

IT

HLA SSP Kits

SSP-Reagenzienkit für die HLA-Typisierung auf DNA-Basis
Ready to use SSP reagent kit for DNA based HLA typing
Trousse de réactifs SSP pour le typage HLA, basé sur l'ADN
Kit di reagenti SSP per tipizzazione HLA basata sul DNA
Juego de reactivos SSP para la tipificación del antígeno

IVD

For In Vitro Diagnostic Use

HLA-A SSP	REF	826 201	CE 0197
HLA-B SSP	REF	826 206	CE 0197
HLA-C SSP	REF	826 212	CE
DRB SSP	REF	826 215	CE 0197
DQB SSP	REF	826 220	CE
ABDR SSPtray	REF	826 230	CE 0197
ABC SSPtray	REF	826 240	CE 0197

**Besondere Hinweise für den Anwender / Special remarks for the user /
Remarques importantes pour l'utilisateur / Avvertenze per l'utilizzatore /
Indicaciones importantes para el usuario:**

SSP TYPING KITS WITH TAQ-POLYMERASE - LIMITED LICENSE:

The purchase price of this product includes limited, non-transferable rights under U.S. Patents 4,683,202, 4,683,195 and 4,965,188 and their foreign counterparts, owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process described in said patents solely for the HLA Typing applications of the purchaser solely for organ or tissue or bone marrow transplantation, and explicitly excludes analysis of forensic evidence or parentage determination. The right to use this product to perform and to offer commercial services for HLA Typing for organ or tissue transplantation using PCR, including reporting the results of the purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is also hereby granted. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

SSP TYPING KITS WITHOUT TAQ-POLYMERASE - DISCLAIMER OF LICENSE:

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process which is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). No license under these patents to use the PCR Process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

REF	GB DE ES IT FR NL DK CZ	Article number Artikelnummer Artikulo numero Codice prodotto Référence du produit Artikelnummer Artikelnummer Katalogové číslo	IVD	GB DE ES IT FR NL DK CZ	For in vitro diagnostic use Nur zur in-vitro Diagnostik Sólo para el diagnóstico in vitro Solo per la diagnostica in vitro Pour le diagnostic in vitro Voor in vitro gebruik Til diagnostik brug i glas Použití pro in vitro diagnostiku			
BLOCK	GB DE ES IT FR NL DK CZ	PCR block PCR-Block PCR bloque PCR blocco PCR bloc PCR blok PCR blok PCR blok	NC	GB DE ES IT FR NL DK CZ	negative control Negativkontrolle control negativo controllo negativo contrôle négatif negatieve controle negativ kontrol negativní kontrola	CK	GB DE ES IT FR NL DK CZ	PCR cocktail PCR-Cocktail PCR coctel PCR cocktail PCR cocktail PCR cocktail PCR blandings PCR koktejl

INDICE

1.	Introduzione	4
1.1	Applicazioni	4
1.2	Basi teoriche	4
1.3	Principio del test	4
2.	Materiale	4
2.1	Contenuto dei kit HLA SSP	4
2.2	Note generali di sicurezza	5
2.3	Conservazione e validità	5
3.	Apparecchi necessari	5
3.1	Programmazione del thermal cycler	5
3.2	Elettroforesi su gel	6
4.	Campioni	6
4.1	Isolamento del DNA	6
4.2	Preparazione dei campioni	6
5.	Esecuzione del test	7
5.1	Materiale necessario	7
5.2	Altro materiale necessario	7
5.3	PCR	7
5.4	Elettroforesi su gel	8
6.	Risultati	8
6.1	Interpretazione	8
6.2	Limiti del procedimento.....	9
6.3	Controllo di qualità	9
6.4	Caratterizzazione specifica	10
7.	Guida alla risoluzione dei problemi	10
8.	Bibliografia	11

1. Introduzione

1.1 Applicazioni

I kit HLA SSP (SSP, Primer Sequenza Specifici) sono usati per la determinazione degli alleli HLA di classe I e di classe II a livello di DNA.

1.2 Basi teoriche

Il sistema HLA è un complesso sistema antigenico ereditario codominante, che riveste un ruolo importante nel sistema immunitario per il riconoscimento del "self" e del "non-self". Nei trapianti d'organo la compatibilità degli antigeni HLA tra donatore e ricevente è uno dei criteri principali per la sopravvivenza dell'organo estraneo. La determinazione degli antigeni HLA è una delle basi per la selezione donatore-ricevente.

Nuove vie si sono aperte nella diagnostica moderna con l'introduzione dei metodi di determinazione basati sul DNA. Gli antigeni HLA possono distinguersi fra di loro per la sola sostituzione di un aminoacido nella catena polipeptidica. Una differenziazione di queste strutture per la maggior parte identiche, è spesso impossibile impiegando la sierologia. La capacità di risoluzione dei metodi sierologici è pertanto limitata. Dato che nel frattempo sono state scoperte le sequenze del DNA nella maggior parte degli alleli HLA, è possibile identificare le variazioni di queste sequenze mediante oligonucleotidi sintetici. Per mezzo dell'amplificazione del DNA genomico (PCR, Polimerase Chain Reaction) con coppie di primer specifici (SSP, Sequence Specific Primers) è ora possibile identificare un elevato numero degli alleli HLA sinora conosciuti.

1.3 Principio del test

I kit HLA SSP sono sistemi per la tipizzazione HLA basati sulla tecnica della PCR. La metodica SSP utilizza per la tipizzazione primer allele-specifici nella reazione di amplificazione. La metodica si basa sul principio che solo i primer, le cui sequenze sono interamente complementari alla sequenza bersaglio dell'attuale campione di DNA, si legano al questo DNA e dando luogo ad un amplificato in una reazione PCR. I primer non complementari non si legano al DNA e non ha luogo alcuna amplificazione.

La rilevazione del DNA amplificato avviene mediante elettroforesi su gel di agarosio. Un' amplificazione efficiente produce un frammento di DNA di lunghezza definita, riconoscibile nel gel come banda. Se non si ha amplificazione, questa banda non è presente.

La composizione nota del primer consente una chiara tipizzazione HLA.

I kit possono essere usati per la determinazione degli alleli HLA nei donatori e nei riceventi di organo, nei pazienti sottoposti a trasfusione di sangue o di emocomponenti.

2. Materiale

2.1 Contenuto dei kit HLA SSP

Il contenuto dei kit HLA SSP è sufficiente per 24 test.

- 24 piastre PCR **BLOCK**, contenenti le miscele di primer liofilati e nucleotidi. Per evitare errori, la posizione 1 (=H1) è contrassegnata in nero.
- Cocktail PCR **CK** (pronto per l'uso)
Il cocktail PCR contiene tampone PCR (concentrazione finale: 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, gelatina 0,001%), rosso cresolo e glicerolo.
- Tappini per PCR oppure fogli per chiusura PCR
- Schema di interpretazione, schema della reazione, posizioni dei primer

Un controllo negativo **NC** è allegato come provetta PCR aggiuntiva (incolore), se non è già integrato nel blocco PCR **BLOCK**.

2.2 Note generali di sicurezza

Reagenti solo per uso diagnostico in vitro **IVD**

Attenzione: Il test deve essere eseguito solo da personale specializzato, addestrato ed autorizzato

Attenzione: Usare tutti i reagenti rispettando sempre le norme e le misure precauzionali in vigore nel laboratorio. I campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infetti. Non pipettare con la bocca.

Attenzione: Tutti i reagenti del test devono essere maneggiati come potenzialmente infetti, applicando le relative misure precauzionali.

Attenzione: Le piastre PCR usate devono essere maneggiati come potenzialmente infetti e devono essere eliminati osservando le vigenti direttive nazionali.

Attenzione: Non usare alcun reagente dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Attenzione: Non usare reagenti sospetti di contaminazione microbica.

Attenzione: Usare serie di pipette per la zona pre-PCR divise da quelle per la zona post-PCR.

Attenzione: L'etidio bromuro, usato nell'elettroforesi su gel per la colorazione del DN, è **potenzialmente cancerogeno**. Usare sempre guanti di protezione quando si lavora con gel colorati. Eliminare mediante incenerimento.

Attenzione: Lavorando con luce UV proteggere sempre gli occhi dagli UV.

La schede di sicurezza per tutti i reagenti, contenenti informazioni dettagliate, possono essere richiesti alla Biotest.

2.3 Conservazione e validità

I reagenti SSP (**BLOCK**, **CK**, **NC**) devono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C. La data di scadenza si trova sulle confezioni dei componenti il kit.

Le piastre PCR **BLOCK** sono sigillate nel sacchetto. Le piastre non usate e rimaste in un sacchetto aperto, devono restare nella confezione originale che verrà chiusa con Tesafilm per ridurre l'umidità. Le confezioni aperte devono essere usate entro 4 settimane.

3. Apparecchi necessari

3.1 Programmazione del thermo cycler

Programma HLA SSP:

Denaturazione iniziale:	94°C	2 min.		
Denaturazione:	94°C	10 s]	10 cicli
Annealing & estensione:	65°C	60 s		
Denaturazione:	94°C	10 s]	20 cicli
Annealing:	61°C	50 s		
Estensione:	72°C	30 s		

Il seguente programma PCR è adattato al thermal cycler della Perkin Elmer. La velocità di riscaldamento/ raffreddamento per il PE 9700 è in media di 1°C/secondo per i campioni e la

precisione della temperatura indicata è in media pari a $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ nell'ambito compreso tra $35\text{-}100^{\circ}\text{C}$. Thermal cycler diversi da quelli consigliati devono essere convalidati dall'utilizzatore. I thermal cycler che non hanno un coperchio regolabile, necessitano di un adattatore per poter assicurare un' ottimale trasmissione del calore dalla calotta riscaldabile alle provette PCR.

3.2 Elettroforesi su gel

Per l'esecuzione dell'elettroforesi su gel, v. 5.

4. Campioni

4.1 Isolamento del DNA

Il DNA genomico può essere ottenuto da tutte le cellule nucleate. Il metodo più semplice consiste nell'isolamento da sospensioni di cellule (sangue, buffy coat, cellule in coltura). Vi è tutta una serie di protocolli per l'isolamento del DNA dalle cellule. Per le determinazioni PCR-SSP si può scegliere solo tra i procedimenti che forniscono DNA in quantità e qualità sufficienti per la PCR, come ad es. il metodo della precipitazione (2).

Tra i fornitori di kit commerciali per l'estrazione del DNA, sono idonei ad es. "Puregene" della Gentra Systems oppure " Super Quick Gene" della Analytical Genetic Testing Center.

4.2 Preparazione dei campioni

4.2.1 Campioni

Per la tipizzazione è necessario sangue periferico non coagulato (ad es. in sodio citrato o con EDTA). Le informazioni sulla conservazione e la stabilità dei campioni di sangue devono essere richieste al fornitore del kit per l'estrazione del DNA e devono essere convalidate dall'utilizzatore.

4.2.2 Contaminazione

Le contaminazioni del DNA con inibitori della PCR, come ad es. emoglobina, eparina, etanolo, ecc., possono interferire sensibilmente con la PCR. Per tale motivo, come materiale di partenza per l'isolamento del DNA **non** si deve usare sangue eparinizzato, ma sangue citratato o trattato con EDTA. Se il paziente è in trattamento con eparinato, è opportuno scegliere eventualmente un altro metodo di isolamento del DNA oppure un altro materiale di partenza per l'isolamento del DNA.

4.2.3 Campioni emolizzati

E' necessario evitare l'impiego di campioni lipemici o emolizzati. Devono anche essere evitati i campioni senza anticoagulante o ripetutamente congelati e scongelati, poiché queste condizioni non assicurano che il DNA così isolato sia sufficiente per qualità e quantità.

4.2.4 Quantità del DNA

Risospendere il DNA isolato in acqua distillata sterile e aggiustare la concentrazione a $100 \pm 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Il DNA **non deve essere risospeso** in reagenti che contengono agenti chelanti, come ad es. **EDTA** ad una concentrazione $> 0,5 \text{ mM}$.

4.2.5 Qualità del DNA

La determinazione della concentrazione del DNA si effettua misurando la densità ottica (DO) a 260 nm (A_{260}). Il valore A_{260} pari ad 1 (= DO 1) corrisponde a circa $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ di DNA a doppia elica.

Per evidenziare una contaminazione del DNA con proteine, si misura ulteriormente l'assorbanza a 280 nm calcolando il rapporto A_{260}/A_{280} . Un DNA puro dà un rapporto di A_{260}/A_{280} pari o superiore a 1,8. Valori di A_{260}/A_{280} minori di 1,8 indicano una contaminazione con proteine. Con un valore di $A_{260}/A_{280} = 1,5$, l'aliquota proteica nella preparazione di DNA è di circa il 50%.

Buoni risultati si ottengono con un rapporto $A_{260}/A_{280} \geq 1,6$.

➡ La purezza e la concentrazione del DNA hanno un'importanza fondamentale per un ottimale risultato del test.

Il DNA isolato può essere conservato per lungo tempo (oltre 1 anno) ad una temperatura di -20°C . I dettagli sulla conservazione e la stabilità del DNA isolato sono riportati nelle informazioni tecniche del produttore del kit impiegato per l'estrazione del DNA.

5. Esecuzione

5.1 Materiale necessario

V. punto 2.1 Contenuto dei kit HLA SSP

5.2 Altro materiale necessario

5.2.1 Campioni (DNA)

- Spettrofotometro a raggi UV

5.2.2 PCR

- Taq DNA polimerasi (5 U/ μl , ad es. PE Applied Biosystems)
- Thermal cycler con coperchio riscaldabile (ad es. PE 9600, PE 9700 della PE Applied Biosystems)
- Pipette regolabili
- Multipipetta Eppendorf con Combitips (10 μl)
- Puntali con filtro
- Acqua distillata (dH_2O)

5.2.3 Elettroforesi su gel

- Agarosio (per biologia molecolare)
- Camera elettroforetica (adatta a gel con almeno 25 pozzetti)
- Tampone TBE 5 x
 - Tris (idrossimetil) – aminometano (base)
 - Acido borico (H_3BO_3)
 - Na_2EDTA
- Soluzione di etidio bromuro (10 mg/ml)
- Standard di lunghezza di DNA (marker di 50-1000 bp) (non assolutamente necessario)
- Agitatore magnetico con piastra riscaldante o forno a microonde
- Pipette regolabili
- Macchina fotografica Polaroid con filtro UV, pellicola Polaroid tipo 667
- Transilluminatore a raggi UV (circa 200-300 nm)
- Alimentatore
- Acqua distillata (dH_2O)

5.3 PCR (Reazione Polimerasica a Catena)

5.3.1 Misure precauzionali

La PCR è una metodica altamente sensibile, che serve ad aumentare efficientemente anche le più piccole quantità di DNA. Ne consegue che anche tracce di DNA contaminante in un campione, saranno amplificate nella reazione PCR ed il risultato del test potrà esserne falsato. Una fonte particolare di contaminazione è il DNA amplificato che viene in contatto con i campioni che devono ancora essere amplificati. Per evitare le contaminazioni con materiale amplificato si raccomanda di separare rigorosamente, nel modo seguente, le zone di lavoro:

1. Zona pre- PCR:

Tutte le operazioni precedenti la PCR (isolamento e conservazione del DNA, preparazione della PCR, preparazione e conservazione dei reagenti e delle soluzioni per l'estrazione del DNA e per la PCR).

2. Zona post-PCR:

Thermal cycler, elettroforesi su gel, interpretazione, conservazione del DNA amplificato.

Gli apparecchi ed i materiali di consumo della zona post-PCR non devono essere introdotti nella zona pre-PCR.

3. Per le operazioni nella zona pre-PCR, si devono usare pipette con puntali con filtro. Si raccomanda di effettuare un controllo negativo insieme ad ogni amplificazione, allo scopo di evidenziare eventuali contaminazioni con DNA estraneo.

5.3.2 Esecuzione di una tipizzazione HLA-SSP

- (1) Per una tipizzazione HLA di un campione di DNA, si eseguono più reazioni di PCR con un volume di reazione di 10 µl. Il segno nero sulla piastra PCR **BLOCK** serve l'orientamento (posizione H1).
- (2) Per **ogni tipizzazione** preparare in una Eppendorf una **mastermix** costituita da:

Cocktail PCR **CK**
 Taq DNA polimerasi (5 U/µl)
 dH₂O

Miscelare bene e mettere 10 µl di questa miscela nel **NC**. Aggiungere quindi DNA (circa 100 ± 50 ng/µl) e miscelare bene.

I volumi da pipettare per ogni test sono riportati nella seguente tabella:

Numero delle reazioni PCR	Composizione della mastermix:				
	8	18	24	48	96
PCR cocktail CK	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq DNA polimerasi	0,7 µl	1,5 µl	1,8 µl	3,5 µl	7 µl
dH ₂ O	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
DNA (circa 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

- (3) Pipettare 10 µl di mastermix in ogni primer.
 Sarebbe meglio usare una multipipetta, facendo attenzione che la punta non venga a contatto con i primer. Per evitare un trasporto del primer, pipettare sulla parete della provetta.
- (4) Chiudere bene le strip PCR con gli allegati fogli o tappi PCR. Mettere la piastra nel thermal cycler ed iniziare la PCR con il programma HLA SSP.

5.4 Elettroforesi su gel

La rilevazione del prodotto di PCR ha luogo mediante elettroforesi su gel di agarosio e successiva visualizzazione delle bande di DNA a luce UV.

5.4.1 Preparazione dei reagenti

- **Tampone TBE 5 x** (0,445 M Tris-borato, 0,0125 M EDTA):
 54 g Tris(idrossimetil)-aminometano (base)
 27,5 g Acido borico (H₃BO₃)
 4,65 g Na₂EDTA
 portare a 1000 ml con acqua distillata, conservare a temperatura ambiente.
- **Soluzione di etidio bromuro** (10 mg/ml)
 Sciogliere 100 mg di etidio bromuro in 10 ml di dH₂O e conservare a 2...8°C al riparo dalla luce.
Attenzione: l'etidio bromuro è mutageno e tossico. Quando si maneggia etidio bromuro (anche in forma diluita) indossare guanti di protezione. In caso di contatto con la cute, lavare immediatamente con molta acqua.
- **Tampone TBE 1 x**

Diluizione finale 1:5 del tampone TBE 5 x in acqua demineralizzata.

5.4.2 Esecuzione

Si prepara un gel di agarosio al 2%. Allo scopo, è necessario far bollire 5 g di agarosio in 250 ml 1 x TBE. Raffreddare la soluzione mescolando fino a < 60°C ed aggiungere 4 µl di soluzione di etidio bromuro. Versare la soluzione di agarosio priva di bolle d'aria nei vassoi portagel precedentemente preparati e sigillati. Usare i pettini (pozzetti da 10 µl) e lasciare riposare la soluzione a temperatura ambiente per almeno 10 minuti.

Dopo che l'agarosio si è solidificato, il gel va collocato nell'apposita camera. Estrarre i pettini e coprire il gel con 1 x TBE. I pozzetti di gel vanno completamente ricoperti con tampone. Dispensare tutti i preparati PCR (10 µl) nei pozzetti di gel.

Per il controllo delle dimensioni dei prodotti PCR si raccomanda l'utilizzo di uno standard di peso molecolare appropriato (marker da 50-1000 bp) per l'elettroforesi.

L'elettroforesi avviene in 15-25 minuti a 8 V/cm (distanza tra gli elettrodi). La distanza di migrazione del rosso cresolo dovrebbe essere 1-1,5 cm.

5.4.3 Documentazione

Al termine dell'elettroforesi, il gel viene collocato su un transilluminatore UV e fotografato per l'interpretazione e documentazione dei risultati.

Attenzione: Indossare una protezione adeguata per il viso contro i raggi UV.

6. Risultati

6.1 Interpretazione

Le miscele di primer contengono primer controllo che amplificano un frammento lungo 1069 bp dell'ormone umano della crescita (human growth hormone, HGH). Questi primer sono concentrati meno delle coppie di primer allele specifici e servono per controllare l'efficienza della PCR. Essi producono sempre un amplificato, in presenza e in assenza di una banda allele-specifica. In alcuni casi, però, in presenza di uno specifico prodotto di PCR, la banda di controllo può apparire di più debole intensità o essere totalmente assente. La presenza della banda specifica garantisce il risultato della corsa elettroforetica.

L'interpretazione del test si basa pertanto sulla presenza o meno nel gel di una banda specifica di DNA. Per l'interpretazione riportare il campione delle bande specifiche sull'allegato schema di interpretazione e leggere il risultato della tipizzazione mediante gli schemi delle reazioni.

Letture del gel

	Reazione positiva	Reazione positiva	Reazione negativa	Nessuna amplificazione
Pozzetto del gel				
Banda di controllo	no	-----		no
Banda specifica			no	no
Banda del primer				

6.2 Limiti del procedimento

1. L'intensità delle bande può variare in base alla qualità e alla quantità del DNA utilizzato. La quantità di prodotto PCR corrisponde all'intensità delle bande visibili con i raggi UV.

2. Qualora 1 o 2 amplificazioni PCR fallissero, va verificato se la loro valutazione positiva porta ad un risultato di tipizzazione. In questo caso, il test va ripetuto. Se la valutazione positiva delle amplificazioni mancanti non porta ad un risultato di tipizzazione e viene chiaramente rilevata la presenza di due alleli, non sono necessarie altre misure. Qualora venisse identificato un unico allele, il test va ripetuto.
3. L'impiego di DNA polimerasi Taq diversa da quella raccomandata (PE Applied Biosystems) può causare errori e amplificazioni aspecifiche falsamente positive.
4. I campioni di DNA devono essere usati subito dopo l'estrazione. E' possibile una conservazione più lunga (oltre 1 anno) a -20°C .
5. L'esattezza dei risultati può essere assicurata solo se sono state rigorosamente osservate tutte le istruzioni qui contenute.
6. Impiegare questi test solo per determinazioni iniziali di HLA. A scopo trapianto, è necessario usare altri dati clinici e diagnostici.
7. I kit di tipizzazione Bio-Rad HLA SSP non possono coprire tutte le combinazioni di alleli.

6.3 Controllo di qualità

Per i controlli di qualità di ogni singola coppia di primer i lotti di produzione vengono controllati con un pannello di DNA.

Si dovrebbe eseguire un controllo di arrivo del lotto con combinazioni di alleli eterozigoti, che copre quanto più possibile molti primermix.

6.4 Caratterizzazione specifica

Con i kit Bio-Rad SSP ed altri kit SSP e SSO del commercio sono stati comparativamente testati 167 soggetti (riceventi di trapianto non selezionati e potenziali donatori provenienti da 2 diverse regioni geografiche). E' stato possibile dimostrare una concordanza del 100% (167/167) tra i risultati dei Bio-Rad SSP ed i risultati degli altri SSP e SSO.

	Concordanza	Non concordanza	Totale	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N = Numero dei campioni

7. Guida alla risoluzione dei problemi

PROBLEMA	CAUSA	SOLUZIONE
Non vi sono bande visibili.	Manca etidio bromuro nel gel.	Colorare nuovamente il gel nel bagno colorante (tampone 1xTBE con 0,5 µg/ml di etidio bromuro).
Standard MW visibile Prodotti PCR non visibili	Errore nella preparazione per PCR: non sono stati aggiunti DNA o Taq polimerasi.	Ripetere la PCR.
	Errate condizioni di temperatura	Controllare il programma PCR nel termociclatore. Il programma indicato vale per i termociclatori raccomandati PE 9600, PE 9700. Termociclatori diversi da quelli raccomandati devono essere validati dall'utente. Termociclatori diversi dagli strumenti raccomandati possono avere diverse velocità di riscaldamento e raffreddamento. Possibili variazioni nel programma PCR: Se avvengono amplificazioni non specifiche, è possibile applicare delle condizioni più stringenti aumentando gradualmente la temperatura di annealing di 1°C. D'altro canto, è possibile che condizioni di PCR troppo limitanti causino amplificazioni falsamente negative. In questo caso, si raccomanda di diminuire gradualmente la temperatura di annealing di 1°C. Aumentare il tempo di denaturazione da 10 a 20 secondi. Aumentare il tempo di estensione da 30 a 60 secondi
Errore di una o più amplificazioni (bande di controllo e prodotto di amplificazione specifico).		Qualora 1 o 2 amplificazioni fallissero, verificare se la loro valutazione positiva portasse ad un risultato di tipizzazione. In questo caso, il test va ripetuto. Se la valutazione positiva delle amplificazioni mancanti non portasse ad un risultato di tipizzazione e venisse chiaramente rilevata la presenza di due alleli, non sono necessarie altre misure. Qualora venisse identificato un unico allele, il test va ripetuto. Se fallissero più di 2 amplificazioni, il test andrebbe ripetuto.
Bande specifiche deboli nel gel, bande di controllo assenti o molto deboli.	È stata utilizzata una quantità insufficiente di DNA.	Raddoppiare la quantità di DNA (ridurre la dH ₂ O nella mix); utilizzare circa 100 ng DNA per amplificazione.
	Inibitori PCR nella mix, ad es: etanolo, emoglobina, eparina, biglie	Utilizzare sangue raccolto con EDTA o citrato; (asciugare accuratamente il pellet di DNA dopo il lavaggio con etanolo).
	Valore pH della soluzione di DNA troppo acido (variazione cromatica del cocktail PCR dopo l'aggiunta di DNA)	Precipitare nuovamente il DNA e sciogliere in acqua distillata.
	Errate condizioni dei cicli di temperatura	Si veda sopra.
Bande specifiche deboli nel gel.	La concentrazione di DNA è troppo elevata.	Diluire il DNA; una concentrazione troppo elevata di DNA o un DNA che non sia stato sciolto accuratamente possono in alcuni casi portare all'errore di bande specifiche.
	Il DNA è stato sciolto in un tampone contenente un inibitore della reazione PCR.	Precipitare nuovamente il DNA e sciogliere in acqua distillata.
	Errate condizioni dei cicli di temperatura	Si veda sopra.
Bande di controllo presenti, bande specifiche presenti, ma anche una o più bande non specifiche deboli presenti (reazioni falsamente positive)	La concentrazione di DNA è troppo elevata.	Diluire il DNA.
	Reazioni crociate con altri alleli	Controllare lo schema di valutazione.
	La qualità di DNA non è sufficiente o vi è stata contaminazione del DNA.	Isolare nuovamente il DNA.
Bande nella PCR del controllo negativo	Il DNA è stato dispensato per errore nella mix del controllo negativo.	Eventualmente ripetere la preparazione o inserire una nota nella documentazione di valutazione.
	Contaminazione dei reagenti	Sostituire i reagenti.

8. Literatur/ References/ Références bibliographiques/ Bibliografia/ Bibliografía

1. Graham DE (1978)
The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses.
Anal Biochem 85: 609-613
2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucl Ac Res 16: 1215
3. Olerup O, Zetterquist H (1992)
HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation.
Tissue Antigens 39: 225-335.
4. Bunce M, O'Neill CM, Barnado M, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI (1995)
Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)
Tissue Antigens 46:355-367.