte drugi metod
	DNK koncentracija previsoka	koristite manje DNK
	previsoka koncentracija enzima	koristite manje enzima
	pogrešni parametri amplifikacije	optimizujte parametre amplifikacije (videti 4.3) ☆
evaluacija pokazuje više od 2 specifičnosti	kontaminacija prenosom (proizvodi amplifikacije!), nov alel	proverite smeše za tipizaciju (bez dodate DNK), pazite da se radi precizno
nema vidljivih traka ili su jako slabe, nevidljiv standard dužine	EtBr bojenje previše slabo	ponoviti bojenje
pozadina na gelu isuviše svetla	predugo bojenje, previsoka koncentracija EtBr	potopite gel u H ₂ O ili TBE, smanjite koncentraciju EtBr
zamagljene trake	pufer za elektroforezu previše vruć ili previše korišćen, pogrešan pufer za elektroforezu, ili polimerizacija gela nije dobra	smanjite voltažu, koristite 0.5x TBE pufer

☆ Kada se koriste navedena oprema i materijal, optimizaciji parametara amplifikacije treba pribeći samo u krajnjem slučaju. U većini slučajeva moguće je evaluirati test jednostavno eliminisanjem dodatnih traka prouzrokovanih neslaganjem veličine.

7. Reference

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 at 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. Nishino, S. et al., 2000. Sleep Medicine Reviews **4**:75-99
15. Mignot, E. et al., 2001. Am. J. Hum. Genet. **68**:686-699
16. Overeem, S. et al. 2008. Sleep Medicine Reviews **12**:95-107
17. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
18. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706

8. Objašnjenja simbola na nalepnicama

	Temperatura čuvanja
	Koristiti do
	Videti uputstvo za upotrebu
	Dovoljno za n testova
CONT	Sadržaj, sadrži
CONTROL CC	Kontrola kontaminacije
HLA TYPING	Namenjeno za: HLA tipizaciju
IFU	Uputstvo za upotrebu
IVD	Za primenu u in vitro dijagnostici
LOT	Lot broj (broj šarže)
OR	Ili
PCRBUF 10x	PCR pufer, 10x koncentrovan
PCRCAP	PCR kapice
PCRFOIL	PCR folija
PCRPLATE	PCR ploče
PCRSTRIP	PCR stripovi
REACTIONMIX	Reakcione mešavine
REF	Kataloški broj
RTU	Spremno za upotrebu
TAQ POLYMERASE	Taq polimeraza
WORKSHEET	Radna lista

Uputstva za upotrebu na drugim jezicima možete videti ovde:

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

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

ili telefonom: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5 Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 0 www.baq-healthcare.com
35423 Lich / Germany Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250 info@baq-healthcare.com
service@baq-healthcare.com

Distributer za Srbiju:

Yunycom d.o.o.

Resavska 78b, Beograd
tel/fax: 011/3606-987
office@yunycom.rs

Korisnička podrška:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 125
Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 421