

Návod k použití

# KIR-TYPE Epitop-TYPE

Nízké rozlišení

Souprava pro typizace KIR genotypů a jejich HLA ligandů  
na molekulárně genetickém základu

10 typizací

Připraveno k použití, prealiquotováno

<b>REF</b>	<b>7105</b>	<b>KIR-TYPE</b>
<b>REF</b>	<b>7106</b>	<b>Epitop-TYPE</b>

**Obsah:**

1. Popis výrobku .....	2
2. Materiál.....	3
2.1.1 Složení soupravy KIR TYPE kit.....	3
2.1.2 Složení soupravy Epitop-TYPE kit .....	3
2.2 Další potřebné vybavení a reagentie .....	3
2.3 Skladování a stabilita .....	3
3. Výkonnost testu .....	3
4. Provedení testu.....	4
4.1 Bezpečnost práce a speciální poznámky .....	4
4.2 Izolace DNA.....	4
4.3 Amplifikace .....	4
4.4 Gelová elektroforéza.....	6
4.5 Dokumentace a interpretace výsledků .....	6
5. Varování a bezpečnostní opatření .....	6
6. Řešení problémů .....	7
7. Literatura .....	8
8. Vysvětlení symbolů použitých na etiketách .....	9

**Verze: 12/2017 / publikováno: 2017-03****Změny oproti verzi 11/2016 jsou zvýrazněny žlutě!**

## 1. Popis výrobku

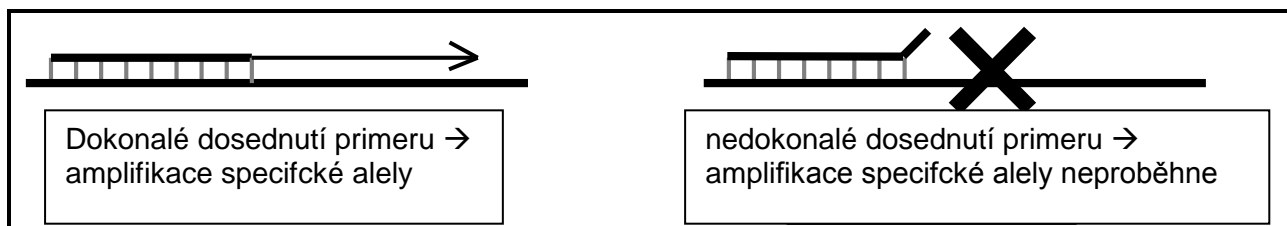
NK buňky (Natural killer cells, přirození zabíječi) a subpopulace T-lymfocytů s CD8<sup>+</sup> paměťovým fenotypem (1) nebo  $\gamma\delta$  T-buněčnými receptory exprimují na povrchu aktivační i inhibiční *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs). Díky rozdílům v počtu genů a velkému polymorfizmu v rámci jednotlivých genů vykazuje genová oblast KIR receptorů vysokou variabilitu mezi jednotlivými jedinci (3, 4). Byly identifikovány HLA molekuly třídy I., které váží jednotlivé KIR receptory (5, 6). Inhibiční receptory KIR2DL1 se váží na alely skupiny 2 HLA C lokusu, které mají aminokyseliny Asn<sup>77</sup> a Lys<sup>80</sup>, receptory KIR2DL2 / KIR2DL3 na alely skupiny 1 HLA C lokusu s aminokyselinami Ser<sup>77</sup> a Asn<sup>80</sup>, a receptory KIR3DL1 mají afinitu k alelám HLA-B s epitopem Bw4 v aminokyselinové pozici 77-83  $\alpha$ 1 helixu. Inhibiční receptor KIR3DL2 se váže na alely skupin HLA-A\*03 a \*11 (7). Ligandy pro aktivační KIR receptory nebyly zatím dostatečně popsány – ačkoliv předpokládáme, že mají afinitu ke stejným HLA-B a HLA-C molekulám jako jejich inhibující protějšky.

Nejvíce v současnosti akceptovaný model aktivace NK buněk je založen na předpokladu, že reaktivita NK buněk je kontrolována rovnováhou mezi aktivačními a inhibičními signály. A tedy aktivace NK buněk může být způsobena jak redukcí inhibičního signálu, tak nárůstem vazby aktivačních receptorů. Při procesech transformace (t.j. při nádorovém bujení či virové infekci), které doprovází výrazná exprese HLA jakožto ligandů a chybějící inhibiční signál vede k aktivaci NK buněk a lýzi cílové buňky. Tato pozorování vedla k hypotéze “chybějícího vlastního” – tedy, že zdravá tkáň se stabilní HLA expresí je ušetřena aktivace NK buněk (8).

Zvlášť velké množství prací ukázalo, že HLA/KIR nesourodost vede k reaktivitě NK buněk donora proti NK buňkám příjemce při transplantaci kostní dřeně a to konkrétně k omezení Graft versus Host Disease (Reakce štěpu proti hostiteli, GvHD) a relapsům (9). Dále pak jsou určité KIR genotypy asociovány s autoimunitními onemocněními (např. psoriáza), omezením plného rozvoje AIDS u HIV pacientů, s rizikem preeclampsie a akutním odmítáním štěpu po alogení transplantaci ledvin (10-14).

Souprava **KIR-TYPE** kit umožňuje genotypizaci 14 KIR genů a 2 pseudogenů. Naopak souprava **Epitop-TYPE** kit prokazuje alely HLA specifitu: HLA-Cw Asn<sup>80</sup>, HLA-Cw Lys<sup>80</sup>, HLA-B Bw4<sup>Threo</sup>, HLA-B Bw4<sup>Iso</sup> a HLA-A Bw4.

Průkaz jednotlivých KIR receptorů / KIR HLA ligandů je provedeno pomocí metody PCR-SSP (*PCR-sequence-specific primers*) (viz obr. 1) (13, 15).



Obr. 1: princip SSP-PCR

Metoda je založena na faktu, že extenze primerů a tedy i úspěšná PCR je závislá na dokonalém dosednutí na 3'-konci obou primerů. Jinými slovy, pouze při dokonalé shodě primerů s cílovou sekvencí dojde k amplifikaci, a ta může být následně vizualizována při agarózové elektroforéze. Výběr primerů specifických k určitým sekvencím umožňuje průkaz jednotlivých KIR / HLA genů na molekulárně genetickém základě.

Složení jednotlivých směsí primerů umožňuje jasnou identifikaci KIR genotypů / HLA specifit pomocí odpovídajících pracovních listů (worksheet). Pro typizaci je vždy použit určitý počet **prealiquotovaných** a **vysušených** reakčních směsí, které obsahují vnitřní kontrolu a doplní se na celkový objem 10 $\mu$ l.

## 2. Materiál

### 2.1.1 Obsah souprav KIR-TYPE kit

- ◆ KIR-TYPE destičky pro KIR typizaci. Předkapané, prealiquotované reakční směsi obsahují specifické primery, vnitřní kontrolu (specifická sekvence z chromozomu 1) a směs nukleotidů. První reakční směs je označena a obsahuje kontaminační / negativní kontrolu obsahující primery pro vnitřní kontrolu a k amplifikátům specifické primery. Poslední rekační směs obsahuje pozitivní kontrolu (poze primery vnitřní kontroly). Na každé destičce je vytištěno číslo šarže.
- ◆ 10 x PCR-pufr
- ◆ Víčka ke stripům (po osmi)
- ◆ Návod k použití, pracovní list, tabulka specifit

### 2.1.2 Obsah souprav Epitop-TYPE kit

- ◆ Epitop-TYPE stripy pro typizaci epitopů. Předkapané, prealiquotované reakční směsi obsahují specifické primery, vnitřní kontrolu (specifická sekvence z chromozomu 1) a směs nukleotidů. První reakční směs (vytištěným číslem šarže). Poslední rekační směs obsahuje kontaminační / negativní kontrolu.
- ◆ 10 x PCR- pufr
- ◆ Víčka ke stripům (po osmi)
- ◆ Návod k použití, pracovní list

## 2.2 Další potřebné vybavení a reagenty

- ◆ Taq polymeráza (5 U/μl), Happy Taq (REF 70976), (nebo jiná Taq polymeráza validovaná se soupravami KIR-TYPE / Epitop-TYPE uživatelem)  
**Nepoužívejte, prosíme, Hot-Start polymerázu!**
- ◆ **EXTRA-GENE I** Kit (REF 7059) (volitelné) pro extrakci DNA z krve / lymfocytů / leukocytů. Nebo jiná souprava na DNA izolaci.
- ◆ Pipety (0,5 – 250 μl)
- ◆ Sterilní špičky s integrovaným filtrem
- ◆ DNA cyklér (seznam validovaných cyklérů na straně 5)
- ◆ Agaróza pro separaci DNA
- ◆ 0,5xTBE pufr (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
- ◆ Ethidium bromid (EtBr)
- ◆ Jednotka na gelovou elektroforézu DNA
- ◆ DNA délkový standard (kat. č. 7097)
- ◆ Zdroj napětí (200-300V, 200mA)
- ◆ Zdroj UV záření (220-310 nm)
- ◆ systém na dokumentaci gelů

## 2.3. Skladování a stabilita

Soupravy jsou dodávány nezmrazené při pokojové teplotě. Po obdržení skladujte veškeré reagenty v temnu při  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  nebo při  $2^{\circ}\text{C} \dots 8^{\circ}\text{C}$  v temnu. **(Prosíme zabraňte častým změnám teploty skladování!)** Skladujte 10x PCR pufr při  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Skladujte v zařízeních s monitorovanou teplotou.

Datum expirace je uvedeno na štítku na každé reagentii a je platné i pro reagenty po prvním otevření. Datum expirace uvedené na obalu soupravy odpovídá reagentii s nejkratší dobou trvanlivosti.

## 3. Výkonost testu

Uspořádání reakčních směsí zaručuje hodnověrnou identifikaci KIR genotypů / HLA specifit typů podle evaluačních diagramů (založeno na posledních sekvenčních datech). Aktualizace dat se provádí a bude nadále pravidelně provádět.

Přesnost a reprodukovatelnost specifity každé směsi primerů byla potvrzená pomocí DNA z kontrolních vzorků se známou KIR / Epitop specifitou. Alely, které nejsou zahrnuty nebo nemohly být pro svoji vzácnost testovány, jsou na pracovním listu / tabulce specifit označeny.

Studie výkonosti souprav KIR-TYPE kit a Epitop-TYPE kit byly prováděny s minimálně 50 DNA vzorky. Porovnání s výsledky typizací provedených SSP testy od jiného výrobce neukázaly žádnou neshodu.

Evaluace a kontrola kvality směsí byla prováděna se vzorky DNA získanými pomocí soupravy EXTRA GENE I (vysolovací metoda), nebo souprav Qiagene (kolonková metoda). Soupravy KIR-TYPE a Epitop-TYPE jsou validované s polymerázou Happy Taq (kat.č. 70976). Při použití jiné Taq polymerázy musí uživatel validovat použití dotyčného enzymu se soupravami KIR-TYPE a Epitop-TYPE sám.

Hodnověrná typizace je garantována při použití 50 - 80 ng DNA na reakční směs.

## 4. Provedení testu

### 4.1 Bezpečnost práce a speciální poznámky

PCR je obzvláště citlivá metoda a měla by být prováděna dobře vyškolenými pracovníky se zkušenostmi v molekulárně-biologické práci a v testování histokompatibility. Dodržováním transplantčních směrnic a standardů EFI minimalizujete nebezpečí chybných typizací, obzvláště pak při neshodě sérologických a molekulárně-biologických výsledků.

Aby během pracovního postupu nedošlo ke kontaminaci a tím i chybným výsledkům, je nezbytné dodržovat následující:

- ◆ Při práci používejte rukavice (pokud možno bez pudru).
- ◆ Pro každé pipetování berte novou špičku (s integrovaným filtrem).
- ◆ Vyhradte oddělená pracovní místa pro pre-amplifikační (izolace DNA, příprava reakcí) a post-amplifikační (elektroforéza, dokumentace) část procesu. Kde je to možné, používejte oddělené místnosti.
- ◆ Nepoužívejte pipety a jiné pracovní pomůcky na více pracovních místech, nepřenášejte je. Používejte každou sadu pomůcek na jednom pracovním místě pro ni určeném.

### 4.2 Izolace DNA

Souprava **BAG EXTRA-GENE I** je nejvhodnějším nástrojem k izolaci, neboť čistá DNA je získána z plné krve v krátkém čase a bez použití toxických chemikálií či rozpouštědel. I jiné metody, jako jsou komerční kolonkové metody, extrakce pomocí partikulí nebo metody popsané v literatuře jsou použitelné pro získání DNA vhodné kvality. Přítomnost heparinu ve vzorku může blokovat PCR [6] a tedy vhodným materiálem pro typizaci je EDTA nebo citrátová krev.

DNA by měla mít následující indexy čistoty:

- $OD_{260}/OD_{280} = >1,5$  a  $<2,0$  (indikátor kontaminace RNA/proteiny)
- $OD_{260}/OD_{230} = >1,8$  (indikátor kontaminace solemi, cukry nebo organickými rozpouštědly)

### 4.3 Amplifikace

Veškeré prealiquotované a vysušené reakční směsi obsahují primery specifické pro danou alelu, stejně jako kontrolní primery a nukleotidy. Dodávány jsou vysušené na dně reakční zkumavky. Amplifikační parametry jsou nastaveny na celkový objem reakce 10  $\mu$ l.

1. Vyjměte odpovídající počet KIR-TYPE destiček / EPITOP-TYPE stripů z krabice a rozmraďte 10x PCR pufr.

2. Napipetujte Master-Mix obsahující 10 x PCR-pufr, roztok DNA, Taq-Polymerázu a dest. vodu a dobře promíchejte. Soupravy KIR-TYPE / Epitop-TYPE pracují se stejnými Master-Mixy jako jiné HISTO TYPE SSP soupravy a proto mohou být kombinovány. Složení Master-Mixů v závislosti na počtu reakcí najdete v Tabulce 1.

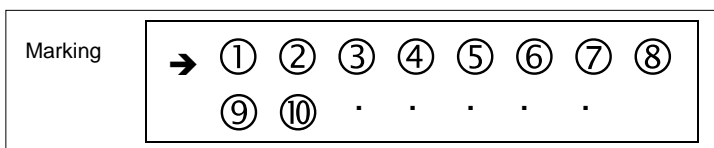
V případě, že má být prováděna **kontaminační kontrola**, připravte Master-Mix bez DNA. Napipetujte 10µl této směsi do kontaminační kontroly. Pak přidejte DNA a rozdělte Master-Mix do jednotlivých reakčních zkumavek a dobře promíchejte.

**Tabulka 1: Složení Master-Mixu v závislosti na počtu reakčních směsí.**

Počet směsí	Destil. H <sub>2</sub> O	10 x PCR pufr	Roztok DNA (25-40 ng/µl)	Happy Taq (5 U/µl)	Celkový objem
1	7	1	2	0,08	10 µl
<b>6</b>	<b>55</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>0,64</b>	<b>80 µl</b>
<b>22</b>	<b>180</b>	<b>26</b>	<b>52</b>	<b>2,1</b>	<b>260 µl</b>
28	221	32	64	2,6	320 µl

- ⇒ Množství DNA by mělo být 50 – 80 ng na 1 reakční směs (mix). Pro jiné koncentrace DNA je třeba změnit objem DNA roztoku a H<sub>2</sub>O (např. pro 22 reakčních směsí: 26 µl DNA roztoku (50 ng/µl) a 206 µl dest.H<sub>2</sub>O).
- ⇒ Pokud je použita jiná Taq polymeráza, musí uživatel sám validovat použití tohoto enzymu se soupravami KIR-TYPE kit / Epitop-TYPE.

1. Po promíchání na Vortexu přidejte okamžitě **10µl** této směsi do předkapaných reakčních směsí ve stripech. Vyměňujte špičku po každém pipetování. Pevně uzavřete mikrozkušavky víčky nebo fólií. Nedotýkejte se vnitřní strany víček, ani horních okrajů mikrozkušavek prsty, abyste maximálně omezili kontaminaci. U cyklérů s těsně uzavíratelnými víky lze použít i PCR kryty k opakovanému použití. Lehce klepněte **destičkou / stripem**, tak aby se Master-Mix dostal ke zbytku reagentů na dně mikrozkušavky v destičce/stripu a rozpustil pelet. Veškeré PCR reagenty by měly být na dně. Pokud je to nezbytné destičku/strip krátce stočte.
4. Vložte reakční mikrozkušavky do cykléru a upevněte těsně víko, aby se mikrozkušavky v průběhu PCR neotevřely. Nastavte a spusťte PCR program. Překrytí minerálním olejem **není** u cyklérů s vyhřívaným víkem nutné!



**Parametry amplifikace:**

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
První denaturace	94°C	<b>2 Min</b>	1
Denaturace	94°C	15 Sec	10
Annealing	65°C	50 Sec	
Extenze	72°C	45 Sec	
Denaturace	94°C	15 Sec	20
Annealing	61°C	50 Sec	
Extenze	72°C	30 Sec	

**Validované cykléry**

PTC 100 / 200 / C1000 (MJ Research/ BioRad),

GeneAmp PCR-System 9700 (prosíme, použijte faktor ohřevu 9600), Veriti (ABI),

Mastercycler epGradient S (prosíme, použijte funkci "simulate Mastercycler gradient") (Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

**Prosíme, nepoužívejte hliníkové bloky (jako např. GeneAmp PCR system 9600/9700).**

**Při použití cyklérů umožňujících velmi rychlé ohřívání a chlazení doporučujeme nastavit pomalejší ohřívání a chlazení (ramp rate) (cca 2,5 °C/s).**

Vzhledem k faktu, že cykléry od různých výrobců se liší svými parametry reakce a někdy i jednotlivé přístroje jednoho typu mohou být různě kalibrovány, může být někdy nutné optimalizovat amplifikační parametry. Pokud jsou použity jiné než výše zmíněné validované cykléry, je nutno aby je uživatel validoval.

K dosažení optimalizace vašeho přístroje postupujte následujícím způsobem:

Při **falešně pozitivních výsledcích** (nespecifické proužky, nadbytečné typy): zvyšujte teplotu annealingu v 1°C krocích.

Při **falešně negativních výsledcích** (absence proužků): snižujte teplotu annealingu v 1 °C krocích a/nebo zvyšujte dobu trvání annealingu v 5ti vteřinových krocích a/nebo zvyšujte dobu trvání denaturace v 5ti vteřinových krocích.

**Doporučujeme používat pouze pravidelně kalibrované cykléry.**

**Pro kalibraci je velmi vhodný BAG-CyclerCheck (kat.č. 7104, 71044).**

**Testy kontroly kvality byly prováděny na cyklérech PTC-200 resp. C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI) a Mastercycler epGradient S (Eppendorf) a Tprofessional (Biometra).**

#### 4.4 Gelová elektroforéza

Separace amplifikačních produktů se provádí pomocí gelové elektroforézy na horizontálním agarózovém gelu. Doporučeným pufrům pro elektroforézu je 0,5 x TBE (45 mM tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA). Koncentrace gelu by měla být 2,0-2,5% agarózy. Před vnesením vzorků nechte gel polymerizovat alespoň 30 minut. Po ukončení amplifikace vyjměte vzorky z cykléru a vnesete celý reakční objem vzorku opatrně do odpovídající jamky v gelu. Dále přidejte 10 µl DNA délkového standardu, tak aby bylo možno odečíst délku produktů amplifikace.

Elektroforetická separace se provádí při 10-12 V/cm (např. při 20cm vzdálenosti elektrod přibližně 200-240 V) po dobu 20-40 minut. Po ukončení běhu proveďte barvení celý gel v roztoku ethidiumbromidu (EtBr) (0,5 µg/ml EtBr ve vodě nebo TBE pufru) po dobu 30-40 minut. Jinou možností je přidat EtBr (0,5 µg/ml) do elektroforetického pufru, nebo přímo do gelu. Pokud je to potřeba, lze odstranit přebytečný EtBr z gelu máčením ve vodě nebo 0,5xTBE po dobu 20-30 minut.

#### 4.5 Dokumentace a interpretace výsledků

K zobrazení výsledků prosviťte gel UV transiluminátorem ( $\lambda=220-310$  nm) a vhodný systém pro dokumentaci gelů. Nastavte čas a expozici tak, aby proužky byly jasně viditelné oproti tmavšímu pozadí.

Pouze reakce s proužky, které mají při porovnání s délkovým standardem správnou délku, jsou považovány za pozitivní. Správná délka jednotlivých proužků je napsána v pracovním listu. Ve všech pozicích kde není přítomen specifický proužek, musí být jasně patrný proužek interní kontroly o délce **659 bp**. Ve většině případů je proužek vnitřní kontroly v přítomnosti specifického proužku slabý nebo zcela chybí!

**Pokud se neobjeví ani specifický proužek ani interní kontrola, výsledky s touto reakční směsí nemohou být použity pro vyhodnocení. Možné příčiny neinterpretovatelných výsledků najdete v kapitole 6 - Řešení problémů.**

V **kontaminační kontrole** by neměl být patrný žádný proužek. Pokud došlo ke kontaminaci genomickou DNA, bude přítomen proužek o délce 282 bp. Další proužky se mohou vyskytovat v pozicích 78 bp, 104 bp, 176 bp a 580 bp. V případě kontaminace amplifikáty budou patrné proužky o délce 78 bp a/nebo 104 bp a/nebo 176bp a nebo 282bp a nebo 580bp.

### 5. Varování a bezpečnostní opatření

Ethidiumbromid je silný mutagen. Při práci s gely nebo roztoky obsahujícími EtBr používejte rukavice. Postupujte podle návodu a bezpečnostních instrukcí výrobce! Transiluminátor vyzařuje velmi krátkovlnné UV záření, které může spálit kůži a sítnici. Používejte ochranný UV obličejový štít!

Veškerý materiál použitý pro extrakci DNA, tj. krev, tkáň atd., je třeba považovat za potenciálně infekční. Při práci s biologickým materiálem dodržujte standardní bezpečnostní opatření (nepipetujte ústy, používejte jednorázové rukavice, dezinfikujte ruce po ukončení práce).

Veškerý biologický materiál musí být po práci inaktivován (např. ve sterilizátoru). Stejně tak i veškeré jednorázové pomůcky.

Rozlitý potenciálně infekční materiál musí být odstraněn okamžitě a kontaminovaná místa očištěna standardním dezinfekčním prostředkem nebo 70% alkoholem. Materiál použitý k čištění je třeba inaktivovat (např. ve sterilizátoru) před jeho likvidací.

Všechny vzorky od pacientů, jakož i veškerý odpad a nepoužité reagensy musí být likvidovány podle místních předpisů a norem.

Bezpečnostní listy (MSDS) jsou ke ztažení na [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com).

## 6. Řešení problémů

Problém	Možný důvod	Řešení
žádná amplifikace, délkový standard viditelný	DNA kontaminovaná inhibitory PCR	opakujte izolaci DNA, použijte jinou metodu
	koncentrace DNA je příliš vysoká/nízká	změňte koncentraci DNA, opakujte izolaci DNA
	chybí enzym nebo je jeho koncentrace příliš nízká	opakujte PCR, změňte koncentraci enzymu
	DNA z heparinizované krve	opakujte práci s EDTA, nebo citrátovou krví
	špatné amplifikační parametry	optimalizujte amplifikační parametry (viz 4.3) *
	špatná teplota skladování 10xPCR pufru	opakujte test s 10x PCR pufrům, který byl skladován při teplotě $\leq -20^{\circ}\text{C}$
opakované chyby v jednotlivých reakčních liniích (chybí amplifikační kontrola)	netěsnící reakční mikrozkušavky, ztráta vody a změny koncentrace v průběhu PCR	uzavírejte mikrozkušavky těsně, použijte jiné mikrozkušavky
	špatná teplota skladování 10xPCR pufru	opakujte test s 10x PCR pufrům, který byl skladován při teplotě $\leq -20^{\circ}\text{C}$
nespecifické amplifikační produkty, nadbytečné proužky (žádné proužky špatné proužky nesmí být přítomny)	kontaminace produkty amplifikace	opakujte test, zajistěte přesnou práci
	DNA kontaminována solemi	opakujte izolaci DNA, použijte jinou metodu
	příliš vysoká koncentrace DNA	použijte méně DNA
	příliš vysoká koncentrace enzymu	použijte méně enzymu
	špatné parametry amplifikace	optimalizujte amplifikační parametry (viz. 4.3) ☆
při interpretaci výsledky ukazují na víc než dvě specifity	kontaminace přenosem amplifikačních produktů nová alela	otestujte typizační směs bez přidání DNA zajistěte přesnou práci
žádné, nebo pouze slabé proužky, délkový standard není vidět	Příliš slabé barvení	opakujte barvení
pozadí gelu svítí příliš silně	příliš dlouhá doba barvení, příliš vysoká koncentrace barvicího roztoku	máčejte gel ve vodě nebo v TBE snižte koncentraci barvicího roztoku
rozmazané proužky	elektroforetický pufr je příliš horký špatný elektroforetický pufr	snižte napětí použijte 0,5 x TBE pufr

☆ Pokud používáte materiál a přístroje tak, jak je zde popsáno, je změna parametrů amplifikace až tím posledním řešením. Ve většině případů lze vyhodnotit test odstraněním nadbytečných proužků podle rozdílu v délkách fragmentů.








## 7. Literatura

1. Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, et al. Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 1990; 172(6):1589-98.
2. Phillips JH, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 1995; 268(5209):403-5.
3. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002;190:40-52.
4. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002; 169:5118-5129.
5. Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2003. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono\\_003/ch1d1.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf).
6. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance: KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5: 226-40.
7. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 1996; 156: 3098-101.
8. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-44.
9. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097-2100.
10. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol*. 2004 Oct 1; 173(7):4273-6
11. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002 Aug; 31(4):429-34.
12. Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. 2004 Oct 18; 200(8):957-65.
13. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. *Tissue Antigens* 39:225-235
14. Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF, Klippert K, Schönemann C, Neumann K, Pratschke J, Reinke P, Volk HD, Kotsch K. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. *Transplantation*. 2007 Dec 15; 84(11): 15527-33
15. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. *Tissue Antigens* 41:55-56
16. Green and Sambrook, 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
17. Beutler, E. et al., 1990. *BioTechniques* 9:166



## 8. Použití in-vitro symbolů (IVD)

	Teplota skladování
	Použijte do
	Viz návod k použití
	Dostatečný pro n testů
	Varování
<b>CONT</b>	Obsahuje
<b>CONTROL   CC</b>	Kontaminační kontrola
<b>KIR TYPING</b>	Určeno pro determinaci KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) genotypu
<b>KIR HLA-LIGAND TYPING</b>	Určeno pro determinaci KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) HLA ligandů
<b>IFU</b>	Návod k použití
<b>IVD</b>	Pouze pro in-vitro diagnostické použití
<b>LOT</b>	Číslo šarže
<b>OR</b>	Nebo
<b>PCRBUF   10x</b>	PCR pufr, 10x koncentrovaný
<b>PCRCAP</b>	PCR víčka
<b>PCRPLATE</b>	PCR destičky
<b>PCRSTRIP</b>	PCR stripy
<b>REACTIONMIX</b>	Reakční mixy/směsi
<b>REF</b>	Katalogové číslo
<b>RTU</b>	Připraveno k použití
<b>WORKSHEET</b>	Pracovní list

Návod k použití v jiných jazycích naleznete na:

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

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

nebo telefonu: +49 (0)6404-925-125

BAG Health Care GmbH

Na Hlínách 555/17

182 00 Praha 8

Tel.: +420 286 840 508

Fax: +420 286 840 510

E-mail: [info@bag-healthcare.cz](mailto:info@bag-healthcare.cz)

[www.bag-healthcare.cz](http://www.bag-healthcare.cz)



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5  
35423 Lich/Germany

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

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250

[www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

[info@bag-healthcare.com](mailto:info@bag-healthcare.com)

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 450

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 460

[verkauf@bag-healthcare.com](mailto:verkauf@bag-healthcare.com)

Customer Service:

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

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

[service@bag-healthcare.com](mailto:service@bag-healthcare.com)