

Istruzioni per l'uso

HISTO SPOT[®] SSO Coeliac Disease Kit

Kit per test di tipizzazione in biologia molecolare di alleli HLA associati a celiachia

48 Tipizzazioni

IVD

CE 0123

Versione: 1/2012

REF 726071: HISTO SPOT[®] Coeliac Disease

REF 726098: HISTO SPOT[®] Reagent Kit

Indice

1.	DESCRIZIONE DEL PRODOTTO.....	2
2.	PRINCIPIO DEL TEST	2
3.	MATERIALI.....	3
3.1	Reagenti forniti con i kit di tipizzazione HISTO SPOT [®] locus-specifici	3
3.2	Soluzioni fornite con i kit reagenti HISTO SPOT [®]	3
3.3	Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit	4
4.	CONSERVAZIONE E STABILITA'	4
5.	PROCEDIMENTO DEL TEST.....	4
5.1	Precauzioni di sicurezza e note speciali.....	4
5.2	Estrazione del DNA.....	5
5.3	Amplificazione.....	5
5.4	Test automatizzato di ibridazione su MR.SPOT [®]	6
5.4.1	Preparazione dei reagenti.....	6
5.4.2	Preparazione di MR.SPOT [®]	7
5.4.3	Trasferimento dei risultati ad un PC per l'interpretazione	7
5.4.4	Interpretazione dei risultati.....	7
6.	AVVERTENZE E PRECAUZIONI	7
7.	CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	8
7.1	Validazione	8
7.2	Reazione di amplificazione PCR	8
7.3	Risoluzione del test.....	8
8.	LIMITI DEL METODO	9
9.	CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO	9
10.	PROBLEMI E SOLUZIONI.....	9
11.	MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO	10
12.	SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE	10

1. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il kit HISTO SPOT® SSO Coeliac Disease è un test di diagnostica in vitro per la tipizzazione tissutale in biologia molecolare degli alleli HLA associati a celiachia e fornisce risultati in medio-alta risoluzione. Il sistema HISTO SPOT® SSO consiste dei kit di tipizzazione HISTO SPOT® SSO, dei kit reagenti HISTO SPOT®, dello strumento automatico MR.SPOT® per l'esecuzione dei test e del software interpretativo HISTO MATCH.

I kit di tipizzazione HISTO SPOT® contengono tutti i componenti necessari all'allestimento della reazione di PCR e i pozzetti test sul fondo dei quali sono immobilizzate probe oligonucleotidiche sequenza-specifiche per la rilevazione dei prodotti di PCR. Il kit reagenti HISTO SPOT® consiste dei reagenti necessari alle fasi di ibridazione e rilevazione e possono essere usati in combinazione con i kit di tipizzazione HISTO SPOT®. Lo strumento MR.SPOT® è stato appositamente realizzato per l'uso combinato con i kit di tipizzazione HISTO SPOT®, ed è indicato per il processamento da uno a 96 campioni, rendendo il processo di ibridazione, rilevazione ed interpretazione dei risultati del tutto automatico. Per l'interpretazione dei risultati è necessario il software HISTO MATCH.

1.1 Introduzione e informazioni di base

La Malattia celiaca (CD, Coeliac Disease) è un disordine genetico che colpisce bambini ed adulti di entrambi i sessi. Può iniziare ad ogni età, dall'infanzia (con la prima assunzione di grani di cereali) a un qualsiasi momento della vita (anche se fino a quel dato momento la dieta comprendeva cereali).

I soggetti affetti da questa malattia non dovrebbero ingerire i cibi contenenti glutine, che si trova soprattutto nel grano, nell'orzo, nell'avena e in altri cereali. Nei malati di celiachia, il glutine scatena una reazione autoimmune che causa la distruzione dei villi dell'intestino tenue: il sistema immunitario di questi soggetti produce anticorpi che attaccano l'intestino, causandone gravi danni che si riflettono in spossatezza, deficienza nutritiva, ecc...

L'insorgenza della patologia sembra richiedere due requisiti: una predisposizione genetica e un fattore scatenante. Questo "interruttore" può essere di carattere ambientale (ad es. sovraesposizione al grano), psicologico (stress severo), fisico (stato di gravidanza, postumi di una operazione) o patologico (infezione virale).

Poiché il 5-10% dei parenti di primo grado (genitori, figli, fratelli) dei soggetti celiaci sviluppa a sua volta la malattia, esiste una chiara tendenza familiare: per un trattamento precoce, è pertanto essenziale una diagnostica veloce ed affidabile.

Come già ricordato, la celiachia si manifesta solo in individui predisposti geneticamente. L'ereditarietà genetica della malattia celiaca è fortemente associata con quella di HLA-DQA1*05-DQB1*02 (HLA-DQ2) e HLA-DQA1*03-DQB1*0302 (HLA-DQ8). Questi alleli rappresentano gli antigeni di attacco per gli autoanticorpi prodotti nello stato patologico.

Più del 90% delle persone con celiachia portano uno di questi alleli, o DQ2 o DQ8 (contro il 25% nella popolazione generale).

Pertanto, la rilevazione mediante genetica molecolare dei genotipi HLA-DQ2 o HLA-DQ8 è uno strumento molto potente nella diagnosi della malattia.

Quando un paziente con malfunzione gastrointestinale non presenta il marker DQ2 o DQ8, si può quasi escludere la malattia celiaca come causa.

2. PRINCIPIO DEL TEST

Il test può essere diviso in quattro fasi principali:

- Estrazione del DNA
- Amplificazione tramite PCR
- ibridazione e rilevazione
- interpretazione dei dati.

Sul campione clinico è necessario procedere all'estrazione del DNA, utilizzando un qualsiasi metodo validato nel proprio laboratorio o un kit commerciale. Il DNA viene quindi amplificato con un programma di PCR e una reazione che si avvale di mastermix e MgCl₂ già compresi nel kit. La specificità dell'amplificazione è determinata da un insieme di primer biotinilati che sono stati disegnati in modo da garantire l'amplificazione univoca del locus HLA prescelto. Dopo l'amplificazione, la piastra PCR contenente gli ampliconi marcati con biotina viene trasferita sullo

strumento MR.SPOT®. MR.SPOT® aggiunge il tampone di ibridazione ad ogni pozzetto e trasferisce ogni amplicone (diluito in questo tampone) in un pozzetto test sul fondo del quale sono immobilizzate delle probe oligonucleotidiche sequenza-specifiche (SSO). Queste probe sono o sonde oligonucleotidiche singole o la combinazione di due o più sonde singole, immobilizzate nello stesso spot (probe mosaico), disegnate in modo da incrementare l'identificazione dei polimorfismi localizzati in cis.

L'amplicone marcato con biotina si lega a quelle sonde SSO che contengono una sequenza target complementare e il legame può successivamente essere evidenziato da una reazione colorimetrica. Per prevenire il legame aspecifico dell'amplicone sulla superficie del pozzetto test, MR.SPOT® provvede a saturare i pozzetti stessi tramite un tampone di bloccaggio prima di trasferirvi l'amplicone.

A seguito di una fase di lavaggio stringente volta alla rimozione di tutti gli ampliconi non legati, viene aggiunto nel pozzetto il coniugato streptavidina-fosfatasi alcalina, che si lega all'amplicone marcato con biotina e legato alla sonda SSO. Dopo ulteriori lavaggi, si aggiunge il substrato BCIP/NBT che viene convertito in un prodotto dal colore blu-porpora grazie all'azione enzimatica della fosfatasi alcalina. Il pattern di punti colorati risultante sul fondo di ciascun pozzetto test viene fotografato da MR.SPOT® e l'immagine viene trasmessa al software HISTO MATCH residente sul PC dell'operatore. Il software di analisi di immagine HISTO MATCH determina l'intensità di ciascun punto nell'array e ne confronta il livello rispetto al background. Da questi dati si evincono le reazioni positive e negative. Il software HISTO MATCH confronta il pattern di ibridazioni con quello atteso per ogni determinato allele HLA e quindi determina il tipo di allele/i presente/i nel campione.

3. MATERIALI

3.1 Reagenti forniti con i kit di tipizzazione HISTO SPOT® Coeliac Disease

I reagenti contenuti in un singolo kit sono sufficienti per 48 test. Ogni kit consiste di:

Testwells I Coeliac

test, strip confezionate singolarmente, ogni strip ospita 8 test e contiene sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche immobilizzate 6 strip

Mastermix I Coeliac

Mastermix, pronta all'uso, contenente i primer biotinilati, dNTP, Taq polimerasi, tampone di reazione, 0.05% sodio azide 650 µl

MgCl2

Magnesio cloruro, 6 mM, pronto all'uso, contenente Proclin® 300 allo 0.001 % 600 µl

In ogni kit è incluso un CD contenente il file batch da acquisire nel database del software di interpretazione di HISTO MATCH (per ulteriori dettagli si vedano le istruzioni d'uso del software).

Per ogni kit esistono diversi lotti e diversi batch:

- **Kit:** es. **HISTO SPOT® Coeliac Disease**, definisce il test
- **Lotto:** es. **CD006, CD007**, definisce lo schema spaziale e le specificità delle sonde legate sul fondo dei pozzetti reattivi di ciascun kit. Ogni singolo lotto può essere prodotto in batch differenti
- **Batch:** es. **CD006-1, CD006-2, CD006-3**, definisce la reattività di ogni sonda rispetto alle sonde di controllo (e i conseguenti valori di cut-off), ed è caratterizzato da una precisa data di scadenza.

3.2 Soluzioni fornite con i kit reagenti HISTO SPOT®

I reagenti contenuti in un singolo kit sono sufficienti per 96 test. Ogni kit consiste di:

BLOCKBUF

Tampone di bloccaggio, pronto all'uso, con 0.001% Proclin® 150

HYBBUF

Tampone di ibridazione, pronto all'uso, contiene 0.001% colorante, 0.1% sodio dodecil solfato, 0.001% Proclin® 150

STRGWASH

Tampone di lavaggio stringente, pronto all'uso, contiene 0.001%

colorante, 0.1% sodio dodecil solfato, 0.001% Proclin® 150

TBSWASH

Tampone di lavaggio TBS (Tris Buffered Saline), pronto all'uso, contiene 20 mM Tris, 0.003% colorante, 0.001% Proclin® 150

SUBS

Substrato BCIP / NBT, pronto all'uso, (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitro blue tetrazolio)

CONJ

Coniugato, Streptavidina – fosfatasi alcalina, concentrata contiene < 0.1% di sodio azide (da diluire 1:1666 in tampone di bloccaggio)

3.3 Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit

- Processore MR.SPOT®, incluso il software HISTO MATCH REF 726100
- Puntali per pipette per MR.SPOT®, da 1000 µl REF 726099 e da 200 µl REF 726097
- Reagenti per l'estrazione di DNA (si sconsiglia l'uso del metodo salting out)
- Piastre PCR skirted con tappini o film adesivo (HISTO SPOT® PCR Frameplates, REF 726220, HISTO SPOT® PCR Caps, REF 726090, HISTO SPOT® PCR Foils, REF 726089)
- Termociclatore
- Acqua deionizzata
- Pipette a volume variabile (range 0,5 – 1000 µl) e puntali consumabili

4. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Tutti i reagenti e componenti del kit dovrebbero essere mantenuti a una temperatura tra i +2 °C e +8 °C. La data di scadenza è indicata sull'etichetta di ciascun componente del kit ed è valida per i reagenti correttamente conservati e tenuti sigillati. La data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione esterna fa riferimento a quella del componente con stabilità minore contenuto nel kit.

E' possibile aprire le singole strip da 8 pozzetti, spezzarle in modo da utilizzare solo il numero di pozzetti richiesti e richiudere quelli non utilizzati nella confezione. I pozzetti all'interno di una confezione aperta, però, devono essere utilizzati entro 30 giorni dall'apertura. Gli altri reagenti aperti devono essere utilizzati entro 3 mesi. La diluizione del coniugato deve essere preparata sempre fresca prima di ogni test.

5. PROCEDIMENTO DEL TEST

5.1 Precauzioni di sicurezza e note speciali

Le tecniche di genetica molecolare sono metodi particolarmente sensibili e dovrebbero essere condotte solo da personale adeguatamente istruito ed esperto nel campo della istocompatibilità. I risultati di questi test non devono essere utilizzati come unica fonte per prendere decisioni a livello clinico. Per minimizzare il rischio di false tipizzazioni, occorre seguire le linee guida e gli standard EFI, in particolare nel caso di discrepanze tra i risultati ottenuti con la metodica in sierologia e biologia molecolare.

Occorre seguire particolari condizioni di sicurezza per evitare la contaminazione e quindi reazioni false positive:

- ◆ Indossare i guanti durante il lavoro (se possibile, senza talco).
- ◆ Cambiare il puntale ad ogni fase di dispensazione (con filtro).
- ◆ Separare l'area di lavoro della pre-amplificazione (estrazione del DNA ed allestimento delle reazioni) da quella della post-amplificazione (ibridazione e rivelazione). Preferibilmente, utilizzare due stanze separate.
- ◆ L'amplificato non deve essere riportato nell'area pre-PCR.
- ◆ Utilizzare dispositivi ed altri materiali solo in posti fissi e prescelti e non cambiarli.

5.2 Estrazione del DNA

Estrarre il DNA con la metodica comunemente utilizzata nel proprio laboratorio, compatibile con una successiva PCR (si sconsiglia l'utilizzo del metodo di salting out). La presenza di eparina è causa potenziale di inibizione della PCR; pertanto, si consiglia di raccogliere il sangue in provette con EDTA o citrato. I campioni di DNA estratti dovrebbero avere una concentrazione di circa 15-30 ng/μl. Gli indici di purezza dovrebbero essere i seguenti:

- rapporto delle estinzioni OD_{260}/OD_{280} : > 1.5 e < 2.0

Valori maggiori sono indicativi della presenza di RNA, valori inferiori segnalano invece la contaminazione con proteine.

- Rapporto delle estinzioni OD_{260}/OD_{230} : > 1.8

Valori inferiori sono indicativi di una possibile contaminazione con carboidrati, sali o solventi organici.

5.3 Amplificazione

Utilizzare delle piastre PCR skirted per l'amplificazione, poiché devono essere poi bloccate nell'alloggiamento di MR.SPOT® mediante una clamp a chiusura sul bordo. La metodica è stata validata con le HISTO SPOT® PCR Frameplates, piastre di altro fornitore dovranno essere validate dall'utilizzatore. Per ogni campione da amplificare, aggiungere i seguenti reagenti ad ogni provetta PCR:

- 10 μl Mastermix
- 5 μl $MgCl_2$
- 5 μl DNA campione (15-30 ng/μl)

Il volume totale di ogni reazione di amplificazione è di 20 μl.

Premix per campioni multipli: $\left. \begin{array}{l} \text{no. di campioni}+2 \quad \times \quad 10 \mu\text{l Mastermix} \\ \text{no. di campioni}+2 \quad \times \quad 5 \mu\text{l } MgCl_2 \end{array} \right\}$ utilizzare 15μl di premix per campione

Nota: è importante che la concentrazione del DNA sia nel range indicato tra i 15 e i 30 ng/μl. Concentrazioni maggiori possono generare reazioni false positive sulle sonde e concentrazioni inferiori viceversa possono causare mancanza d'amplificazione.

Nel caso in cui si desideri inserire un **controllo negativo**, preparare una reazione di PCR con acqua distillata in luogo del campione di DNA.

Chiudere le provette da PCR con tappini o film adesivo, effettuare una rapida centrifugata per raccogliere tutto il liquido sul fondo di ogni pozzetto, posizionarle nella griglia del termociclatore e procedere con l'amplificazione secondo il seguente programma:

Fase del programma	Tempo	Temperatura	N° di cicli
Prima denaturazione	2 Min	96°C	1 ciclo
Denaturazione	15 Sec	96°C	10 cicli
Annealing + Estensione	60 Sec	65°C	
Denaturazione	10 Sec	96°C	20 cicli
Annealing	50 Sec	61°C	
Estensione	30 Sec	72°C	
Attesa	∞	22°C	

Le condizioni sono identiche per tutti i termociclatori, tuttavia il tempo totale richiesto per l'amplificazione varierà a seconda della velocità di ramping dello specifico strumento in uso. I kit HISTO SPOT SSO sono stati validati coi seguenti modelli di termociclatore:

Applied Biosystems: PE9600, PE9700 (utilizzare la ramp rate del PE9600), Veriti™;
Biorad: PTC100/PTC200, MyCycler;
Eppendorf: Mastercycler EP Gradient S.
Qualora si utilizzino altri tipi di termociclatore, l'operatore dovrà validarli.

Una volta che la fase di amplificazione è stata completata, i campioni possono essere immediatamente processati o tenuti in frigorifero (tra +2°C e +8 °C) fino a 5 giorni.

5.4 Test automatizzato di ibridazione su MR.SPOT®

5.4.1 Preparazione dei reagenti

Prelevare i reagenti HISTO SPOT® e i pozzetti test fuori dalla confezione, lasciarli equilibrare a temperatura ambiente.

Potrebbero essere visibili cristalli di sale nel tampone di ibridazione e nella soluzione di lavaggio stringente. Nel caso in cui siano presenti tali precipitati, scaldare le soluzioni a 30 °C fino a completo scioglimento. Attenzione: scaldare l'intera soluzione, non solo un'aliquota.

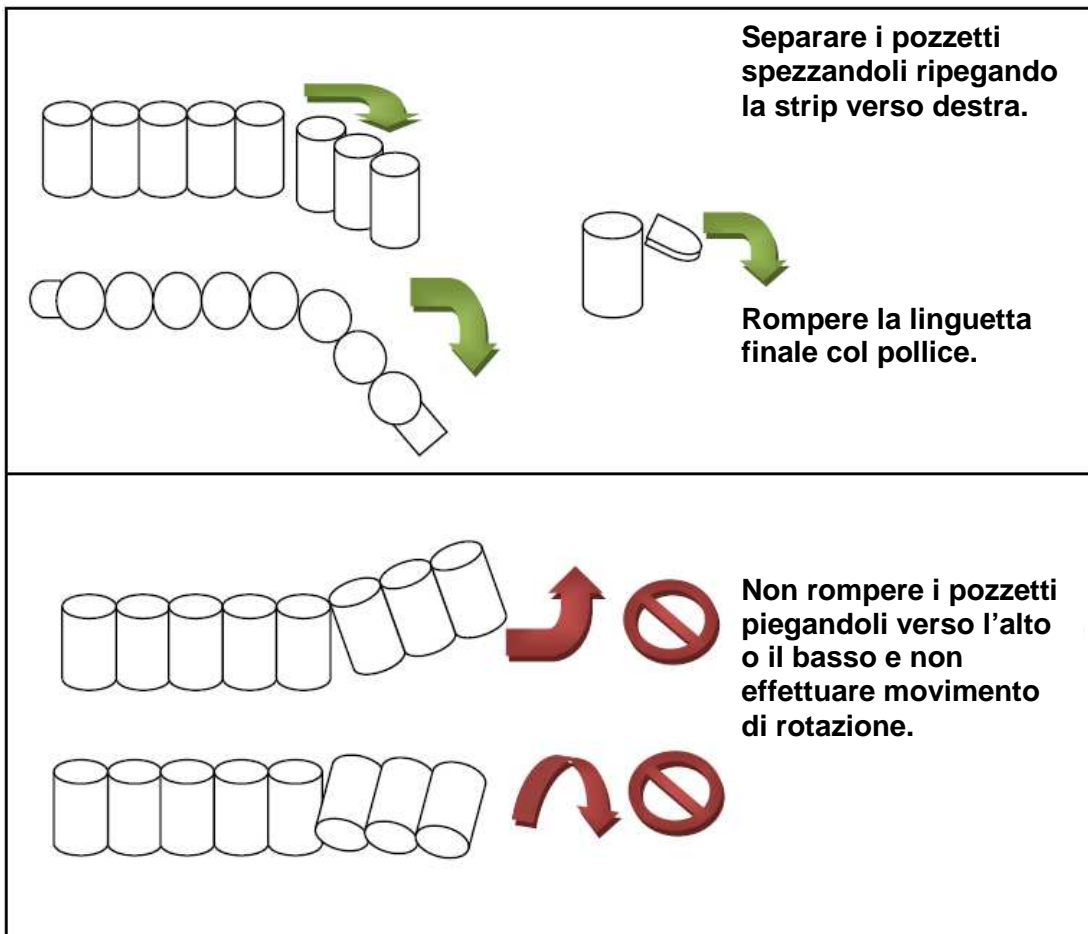
Il coniugato dev'essere diluito nel tampone di bloccaggio ad 1:6666. La diluizione del coniugato dev'essere sempre preparata fresca al momento prima di ogni test. **Vortexare e quindi eseguire un breve spin della provetta del coniugato prima di procedere allo step di diluizione!**

I volumi richiesti dei reagenti variano a seconda del numero di strip o pozzetti da testare. MR.SPOT® indica in automatico le quantità richieste in base al numero delle strip. Riempire i serbatoi corrispondenti con i volumi richiesti per ciascun reagente.

Posizionare i pozzetti test e la piastra da PCR nei loro alloggiamenti su MR.SPOT®. Prestare particolare attenzione al corretto posizionamento della piastra da PCR.

Assicurarsi che non ci siano particelle di polvere o plastica nell'alloggiamento della piastra di reazione, poiché potrebbero disturbare il trasferimento di calore durante l'ibridazione.

Le strip dei pozzetti test possono essere separate in pozzetti singoli seguendo le istruzioni nella figura 1, nel caso in cui si debba eseguire un numero di test inferiore ad otto. Nel caso in cui si utilizzino pozzetti separati fare attenzione che siano posizionati in modo corretto nell'alloggiamento, senza che sia bloccato l'inserimento dai pozzetti vicini.



5.4.2 Preparazione di MR.SPOT®

Accendere lo strumento Mr.SPOT®, il PC interno e il touch screen. Quando compare la finestra di avvio, procedere come indicato nelle istruzioni a video. Nel manuale d'uso dello strumento MR.SPOT® queste operazioni sono descritte in modo dettagliato.

Attenzione: lo strumento Mr.SPOT® e i relativi reagenti devono essere tenuti lontani dalla luce solare diretta.

5.4.3 Trasferimento dei risultati ad un PC per l'interpretazione

Trasferire i dati al software interpretativo HISTO MATCH attraverso un cavo di rete o con una chiavetta USB, come descritto nel manuale del software.

5.4.4 Interpretazione dei risultati

Avviare il software HISTO MATCH (può essere installato, qualora non lo fosse, dal CD inviato insieme allo strumento) e procedere con l'interpretazione dei risultati come descritto nel manuale software.

6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

HISTO SPOT® è stato ideato per uso diagnostico in vitro e dovrebbe essere utilizzato solo da personale adeguatamente istruito e qualificato. Le procedure devono essere eseguite utilizzando la buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practices).

Il materiale biologico utilizzato per l'estrazione del DNA, ad es. tessuti o sangue umano, dovrebbe essere maneggiato come se fosse potenzialmente infettivo. Nel maneggiare materiale biologico si raccomanda di adottare precauzioni di sicurezza adeguate (non

pipettare con la bocca, indossare guanti monouso mentre si utilizza materiale biologico e durante il test, disinfettare le mani una volta terminato il test).

Prima dello smaltimento, il materiale biologico deve essere inattivato (ad es. in un ciclo di autoclave). I materiali consumabili dovrebbero essere autoclavati o bruciati dopo l'uso.

Fuoriuscite accidentali di materiale potenzialmente infettivo devono essere immediatamente rimosse con un tessuto di carta assorbente e le aree contaminate devono essere trattate con un disinfettante o con alcool al 70%. Il materiale utilizzato per pulire le fuoriuscite, guanti compresi, dev'essere inattivato prima dello smaltimento (ad esempio in un ciclo di autoclave).

Il tampone di bloccaggio, di ibridazione, di lavaggio stringente e il TBS contengono ProClin®150 mentre la soluzione di magnesio cloruro contiene ProClin®300. La concentrazione di ProClin®300 (0.001%) è molto bassa, si consiglia comunque di evitare il contatto con la pelle e le membrane mucose.

La mastermix e la soluzione del coniugato contengono sodio azide come conservante. La concentrazione di sodio azide è < 0.1%, che non è considerata dannosa. Tuttavia, si consiglia di evitare il contatto con la pelle e le membrane mucose: il sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame e formare metalli esplosivi. Quando si eliminano le soluzioni con sodio azide attraverso gli scarichi del laboratorio, far scorrere una quantità cospicua di acqua in modo da evitare la reazione suddetta.

Maneggiare i reagenti richiede delle opportune precauzioni: indossare una protezione per gli occhi, camice da laboratorio e guanti consumabili. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con acqua abbondante. In caso di mancato trattamento potrebbero manifestarsi delle bruciature.

Nel caso di fuoriuscite accidentali di reagenti, diluire prima con acqua e quindi pulire l'area contaminata. Non mettere in contatto il reagente "Substrate" con metalli o agenti ossidanti.

Smaltire i campioni, i reagenti non utilizzati e gli scarti secondo le legislazioni comunitarie, nazionali e locali.

Durante la preparazione di aliquote dalle bottiglie dei reagenti, porre molta attenzione per evitare contaminazione microbica. Si raccomanda l'uso di pipette consumabili e puntali sterili. Non utilizzare reagenti che presentano una soluzione torbida o evidente contaminazione microbica.

Le schede di sicurezza (MSDS) possono essere scaricate dal sito www.bag-healthcare.com.

7. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

7.1 Validazione

Per i kit HISTO SPOT® SSO è stato condotto un lavoro di validazione con 180 campioni. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con altre metodiche (ad es. SSP, sequenziamento). Non si sono osservate discrepanze tra i risultati ottenuti con le diverse metodiche. Per ciascun lotto, la specificità di ogni sonda è stata verificata utilizzando un DNA da campioni di controllo.

7.2 Reazione di amplificazione PCR

Le informazioni relative agli alleli amplificati dal kit HISTO SPOT® Coeliac Disease, la versione aggiornata della nomenclatura a cui fanno riferimento, e gli esoni che vengono amplificati sono fornite nelle note specifiche per ogni lotto, su CD.

7.3 Risoluzione del test

Il kit HISTO SPOT® Coeliac Disease è stato ideato per fornire risultati non ambigui per gli alleli HLA associati con celiachia.

Vengono considerate ambigue le diverse combinazioni alleliche che correlano gruppi allelici diversi ma che mostrano lo stesso pattern di sonde positive.

8. LIMITI DEL METODO

Poiché variazioni nella concentrazione e qualità del DNA hanno grande influenza sulla resa della reazione di PCR, occorre usare campioni di DNA che mostrano una concentrazione di almeno 15 ng/µl e valori di purezza adeguati (rapporto di assorbanze OD₂₆₀/OD₂₈₀ compreso tra 1.5 e 2.0; OD₂₆₀/OD₂₃₀ > 1.8).

Prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti del kit ed altri materiali e dispositivi di laboratorio con amplificati o DNA genomico. Si raccomanda vivamente di eseguire test di contaminazione (wipe test – ad es. con Wipetest della BAG, [REF] 7091) e di includere i controlli negativi in ogni test.

L'ibridazione è un processo critico per la temperatura. Pertanto, i kit HISTO SPOT® SSO sono da usare solo in combinazione con il processore automatico MR.SPOT® per assicurare tempi e temperature di incubazione corretti.

Tutti gli strumenti e dispositivi (ad es. pipette, termociclatori, blocchi riscaldanti, MR.SPOT®) devono essere calibrati secondo le istruzioni del produttore. In particolare, l'uniformità e l'accuratezza dei termociclatori può essere verificata con il kit BAG Cycler Check ([REF] 7104).

9. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Il controllo di qualità interno dei nuovi lotti di HISTO SPOT® Coeliac Disease può essere eseguito utilizzando una combinazione di campioni di DNA con genotipo HLA noto.

In ogni pozzetto test sono inseriti dei controlli positivi interni, allo scopo di verificare che la PCR sia avvenuta in modo corretto e si sia verificata l'ibridazione.

Si raccomanda l'uso dei controlli negativi per controllare le possibili contaminazioni. Come controllo negativo, allestire una reazione di PCR senza DNA per ogni test di ibridazione successivo.

10. PROBLEMI E SOLUZIONI

Sintomo	Possibili problemi	Soluzioni potenziali
Malfunzionamento dello strumento	Numerosi	Fare riferimento al manuale di MR.SPOT®
Messaggio d'errore durante trasferimento dati	Fallimento nel trasferimento dati	Trasferire manualmente i dati con chiavetta USB
Nessun risultato	La griglia non è correttamente sovrapposta all'immagine	Procedere manualmente alla sovrapposizione della griglia
Nessuno spot nei pozzetti	Non è stata aggiunta la mastermix per la PCR	Ripetere l'intero test, controllando gli amplificati su gel
Solo gli spot di controllo sono positivi	Non è stato aggiunto il DNA per la PCR o non è avvenuta amplificazione	Ripetere l'intero test, controllando gli amplificati su gel
Probe false positive	Troppo DNA o concentrazione di coniugato elevata (mancato spin)	Verificare la concentrazione di DNA, spinnare il coniugato prima dell'utilizzo
Fallita reazione su esone	Concentrazione DNA troppo alta o DNA degradato	Verificare la concentrazione di DNA, effettuare elettroforesi
Nessun risultato / risultati inconsistenti a causa di basso segnale	Errore nella diluizione del coniugato o mancata amplificazione. Malfunzionamento dello strumento.	Ripetere il test. Controllare la temperatura d'ibridazione




11. MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO

Proclin® è un marchio registrato della Rohm and Haas

BCIP® è un marchio registrato di Sigma Aldrich Co.

Veriti™ è un marchio registrato di Applied Biosystems

12. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE

IVD	Per uso diagnostico in vitro
	Temperatura di conservazione
LOT	Numero lotto
	Utilizzare entro
REF	Numero di catalogo
HLA TYPING	Destinazione d'uso: tipizzazione HLA
	Consultare le istruzioni per l'uso
Mastermix Coeliac	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-A
Testwells Coeliac	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-A
MgCL2	Soluzione di magnesio cloruro
BLOCKBUF	Buffer di bloccaggio
HYBBUF	Buffer di ibridazione
STRGWASH	Soluzione di lavaggio stringente
TBS	TRIS buffered saline
SUBS	Substrato
CONJ	Coniugato streptavidina-fosfatasi alcalina

Istruzioni d'uso in altre lingue:

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

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

o tel. +49 (0)6404-925-125