

ISTRUZIONI D'USO

KIR-TYPE /

Epitop-TYPE

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

Bassa risoluzione

Kit per la genotipizzazione KIR e dei ligandi HLA
in biologia molecolare



**10 tipizzazioni
pronte all'uso prealiquotate**

REF 7105: KIR-TYPE

REF 7106: Epitop-TYPE

Indice:

1. Descrizione prodotto	2
2. Materiali	3
2.1.1 Contenuto KIR-TYPE	3
2.1.2 Contenuto Epitop-TYPE	4
2.2. Materiali e reagenti supplementari	4
2.3 Conservazione e stabilità	4
3. Dati per l'esecuzione	5
4. Procedura del test	5
4.1 Condizioni di sicurezza e indicazioni speciali	5
4.2 Estrazione del DNA	6
4.3 Amplificazione	6
4.4 Gel Elettroforesi.....	9
4.5 Documentazione e interpretazione	9
5. Avvertenze e precauzioni	10
6. Risoluzione dei problemi	11
7. Riferimenti	12
8. Spiegazione dei simboli usati sulle etichette	13

Versione: 13/2017 / Data: 2017-07

1. Descrizione prodotto

Le cellule Natural killer (NK) e sottopopolazioni di linfociti T (CD8+ memory phenotype) (1,2) o T-cell-receptor $\gamma\delta$ esprimono recettori inibitori e attivatori detti KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*). A causa delle differenze nel numero di geni e del polimorfismo distintivo dei singoli geni, la regione genica dei recettori KIR mostra una elevata variabilità nei singoli individui (3, 4). Sono state identificate varie molecole HLA di classe I come ligandi di singoli recettori KIR (5,6). Il recettore inibitorio KIR2DL1 si lega alle molecole espresse dagli alleli HLA-C gruppo 2 che presenta gli aminoacidi Asn⁷⁷ e Lys⁸⁰, i recettori KIR2DL2 / KIR2DL3 alle molecole espresse dagli alleli HLA C gruppo 1, con gli aminoacidi Ser⁷⁷ e Asn⁸⁰ e il recettore KIR3DL1 presenta affinità per gli alleli HLA-B con un epitopo Bw4 corrispondente alla posizione degli aminoacidi 77-83 della elica $\alpha 1$. Il recettore inibitorio KIR3DL2 si lega agli alleli dei gruppi HLA-A*03 e *11 (7). I ligandi per i recettori attivatori KIR non sono ancora sufficientemente documentati – sebbene venga ipotizzato che presentino affinità per le stesse molecole HLA-B e HLA-C dei recettori inibitori correlati.

Il modello al momento più accettato per l'attivazione delle cellule NK prevede che la reattività di queste cellule sia controllata dal bilancio tra segnali inibitori e attivatori. Pertanto l'attivazione delle cellule NK deriverebbe dalla riduzione di segnali inibitori o dall'aumento di legami di ligandi ai recettori attivatori. In caso di processo di trasformazione (es. malattia tumorale o infezione virale) con conseguente perdita di espressione di molecole HLA ligandi, la mancanza di segnali inibitori determina l'attivazione delle cellule NK e la lisi della cellula target. Questa osservazione è alla base dell'ipotesi missing-self, in base alla quale un tessuto sano con una stabile espressione HLA viene risparmiato dalla attivazione delle cellule NK (8).

In particolare un gran numero di studi ha dimostrato che lo sbilanciamento HLA/KIR porta alla reattività delle cellule NK riceventi verso il donatore in trapianti di midollo osseo che determina la riduzione della GvHD (graft versus host disease) e ricadute (9). Inoltre genotipi KIR definiti potrebbero essere associati a malattie autoimmuni (es. psoriasi), ridotta progressione di AIDS conclamato in pazienti HIV, rischio di preeclampsia e rigetto acuto dopo trapianto di rene allogenico (10-14).

Il kit **KIR TYPE** consente la genotipizzazione di 14 geni KIR e 2 pseudogeni. L' **Epitop-TYPE** rileva gli alleli HLA con specificità HLA-Cw Asn⁸⁰, HLA-Cw Lys⁸⁰, HLA-B Bw4^{Threo}, HLA-B Bw4^{Iso} e HLA-A Bw4.

La rilevazione dei singoli recettori KIR/ligandi HLA viene eseguita applicando il metodo **Sequence Specific Primer (SSP PCR** - vedi Fig. 1) (13,15).

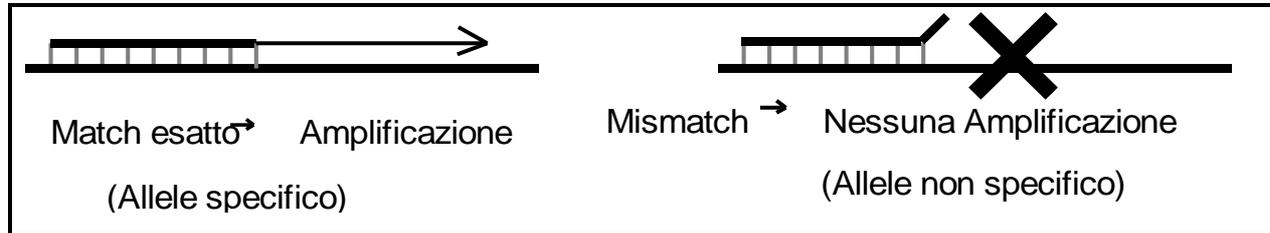


Fig. 1: Principio dell'SSP-PCR

Questo metodo si basa su fatto che la riuscita della PCR dipende dall'esatto match di entrambi i primer in particolare all'estremità 3' [4]. Perciò l'amplificazione avviene solo se i primer sono complementari alla sequenza target, e di seguito è evidenziata dall'elettroforesi del gel di agarosio.

I primer specifici sono stati selezionati in modo che vengano rilevati i singoli KIR/geni HLA ligandi. La composizione delle mix di primer consente la identificazione dei genotipi KIR/specificità HLA indicati sui diagrammi di valutazione inclusi nei kit. Per ogni test, viene incluso un certo numero di mix di reazione con controlli di amplificazione interni **prealiquotati** e **liofilizzati** che verranno risospesi in un volume finale di 10 µl.

2. Materiali

2.1.1 Contenuto del kit KIR- TYPE

- Piastre KIR-TYPE per la tipizzazione KIR. I reagenti prealiquotati e liofilizzati contengono primer allele specifici, i primer del controllo interno (specifici per sequenza nel cromosoma 1) e i nucleotidi. La prima mix di reazione è marcata e contiene il controllo di contaminazione /controllo negativo con primer di controllo interno e primer specifici per l'amplificato. L'ultima mix contiene un controllo positivo (solo i primer di controllo interno). Il numero di lotto è stampato su ogni piastra.
- PCR buffer 10x.
- 8 strisce di 12 tappi.
- Istruzioni d'uso, fogli di lavoro con tabella delle specificità.

2.1.2 Contenuto del kit Epitop- TYPE

- Strip Epitop-TYPE per tipizzazioni Epitop . I reagenti prealiquotati e liofilizzati contengono primer allele specifici, i primer del controllo interno (specifici per sequenza nel cromosoma 1) e i nucleotidi. La prima mix di reazione è marcata (stampa del numero di lotto). L'ultima mix include il controllo di contaminazione/negativo.
- PCR buffer 10x.
- 8 strisce da 12 tappi.
- Istruzioni d'uso, fogli di lavoro.

2.2 Materiale e reagenti supplementari

- Taq Polimerasi (5 U/μl), ad es. Happy Taq Kit ([REF](#) 70977) o altra Taq che sia stata validata con il kit KIR-TYPE / Epitop-TYPE da parte dell'operatore. **Non utilizzare una Taq polimerasi Hot start!**
- **EXTRA-GENE** Kit ([REF](#) 7059) (facoltativo) per l'estrazione del DNA da sangue / linfociti / leucociti / o materiale per estrazione del DNA con altri metodi.
- Pipette (0.5 - 250 μl)
- puntali sterili con filtro
- Termociclatore (a pag. 9 è disponibile una lista di termociclatori validati).
- Agarosio.
- Buffer TBE 0.5 x (45 mM di tris, 45 mM di acido borico, 0.5 mM di EDTA).
- Etidio bromuro (EtBr).
- Cella elettroforetica submarine
- Alimentatore (200 - 300 V, 200 mA).
- DNA-length standard ([REF](#) 7097).
- Transilluminatore UV (220 - 310 nm).

2.3 Conservazione e stabilità

Il kit 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 (**evitare frequenti cambi della temperatura di conservazione**), in frigocongelatori a temperatura monitorate. 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 dei genotipi KIR e specificità HLA (sulla base delle informazioni di sequenza più recenti disponibili) indicate nel foglio di lavoro. Regolarmente vengono eseguiti aggiornamenti.

L'accuratezza e ripetibilità della specificità di ogni miscela di primer è stata verificata per ciascun lotto con campioni di controllo ad assetto antigenico KIR/epitopi noto. Alleli non inclusi o non testati in quanto rari, rispettivamente, sono elencati nel foglio di lavoro o tabella di specificità.

E' stato condotto uno studio di prestazioni per il kit Epitop-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). KIR-TYPE ed Epitop-TYPE sono validati con la Taq Polimerasi del kit Happy Taq (REF 70977). Prima di utilizzare un'altra Taq Polimerasi si prega di validare l'enzima con KIR-TYPE / Epitop-TYPE.

Si consiglia di utilizzare 50 - 80 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. Per ridurre i rischi di false tipizzazioni dovrebbero essere seguite le linee guida dei trapianti così come gli standard EFI , in particolare nei casi di discrepanza tra il metodo sierologico e quello molecolare .

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

- ◆ Indossare sempre i guanti durante il lavoro (se possibile senza polvere).
- ◆ Usare un nuovo puntale per ogni semina (con filtro integrato).
- ◆ Lavorare in due aree separate per la pre-amplificazione (estrazione del DNA e preparazione delle reazioni) e post-amplificazione (elettroforesi del gel e documentazione). Preferibilmente usare due stanze separate.
- ◆ Usare strumentazione e altro materiale solo nelle rispettive aree e non scambiarli.

4.2 Estrazione del DNA

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:

$OD_{260}/OD_{280} = > 1.5$ e < 2.0 (indicatore di contaminazione con RNA/proteine)

$OD_{260}/OD_{230} = > 1.8$ (indicatore di contaminazione con sali, carboidrati o solventi organici).

4.3 Amplificazione

Tutte le mix prealiquotate e liofilizzate contengono i primer allele specifici, i nucleotidi e i primer per il controllo interno dell'amplificazione. I parametri di amplificazione sono ottimizzati ad un volume finale di 10 μ l.

1. Prelevare il numero richiesto di piastre KIR-TYPE / strip Epitop-TYPE e il PCR buffer 10x dal kit.
2. Preparare la Master-Mix costituita da PCR-buffer 10x, soluzione di DNA, Taq-Polimerasi e acqua distillata e miscelare bene. Il KIR-TYPE/Epitop-TYPE funzionano con la stessa Master-Mix inclusa nei kit HISTO TYPE SSP e perciò possono essere combinati. La composizione della Master-Mix dipende dal numero di mix di reazioni (vedi Tabella 1). Se è necessario eseguire il **controllo di contaminazione**, dapprima costituire la Master Mix senza DNA e pipettare 10 μ l di questa nel controllo di contaminazione. Aggiungere successivamente la soluzione di DNA ed aliquotare la Master Mix nelle mix di reazione prealiquotate e liofilizzate.

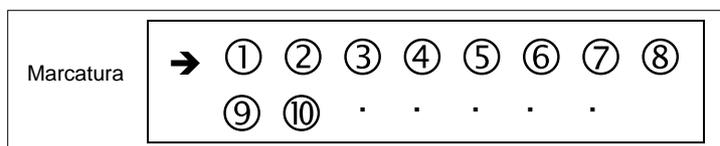
Tabella 1: Composizione della Master-Mix in funzione del numero di mix

n°di mix	Acqua dist.	PCR-buffer 10x	Soluzione DNA (25-40 ng/μl)	Taq-Polimerasi (5 U/μl)	Volume totale
1	7	1	2	0,08	10 μl
6	55	8	16	0,64	80 μl
22	180	26	52	2,1	260 μl
28	221	32	64	2,6	320 μl

- ⇒ la quantità di DNA dovrebbe essere compresa tra 50 e 80 ng per mix. a seconda della concentrazione di DNA, occorre variare le quantità di acqua e DNA da aggiungere. (Per es. per 22 mix: 26 μl di soluzione di DNA (50 ng/μl) e 206 μl Acqua dist.).
- ⇒ nel caso di utilizzo di altra Taq polimerasi, l'enzima deve essere validato con questo kit da parte dell'operatore.

3.: Dopo aver vortexato la mastermix dispensare **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 contaminazione. Se si usa un termociclatore con coperchio a chiusura ermetica, è anche possibile usare PCR mat riciclabili. Scuotere leggermente la piastra per dissolvere il pellet sul fondo della provetta. Tutte le miscele di reazione PCR devono depositarsi sul fondo.

4.: Mettere le provette di reazione nel termociclatore e chiudere il coperchio in modo che le provette non si deformino riscaldandosi. Avviare il programma di PCR. Se si utilizza un coperchio termostato **non** è necessario aggiungere olio minerale nelle provette!

Parametri di amplificazione

Programma	Temp.	Tempo	Numero di cicli
Prima denaturazione	94°C	2 Min	1 ciclo
Denaturazione	94°C	15 Sec	10 cicli
Annealing	65°C	50 Sec	
Estensione	72°C	45 Sec	
Denaturazione	94°C	15 Sec	20 cicli
Annealing	61°C	50 Sec	
Estensione	72°C	30 Sec	

Termocycler 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 prega di non utilizzare termociclatori con blocco riscaldante in alluminio (es. GeneAmp PCR 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 Vs. 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 CYCKER CHECK kit è ideale (REF: 7104).

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 di amplificazione si esegue tramite gel di agarosio in elettroforesi orizzontale. Si consiglia come tampone per l'elettroforesi TBE 0.5x (45 mM di tris, 45 mM di acido borico, 0.5mM 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 in ogni pozzetto del gel. Inoltre, caricare 10 µl di DNA length standard per la valutazione del peso molecolare. L'elettroforesi è eseguita a 10-12 V/cm (per es. con elettrodi distanti 20 cm impostare 200-240V), per 20-40 minuti. 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). In alternativa, l'EtBr (0.5 µg/ml) può essere aggiunto al buffer per l'elettroforesi o al gel di agarosio. Se necessario rimuovere l'EtBr in eccesso immergendo il gel in H₂O per 20-30 minuti.

4.5 Documentazione ed interpretazione

Per la documentazione, visualizzare il prodotto di PCR usando un transilluminatore UV (220-310 nm) e un sistema di documentazione dell'immagine adeguato. Scegliere i tempi di esposizione e di apertura in modo che le bande siano bene visibili e risaltino sul fondo scuro (per es. apertura 11, tempo d'esposizione 1 sec).

Sono da considerare positive sole le bande che hanno un peso molecolare corretto in confronto al DNA length standard. Le dimensioni corrette sono indicate nel foglio di lavoro. In ogni reazione senza amplificazione allele-specifica il controllo interno deve risultare di **659 bp**. Nelle reazioni con una positività allele-specifica il controllo interno è generalmente più debole, o potrebbe scomparire completamente a causa della competizione delle diverse PCR! 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 deve essere visibile alcuna banda. Se c'è contaminazione da DNA gnomico compare una banda a 282 bp. Altre bande possono comparire a 78 bp, 104 bp, 176 bp, 580 bp. Se c'è contaminazione da amplificati compariranno delle bande a 78 bp e/o 104 bp e/o 176 bp e/o 282 bp e/o 580 bp.

5. Avvertenze e precauzioni

L'etidibromuro è un potente mutageno. Indossare guanti quando si maneggiano gel o soluzioni contenenti EtBr! Consultare le avvertenze, le precauzioni e le istruzioni 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 avvenire secondo le leggi e regolamentazioni del paese e dello stato locale.

Le schede di sicurezza (MSDS) sono disponibili per il download all'indirizzo web www.bag-healthcare.com.

6. Soluzione dei problemi

Problema	Possibile causa	Soluzione
nessuna amplificazione, length standard visibile	DNA contaminato con inibitori di PCR DNA degradato	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 tralasciate)	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
	parametri di amplificazione errati	ottimizzare i parametri di amplificazione (vedi 4.3) ☆
l'interpretazione mostra più di 2 specificità	-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 acqua 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 gel completamente polimerizzati

☆ Quando si usano gli strumenti e i materiali elencati, considerare come ultima possibilità 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. Bibliografia

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
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.
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. 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
	Sufficiente per n test
	Attenzione
	Fabbricante
CONT	Contenuto, contiene
CONTROL CC	Controllo di contaminazione
KIR TYPING	Destinazione d'uso: determinazione dei genotipi KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor)
KIR HLA-LIGAND TYPING	Destinazione d'uso: determinazione dei ligandi HLA dei KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor)
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
PCRPLATE	Piastre PCR
PCRSTRIP	Strip PCR
REACTIONMIX	Mix di reazione
REF	Numero di catalogo
RTU	Pronto all'uso
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 / 925-0
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-250

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450
 www.bag-healthcare.com

info@bag-healthcare.com verkauf@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
 Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-460

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