

Documentazione e traduzione disponibili all'indirizzo: [www.Immucor.com](http://www.Immucor.com)

## M E T O D I C A














### KIT DI TIPIZZAZIONE SSO HLA-Allele Nullo LIFECODES

Per uso diagnostico in vitro

#### SOMMARIO

<b>Definizione dei simboli</b> .....	1	<b>Istruzioni per l'utilizzo</b> .....	4
<b>Kit/Reagenti forniti</b> .....	2	A. Purificare il DNA genomico .....	4
<b>Utilizzo previsto</b> .....	2	B. Amplificazione del DNA (PCR).....	4
<b>Riepilogo e descrizione</b> .....	2	C. Ibridazione .....	5
<b>Principi della procedura</b> .....	2	D. Analisi del campione con lo strumento Luminex.....	5
<b>Reagenti</b> .....	3	<b>Risultati</b> .....	6
A. Identificazione.....	3	<b>Controllo della qualità</b> .....	6
B. Avvertenze e pericoli .....	3	<b>Limiti della procedura</b> .....	6
C. Istruzioni per la conservazione .....	3	<b>Risoluzione dei problemi</b> .....	7
D. Purificazione o trattamento per l'utilizzo .....	3	<b>Valori attesi</b> .....	7
E. Indicazioni di instabilità .....	3	<b>Caratteristiche specifiche del kit</b> .....	7
<b>Caratteristiche tecniche degli strumenti</b> .....	3	<b>Riferimenti</b> .....	7
<b>Raccolta e preparazione dei campioni</b> .....	3	<b>Licenze limitate</b> .....	7
<b>Procedura</b> .....	3	<b>Marchi registrati</b> .....	8
A. Materiali forniti .....	3	<b>Appendice A</b> .....	8
B. Materiali necessari ma non forniti .....	3	Elettroforesi su gel .....	8
C. Materiali aggiuntivi che devono essere forniti dall'utente .....	3	Interpretazione del gel.....	8




#### DEFINIZIONE DEI SIMBOLI (etichette e documentazione supplementare)

Codice del lotto		Numero di catalogo		Limiti di temperatura		Limite massimo di temperatura	
Utilizzare entro		Tenere al riparo dalla luce		Sufficiente per N test		Non congelare	
Attenzione: leggere le istruzioni per l'utilizzo		Consultare le istruzioni per l'uso		Produttore		Mandatario nella Comunità Europea	
Pericolo							

## REAGENTI FORNITI

### **LCT -N** Kit di tipizzazione SSO HLA-Allele Nullo LIFECODES, Prodotto n. 628939

### **LC-N** Kit di tipizzazione HLA- Allele Nullo LIFECODES per l'uso con il Luminex Prodotto n. 629100-50

Reagente	Codice prodotto	Quantità	Conservazione	 Sufficiente per 50 test
<b>MX-N1</b>	Miscela Master Allele Nullo Classe 1 LIFECODES 629001	870 µL	Da 2 a 8 °C	
<b>MX-N2</b>	Miscela Master Allele Nullo Classe 2 LIFECODES 629002	870 µL	Da 2 a 8 °C	
<b>BM-N</b>	Miscela sonde Allele Nullo LIFECODES † 629003	810 µL x 2	Da 2 a 8 °C <b>Tenere al riparo dalla luce</b>	
<b>DS</b>	Soluzione di diluizione 628515	19,7 mL	Da 18 a 30 °C	
<b>TAQ</b>	Taq Polimerasi LIFECODES 628075	25 µL x 2	Da -10 a -30 °C	

† Le miscele di sonde sono fotosensibili: evitare il più possibile l'esposizione alla luce.

ATTENZIONE: non utilizzare oltre la data di scadenza.

ATTENZIONE: le non conformità al protocollo raccomandato e ai materiali necessari, incluso LIFECODES Taq Polimerasi, non sono state convalidate.

## UTILIZZO PREVISTO

Tipizzazione DNA di Alleli Classe I e Classe II insieme ai Kit di tipizzazione HLA SSO LIFECODES.

## RIEPILOGO E DESCRIZIONE

La tipizzazione dell'HLA attraverso l'amplificazione del DNA mediante PCR è una procedura comunemente usata nei laboratori. L'amplificazione del DNA mediante PCR consente di amplificare una regione specifica di DNA. Nel caso della tipizzazione dell'HLA, viene effettuato un test per determinare la qualità del DNA amplificato. Nella tipizzazione dell'HLA sono stati adottati diversi metodi di analisi, ad esempio la tecnologia dot blot SSP (1), SSOP diretta (2), RFLP (3) e SSOP inversa (4). Analogamente ai metodi SSOP e dot blot inverso, i kit di tipizzazione HLA-SSO LIFECODES si avvalgono di oligonucleotidi specifici della sequenza (SSO) per individuare gli alleli HLA presenti in un campione amplificato mediante PCR. È l'insieme degli SSO usati, non le metodologie, a determinare la capacità di discriminare i diversi alleli presenti nell'amplificazione mediante PCR. Mentre i metodi dot blot inverso e SSOP si avvalgono di traccianti enzimatici e substrati colorimetrici che richiedono uno sviluppo successivo, il test LIFECODES è un sistema multiplex omogeneo. Tutti gli SSO vengono analizzati simultaneamente e l'intero test è eseguito in un unico pozzetto di reazione con l'aggiunta di un solo reagente.

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La procedura di tipizzazione HLA-SSO LIFECODES si basa sull'ibridazione di ssDNA, amplificato mediante PCR a sonde SSO. In genere l'amplificazione del DNA mediante PCR richiede quantità equimolari di primer per generare dsDNA. Se la quantità di uno dei due primer è in eccesso, la reazione genererà ssDNA in aggiunta al prodotto a doppio filamento. Il DNA a doppio filamento viene generato durante i cicli iniziali della fase di amplificazione LIFECODES. Una volta esaurito il primer limitatore, il primer residuo utilizza il prodotto a doppio filamento come template per produrre DNA a singolo filamento. Con questo metodo viene prodotto DNA a doppio e a singolo filamento che, in seguito a denaturazione, partecipa con entrambe le forme alla reazione di ibridazione.

Ciascuna delle diverse sonde può risultare omologa a una sequenza del DNA amplificato associata in modo univoco a un allele o gruppo di alleli. In altre parole, le sonde sono progettate in modo che ciascuna di esse possa ibridarsi, in modo specifico a una regione complementare eventualmente presente nel DNA amplificato. Inoltre, il DNA amplificato viene ibridato anche in una o più sonde di consenso omologhe alle sequenze presenti in tutti gli alleli di un locus. La tipizzazione SSO può essere condizionata dal tipo di materiale biologico, dal metodo di purificazione, dalla quantità e dalla integrità del DNA genomico, quindi, il segnale ottenuto per le sonde di consenso può rivelarsi utile come indicatore del buon esito delle procedure di amplificazione e ibridazione. Inoltre, il segnale ottenuto con la sonda di consenso può essere utilizzato per normalizzare il segnale delle sonde allele-specifiche e correggere le variazioni di quantità del prodotto amplificato nella reazione di ibridazione. L'analisi dei risultati generati dalla tipizzazione SSO può essere utilizzata per determinare la presenza o l'assenza di particolari sequenze di DNA nel DNA amplificato e per individuare nel campione i possibili alleli.

Nel caso della procedura di tipizzazione HLA-SSO LIFECODES, le sonde sono collegate alle microsfere Luminex progettate per l'utilizzo con lo strumento Luminex. Con lo strumento Luminex è possibile miscelare ed analizzare fino a 100 gruppi diversi di microsfere Luminex perché ciascun gruppo di microsfere può essere discriminato in base alla propria caratteristica o al proprio colore di fluorescenza. A ciascuna microsfera colorata può essere collegata una sonda SSO diversa. Di conseguenza è possibile distinguere le diverse sonde grazie alla corrispondente associazione a particolari microsfere colorate. Lo strumento Luminex è inoltre in grado di quantificare la quantità di PE legata al DNA ibridato alle microsfere Luminex assegnando un risultato di positività o negatività al campione e determinando il fenotipo HLA.

Nullo 1 viene utilizzato come test complementare per aumentare la risoluzione dei test HLA-A, HLA-B, HLA-C LIFECODES risolvendo l'ambiguità allelica tra A\*24:02/24:09N, B\*51:01/ 51:11N, e C\*04:01/04:09N. Nullo 2 viene utilizzato come test complementare per aumentare la risoluzione del test HLA-DRB 3,4,5 LIFECODES risolvendo l'ambiguità allelica tra DRB4\* 01:03/ DRB4\* 01:03:01:02N, e DRB5\*01:02/DRB5\*01:08N

Combinare le informazioni del test Nullo 1 o 2 con i risultati del test dei kit di tipizzazione LIFECODES SSO per generare una tipizzazione suggerita di un campione che può essere condotta attraverso l'analisi manuale o l'analisi mediante software. Per l'analisi manuale, l'esito dei test Nullo 1 o 2 identifica la presenza o l'assenza di alleli nulli specifici. Il risultato dei kit di tipizzazione SSO LIFECODES specifici per loco possono comportare ambiguità che riguardano questi alleli nulli (ad es., A\*24:02/24:09N, B\*51:01/ 51:11N, C\*04:01/04:09N, DRB4\* 01:03/ DRB4\* 01:03:01:02N o DRB5\*01:02/DRB5\*01:08N). Se l'allele nullo viene identificato come prodotto Nullo, tutte le combinazioni di alleli che non includono l'allele nullo possono essere eliminate dai risultati ottenuti con il kit di tipizzazione SSO LIFECODES specifico per loco. Se l'allele nullo è assente in base al risultato del prodotto Nullo, tutte le combinazioni di alleli che includono l'allele Nullo possono essere eliminate dai risultati ottenuti dal kit di tipizzazione LIFECODES SSO specifico per loco. Nella metodica e nel software, viene fatto riferimento a questo processo di combinazione dei risultati dei due prodotti come alla combinazione dei risultati.

## REAGENTI

### A. Identificazione

Per un elenco completo dei codici catalogo, vedere le tabelle nella sezione che elenca i reagenti forniti con i codici dei prodotti.

### B. Avvertenze e pericoli

1. Per uso diagnostico in vitro.
2. È necessario predisporre pipette distinte per la preparazione dei campioni nelle fasi di pre- e post-amplificazione.
3. **Rischio biologico:** tutti i campioni ematici e biologici devono essere considerati potenzialmente infetti. **Adottare le precauzioni universali durante la manipolazione.**
4. La soluzione di diluizione, le miscele di sonde, la TAQ polimerasi e la PE-Streptavidina contengono composti pericolosi. Evitare il contatto con l'epidermide e con gli occhi e dopo l'uso, smaltire tutti i materiali in base alle normative locali. Per ulteriori informazioni consultare le schede sicurezza.

### C. Istruzioni per la conservazione

1. Per le temperature di conservazione appropriate, consultare l'etichetta dei componenti del kit.
2. Le miscele di sonde e la PE-Streptavidina sono fotosensibili, **TENERE AL RIPARO DALLA LUCE; NON CONGELARE.**
3. Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza.

### D. Purificazione o trattamento richiesto per l'utilizzo

Vedere "Raccolta e preparazione dei campioni".

### E. Indicazioni di instabilità

1. Se durante il trasporto o la conservazione nella soluzione si sono formati precipitati salini, sciogliere completamente la soluzione prima dell'uso agitando al vortex a temperatura ambiente (da 18 a 30 °C).
2. Non utilizzare Streptavidina coniugata a R-Ficoeritrina congelata durante il trasporto la conservazione.

## CARATTERISTICHE TECNICHE DEGLI STRUMENTI

1. Strumento Luminex, PIATTAFORMA XY (numero prodotto 888300, 888302)
2. Sono stati convalidati i seguenti Thermal Cycler: 96-Well GeneAmp® PCR System 9700 impostato in modalità MAX (Cat. base N. N8050200, Gold Block Cat. N.4314878), Veriti™ 96-Well Thermal Cycler impostato in modalità 9700 MAX (Cat. N.4375786). Fare riferimento alla tabella 2 per la massima velocità di rampa. Attenzione: altri thermal cycler e diverse velocità di rampa non sono state convalidate.

## RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- A. Il DNA umano può essere purificato da sangue intero, sovrantanti e taponi orali usando un metodo convalidato che soddisfa i criteri seguenti. In questo test è stato usato DNA estratto da sangue conservato in EDTA e ACD (Acido Citrato Destrosio), che ha fornito i risultati desiderati
- B. Il DNA estratto dal sangue conservato in eparina non può essere usato in questo test. Non sono stati testati altri conservanti.
- C. Il DNA isolato deve trovarsi in 10 mM di TRIS, a pH 8,0-9,0, oppure in acqua priva di nucleasi. Se è presente un agente chelante come l'EDTA, la concentrazione finale dell'agente non dovrà eccedere 0,5 mM.
- D. La presenza di alcool, detergenti o sali potrebbe influire negativamente sull'amplificazione del DNA.
- E. La concentrazione finale di DNA deve essere di 10 – 200 ng/μl.
- F. I valori di assorbanza del campione di DNA rilevati a 260 e a 280 nm devono fornire un rapporto di 1,65/2,0.
- G. Il DNA può essere utilizzato immediatamente dopo l'isolamento oppure conservato a -20 °C fino a 1 anno. Evitare il congelamento/scongelo continuo perché può provocare la degradazione del DNA.

## PROCEDURA

Attenzione: le non conformità al protocollo raccomandato e ai materiali necessari non sono state convalidate

### A. Materiali forniti (per informazioni specifiche, vedere le tabelle nella sezione che elenca i kit/reagenti forniti con i codici dei prodotti)

- Miscela master appropriata (MX)
- Miscela/miscele di sonde appropriata/e (BM)
- Soluzione di diluizione (DS)
- Tabella delle soglie, grafico dei risultati delle sonde
- LIFECODES Taq Polimerasi\* (LIFECODES Cat. N. 628075) x 2

### B. Materiali necessari, ma non forniti

Per la validazione del kit sono stati usati i seguenti materiali:

- Luminex Sheath Fluid (1x Lifecodes Cat. N. 628005)
- Acqua priva di nucleasi (Lifecodes Cat. N. 757003; 20mL)
- Provette e tappi PCR – strisce Corning® Thermowell (Costar® Cat. No. 6542, LIFECODES Cat. N. 888640) o Axygen 8-Strip Provette PCR (Axygen Cat. N. PCR0208CPC) o Applied Biosystems MicroAmp 8- Provette Strip e MicroAmp 8-Cap Strip (ABI Cat. N. N8010580 e N8010535) o piastre per pozzetti Corning® Thermowell PCR 96 (Cat. N. CLS6551) o piastra PCR a 96 pozzetti Thermoscientific AB Gene® Superplate (Cat. N. AB-2100)
- Piastra Costar® (Costar® Cat. N. 6509, LIFECODES Cat. N. 888630)
- Nastro in polietilene trasparente Thermowell (Costar® N. 6524, LIFECODES Cat. N. 888635)
- Streptavidina coniugata a R-Ficoeritrina (SA-PE), 1mg/mL (LIFECODES Cat. N. 628511)
- Kit di calibrazione Luminex (Kit di calibrazione Luminex 100/200, Kit di verifica performance Luminex 100/200, LIFECODES Cat. N. 628018 e 628019 rispettivamente)

### C. Materiali aggiuntivi che devono essere forniti dall'utente

- Miscelatore Vortex
- Pannello di compressione Axygen Scientific N. CM-FLAT o equivalente
- Agitatore a ultrasuoni
- Microcentrifughe
- Puntali con filtro
- Pipettatori, pipettatori multicanale e puntali (1-20μL, 20-200μL, 1000μL)
- Software per la visualizzazione dei fogli di lavoro
- Incubatore
- Isopropanolo al 70% oppure candeggina comune al 20%
- Vassoio - Applied Biosystems N.403081 (solo per uso con thermal cycler 9700)

# ISTRUZIONI PER L'UTILIZZO

## NOTE

- Le miscele di sonde e la PE-Streptavidina sono fotosensibili: **tenere al riparo dalla luce e non congelare.**
- Riscaldare le microsferi a 55 a 60 °C per almeno 5 -10 minuti in modo da rendere completamente solubili i componenti nella miscela della sonda.
- Agitare brevemente a ultrasuoni (~15 sec) e al vortex per circa 15 secondi in modo da portare completamente in sospensione le microsferi.
- Adottare estrema cautela nel dispensare reagenti e campioni per evitarne la perdita.
- Osservare scrupolosamente tutte le temperature indicate. Fluttuazioni dell'ordine di +/- 0,5°C possono inficiare i risultati.
- Durante la fase di ibridazione i campioni non devono rimanere nello stato diluito a 56°C per più di 5 minuti (vedere la sezione Risultati). Si consiglia di testare i campioni amplificati nel più breve tempo possibile. Se i campioni non possono essere esaminati con lo strumento Luminex nello stesso giorno, **il prodotto amplificato può essere conservato fino a 3 giorni prima dell'utilizzo a 2 a 8 °C. Per periodi di conservazione più lunghi, si consiglia una temperatura di -20 °C fino a una settimana prima dell'utilizzo. L'amplificato può essere congelato e scongelato solo una volta. Il congelamento e lo scongelamento continui provocano la degradazione dei campioni amplificati e producono risultati insoddisfacenti una volta analizzati.**

**A. Purificare il DNA genomico** utilizzando un metodo a scelta; la concentrazione finale dovrà essere di 10 – 200 ng/µl. Se necessario, correggere con acqua priva di nucleasi. Conservare la stessa concentrazione in tutti i campioni.

## B. Amplificazione del DNA (PCR)

- Portare a temperatura ambiente la miscela master (18 - 30 °C).
- Agitare delicatamente i reagenti al vortex per circa 10 secondi per sciogliere bene i sali. Centrifugare brevemente (5 – 10 secondi) in microcentrifuga per consentire al contenuto di depositarsi sul fondo.
- Seguendo la **Tabella 1** riportata di seguito, preparare i componenti per l'amplificazione per n+1 reazioni utilizzando la quantità indicata di ciascun componente per reazione (ad eccezione del DNA). Portare a un volume finale di 20 µl per reazione con acqua priva di nucleasi. . Agitare delicatamente al vortex.
- Dispensare con la pipetta la quantità appropriata di DNA genomico (**40-120 ng**) nelle provette per PCR.
- Dispensare la miscela di amplificazione nelle provette per PCR contenenti il DNA genomico. Il volume totale della miscela master e del DNA genomico deve essere pari a 20 µl per ciascuna reazione.
- Tappare saldamente le provette per evitare l'evaporazione durante la PCR.
- Posizionare i campioni nel thermal cycler e avviare il programma; vedere le **Tabelle 2 e 3**.

**Tabella 1. Componenti di reazione per l'amplificazione**

Componente	Quantità per campione
Miscela master LIFECODES	6 µl
DNA genomico 10-200 ng/µl	Totale di ~80 ng
Taq Polimerasi	0,2 µl (1 U)
Acqua priva di nucleasi	Q.B. per un volume finale di 20 µl

**Tabella 2. Condizioni di amplificazione**

Termociclatorer	Modalità (velocità di rampa)
GeneAmp® PCR System 9700	Modalità MAX (3,9°C/sec)
Veriti™ 96-Well Thermal Cycler	Modalità 9700 MAX (3,9°C/sec)

**Tabella 3. Condizioni di amplificazione**

Fase	Temperatura e tempi di incubazione	N. di cicli
1	Da 95°C per 3 min	1
2	Da 95°C per 15 sec	12
	Da 60°C per 30 sec	
	Da 72°C per 30 sec	
3	Da 95°C per 10 sec	28
	Da 63°C per 30 sec	
	Da 72°C per 30 sec	
4	Da 72°C per 2 min	1
5	4° C sempre	1

Nota: per essere certi dell'amplificazione del campione, consultare la sezione relativa all'elettroforesi su gel (Appendice A).

## C. Ibridazione

- **Accertarsi che il tampone della miscela di sonde per l'ibridazione LIFECODES sia ben sciolto e che le microsfele siano completamente in sospensione.**
  - **Accendere e lasciar riscaldare lo strumento Luminex e la piastra XY per 30 minuti.**
1. Riscaldare la miscela sonde in un incubatore a 55 - 60°C per almeno 5-10 minuti per sciogliere completamente i componenti nella miscela.
  2. Sottoporre brevemente a ultrasuoni la miscela di sonde (~15 sec), quindi su vortex per circa 15 secondi in modo da portare completamente in sospensione le microsfele.
  3. Combinare 15 µl della miscela di sonde **appropriata** con 5 µl di prodotto PCR specifico per loco in ciascuno dei pozzetti nella piastra a 96 pozzetti (Costar® n. 6509). Quando si dispensa la miscela di sonde in più di 10 pozzetti, agitare delicatamente al vortex la miscela dopo ogni gruppo di dieci pozzetti. Sigillare la piastra con un nastro di polietilene (Costar® No. 6524).
  4. Posizionare il pannello in silicone in cima alla piastra prima dell'ibridazione.
  5. Ibridare i campioni in base alle seguenti condizioni di incubazione:

**Tabella 4. Condizioni di ibridazione**

97 °C per 2 minuti
47 °C per 10 minuti
56 °C per 8 minuti
56 °C in mantenimento

- **Accertarsi che il laser di rilevazione sullo strumento Luminex si acceso almeno 30 minuti prima della fine dell'ibridazione.**
6. Durante la fase di ibridazione, preparare una miscela 1:200 di miscela SA-PE/ soluzione di diluizione. Abbinare 170 µl di soluzione di diluizione (DS) a 0,85 µl di 1mg/mL PE-Streptavidina (SA-PE) per campione. *Per compensare eventuali perdite provocate dal pipettamento, si consiglia di preparare una miscela sufficiente di soluzione di diluizione per n+1 campioni. (Vedere la tabella 5)*
  7. *Conservare la PE-Streptavidina diluita al buio e a temperatura ambiente; la PE-Streptavidina è fotosensibile!* Prima dell'uso la soluzione di diluizione deve essere riscaldata a 45 °C per 5 minuti e agitata al vortex in modo da garantire che tutti i componenti siano in soluzione. Conservare la soluzione di diluizione a temperatura ambiente (18 - 30 °C). **Prepararla prima dell'utilizzo ed eliminare ogni parte residua.**

**Tabella 5. Volumi di diluizione della PE-Streptavidina**

N. di campioni	Soluzione di diluizione (DS)	PE-Streptavidina (SA-PE)
1	170 µl	0,85 µl
5	850 µl	4,25 µl
10	1700 µl	8,5 µl
20	3400 µl	17 µl
50	8500 µl	42,5 µl

**Nota: NON ANNULLARE IL PROGRAMMA DI IBRIDAZIONE PRIMA DI RIMUOVERE LA PIASTRA DALLO STRUMENTO!**

8. Alla temperatura di 56°C, lasciando la piastra nello strumento, diluire ciascun campione con 170 µl di PE- Streptavidina. **È molto importante diluire tutti i campioni entro 5 minuti (dopo la fase di ATTESA a 56°C della durata di 8 minuti).**
9. *Rimuovere* la piastra dei campioni dallo strumento e portarla nello strumento Luminex.

## D. Analisi del campione con lo strumento Luminex\*

Per ottenere risultati ottimali, testare immediatamente i campioni con lo strumento Luminex. I campioni possono essere esaminati fino a 30 minuti dopo la diluizione. Se non vengono esaminati immediatamente, tenerli al riparo dalla luce.

1. Accendere lo strumento Luminex da 30 minuti a 4 ore prima di leggere i campioni.
2. Prima di analizzare i campioni nello strumento Luminex, impostare il foglio di lavoro.
  - a) Selezionare **Create a New Batch** dal menu File.
    - Ad esempio, se si analizza per il Nullo Classe I, aggiungere il Batch per Nullo Classe I.
    - Il Batch Template viene fornito sul sito ed è identificabile con un nome, in questo caso, Nullo 1 xxxxxx (lotto N.).
    - Notare che le versioni di template si basano sul numero di lotto e corrispondono ai numeri di lotto del kit.
    - Seguire le istruzioni successive visualizzate su schermo per la creazione dei batch.
    - **Nell'assegnare un nome al batch non includere virgole, altrimenti durante l'esportazione dei dati verranno perse le informazioni riportate dopo la virgola.**
    - Per ulteriori informazioni sulla creazione di batch e multibatch, consultare il manuale del Luminex.
  - b) Fare clic sull'icona di espulsione per far fuoriuscire il supporto della piastra. Posizionare la piastra a 96 pozzetti sul supporto della piastra.
  - c) Fare clic sull'icona per far rientrare il supporto. I campioni sono ora pronti per essere analizzati. Prima di avviare il processo eseguire un prime.
  - d) Una volta letti i campioni, è necessario effettuare la disinfezione dello strumento con isopropanolo al 70% o candeggina comune al 20%, seguita da due risciacqui. A questo punto spegnere lo strumento se non verrà utilizzato per il resto della giornata.
3. Una volta completato un batch, i dati vengono esportati in un file CSV. I file vengono denominati 'OUTPUT.CSV' e salvati in una cartella con il nome del batch immesso nell'apparecchio Luminex IS. Questi dati vengono quindi utilizzati per l'assegnazione della tipizzazione, come descritto di seguito.

\*Per istruzioni sul funzionamento dello strumento, tra cui le procedure di avvio giornaliero, la calibratura, la manutenzione e le procedure di arresto, consultare il manuale del Luminex IS.

## RISULTATI

La tipizzazione dei campioni può essere eseguita nel modo seguente.

È possibile aprire i file CSV generati ed elaborare i dati con i comuni programmi per fogli di calcolo come Microsoft Excel, Lotus 123, Corel Quattro Pro o applicazioni simili. L'analisi si compone dei seguenti passaggi:

- 1) Verificare che il numero di eventi per ogni SSO di ciascun campione sia almeno 60. Questo dato è disponibile nella sezione **Data Type: Count** del file CSV.
- 2) Accertarsi che i valori delle sonde di consenso per ciascun campione superino i valori minimi dell'intensità di fluorescenza mediana o MFI. Le soglie minime sono definite in base al lotto e sono reperibili nella tabella delle soglie.

### Attenzione

- Per ottenere risultati affidabili, lo strumento Luminex deve poter raccogliere una quantità sufficiente di dati.
  - Raccogliere almeno 60 eventi per ciascun SSO.
- 3) Sottrarre il valore di riferimento di ciascuna sonda dai valori del campione che producono la serie di dati di riferimento corretta. I valori di riferimento sono reperibili nella tabella delle soglie e sono determinati per ogni lotto. I valori sono valori medi dell'MFI di ciascuna microsfera che consentono di compensare il disturbo di fondo provocato dalle variazioni delle microsfere.
  - 4) Per ciascun campione, dividere i dati di riferimento corretti di ciascuna sonda per il valore di fondo corretto della corrispondente sonda di consenso, ottenendo così la serie di dati normalizzata.

$$\frac{\text{MFI (sonda)} - \text{MFI (valore vuoto di controllo della sonda)}}{\text{MFI (consenso)} - \text{MFI (valore vuoto di controllo di consenso)}}$$

- 5) Annotare il valore normalizzato di ciascuna sonda sul foglio di lavoro della tabella delle soglie.
- 6) Una volta assegnati tutti i valori, lo schema dei risultati della sonda (vale a dire, la combinazione di tutte le assegnazioni positive e negative di un determinato campione) può essere confrontato con il grafico dei risultati delle sonde (LC1024) fornita sul sito web.

### Attenzione:

- Esiste una tabella di soglia distinta per ciascun locus.
- **Queste tabelle di soglia sono determinate in base al lotto; accertarsi che il numero di lotto riportato sulle tabelle di soglia corrisponda al numero di lotto riportato sul kit di tipizzazione.**
- Se un valore normalizzato per una particolare sonda supera la soglia massima di un'assegnazione negativa ed è al di sotto del valore minimo di un'assegnazione positiva, il campione dovrà essere considerato come indeterminato per tale sonda. È necessario tipizzare il campione, supponendo innanzi tutto che il valore sia negativo e poi che sia positivo.
- Per ulteriori informazioni sui valori di soglia, vedere la sezione **VALORI ATTESI**.

## CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Si consiglia di eseguire un controllo positivo e uno negativo per ogni analisi, rispettivamente del tipo campione d'acqua e campione precedentemente tipizzato. Le sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche (SSO) di consenso elencate nella tabella dei valori di soglia si ibridizzano con i rispettivi alleli loco specifici. I valori risultanti dai controlli positivi ottenuti con le sonde SSO di consenso devono superare il valore soglia delle SSO stesse, come specificato nel foglio di lavoro della tabella dei valori soglia.

Le miscele di sonde LIFE CODES contengono una o più SSO di consenso identificate nei fogli di lavoro dei kit di tipizzazione. Queste sonde di consenso si ibridizzano con tutti gli alleli e fungono da controlli interni per verificare l'amplificazione e confermare il verificarsi delle ibridizzazioni. Se non si ottiene il valore minimo per queste SSO, il campione può non produrre la tipizzazione corretta e il test va ripetuto.

Il saggio deve essere condotto come consigliato nell'insero della confezione ed eseguito rispettando tutte le altre procedure di controllo qualità conformi alle norme federali, statali e locali e/o a quelle degli enti di omologazione.

## LIMITI DELLA PROCEDURA

Le condizioni di PCR e del test descritte richiedono condizioni controllate in modo accurato. Eventuali scostamenti da questi parametri possono condurre a risultati errati.

Tutti gli strumenti devono essere calibrati in base alle raccomandazioni della casa produttrice e operare entro i parametri prescritti dalla stessa.

- 1) Le microsfere devono essere preriscaldare e portate correttamente in sospensione prima dell'utilizzo. Questa condizione garantisce che i componenti tampone dell'ibridazione siano in soluzione.
- 2) Le incubazioni a 47 °C e a 56 °C richiedono un alto livello di accuratezza (+/- 0,5 °C). È necessario l'impiego di un thermal cycler. È fondamentale controllare la temperatura all'interno dei pozzetti della piastra a 96 pozzetti del thermal cycler mediante termocoppia (ad es., BioRad, modello VPT-0300 o equivalente). La temperatura all'interno e tra le cavità non deve oscillare oltre +/- 0,5 °C.
- 3) L'incubazione a 56 °C è critica e non deve superare i 13 minuti totali, suddivisi in 8 minuti di incubazione e non più di 5 minuti per la diluizione di tutti i campioni con la PE-Streptavidina diluita.
- 4) **Una volta eseguita la diluizione, l'analisi del campione deve essere completata entro 1 ora (tenere al riparo dalla luce).**
- 5) Non miscelare i componenti di kit e lotti diversi.

Per la natura complessa della tipizzazione HLA, l'interpretazione dei dati e le assegnazioni della tipizzazione devono essere svolte da personale qualificato.

## RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

PROBLEMA	POSSIBILE CAUSA		SOLUZIONE
Conteggio basso delle microsferi	Miscela di sonde non correttamente risospesa		Preriscaldare, sottoporre prima a ultrasuoni e poi agitare con vortex la miscela e ripetere il test.
	Strumento non perfettamente funzionante	Fuori calibratura	Calibrare lo strumento. ( <i>Consultare il manuale del Luminex IS.</i> )
		Canale di aspirazione del campione bloccato	Rimuovere e sottoporre a ultrasuoni l'ago. Risciacquare mediante aspirazione ed espulsione. Se il problema persiste, rivolgersi alla Immucor GTI Diagnostics, Inc. +1 (855) 466-8267
Errore della soglia CON	Mancata amplificazione o scarsa amplificazione del campione*	Scarsa quantità di DNA	Verificare la concentrazione e la purezza del DNA.
		I sali della miscela master non sono in soluzione	Riscaldare la miscela master a 37 °C per 5 minuti, agitare delicatamente al vortex e centrifugare brevemente.
		Scarsa qualità di Taq Polimerasi	Utilizzare LIFECODES Taq Polimerasi convalidata N. di catalogo 628075.
	Condizioni di amplificazione al di fuori dei parametri specifici		Controllare che i parametri dei cicli del thermal cycler rientrino in quelli specificati.
	Valore minimo dell'intensità di fluorescenza mediana (MFI)		Riscaldare la soluzione di diluizione a 45 °C per 5 minuti prima dell'utilizzo e agitare al vortex. Conservare a temperatura ambiente. Sostituire la PE-Streptavidina.
Numerosi errori di SSO oppure nessun risultato di tipizzazione HLA	Amplificazione allele-specifica	Condizioni di amplificazione al di fuori dei parametri specifici	Controllare che i parametri dei cicli del thermal cycler rientrino in quelli specificati.
	Campione di DNA contaminato		Isolare di nuovo il DNA dal campione ematico.
	DNA parzialmente degradato		
	Evaporazione durante l'ibridazione		Se non si utilizza tutta la piastra, lasciare una fila vuota su ciascun lato dei campioni da testare per consentire la perfetta sigillatura della piastra.

\* È possibile verificare l'amplificazione PCR mediante elettroforesi su gel (vedere l'Appendice A).

## VALORI ATTESI

Ogni Loco ha una sonda CON e due sonde SSO. Se un campione contiene un loco sottoposto a test, la sonda di consenso e almeno una delle sonde SSO per quel loco devono essere positive. I valori sonda solitamente possono essere risolti come positivi e negativi. In alcune rare circostanze, un valore può rientrare tra i valori limite positivi e negativi e perciò essere considerato come indeterminato. Se un campione contiene valori indeterminati per una particolare sonda SSO, il campione deve essere tipizzato con la sonda come negativo e quindi nuovamente con la sonda come positivo. Se le due sonde SSO per un loco sono indeterminate, il campione non può essere tipizzato e deve essere riesaminato.

- Come è stato sottolineato nella sezione **Limiti della procedura**, è fondamentale seguire scrupolosamente il protocollo. Qualsiasi scostamento può condurre a un errore di tipizzazione del campione.

## CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL KIT

Quando i kit di tipizzazione Allele Nullo HLA SSO LIFECODES vengono utilizzati secondo la procedura descritta nella metodica, la Classe I e la Classe II tipo HLA di campioni di DNA possono essere determinate. Il test dell'Allele Nullo Classe I HLA (Nullo 1) mostra il 100% di concordanza (essendo pari al 97,4% il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95%) per il loco A, il 100% di concordanza (essendo pari al 97,4% il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95%) per il loco B e il 100% di concordanza (essendo pari al 97,4% il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95%) per il loco C nei 139 campioni valutati rispetto ai risultati ottenuti con la sequenziazione bidirezionale. Il test di HLA-Allele Nullo Classe II (Nullo 2) mostra il 97,1% di concordanza (essendo pari al 92,7% il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95%) per il loco DRB 4 e il 98,5% di concordanza (essendo pari al 94,8% il limite inferiore dell'intervallo di confidenza del 95%) per il loco DRB 5 in 137 campioni valutati rispetto ai risultati ottenuti con la sequenziazione bidirezionale.

## RIFERIMENTI

1. Olerup, O., et al. (1992) Tissue Antigens 39:225
2. Saiki, RK., et al. (1986) Nature 324: 163
3. Maeda, M., et al. (1989) Tissue Antigens 34: 290
4. Bugawan, TL., et al. (1990) Immunogenetics 32: 231

## LICENZE LIMITATE

Taq Polimerasi è prodotto per Immucor GTI Diagnostics da Promega Corp. È concesso in licenza a Promega in virtù del brevetto statunitense N. 5.338.671 e 5.587.287 e brevetti stranieri corrispondenti. L'acquisto di questo prodotto dà diritto a una licenza limitata e non trasferibile secondo quanto definito dal brevetto 5.981.180, depositato presso l'ufficio brevetti statunitense, o dalle rispettive controparti estere, di proprietà della Luminex Corporation, per l'esecuzione di analisi multiplex di campioni clinici per la tipizzazione HLA.

**Rappresentante autorizzato:** Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Robert-Bosch-Strasse 32, 63303 Dreieich, Germany

**Assistenza tecnica per l'Europa:** Tel.: +32/3 385 47.91

**Ultima revisione e pubblicazione di questo documento:** 2019-05-30

## MARCHI REGISTRATI

AB Gene® AB Gene House  
Costar® Corning Incorporated  
Microseal™ Bio-Rad Laboratories, Inc.  
IDNA™ Agarose Lonza Group, Ltd.  
GelStar™ Lonza Group, Ltd.

Luminex® Luminex Corporation  
Gene Amp® Roche Molecular System  
Veriti™ Applied Biosystem  
LIFECODES® Immucor Inc

## APPENDICE A

### Elettroforesi su gel

Le reazioni di PCR eseguite con i kit di tipizzazione HLA-SSO LIFECODES sono progettate per ottenere prodotti a doppio e a singolo filamento, vale a dire i prodotti predominanti per l'ibridazione SSO. A garanzia della qualità dell'esperimento o per risolvere gli eventuali problemi, può essere necessario eseguire l'elettroforesi su gel per rilevare la presenza di DNA amplificato nella reazione PCR.

### Materiali richiesti (come da elenco o equivalenti)

- Agarosio per elettroforesi (agarosio Lonza Group Ltd. IDNA® n. 50170)
- Apparecchio/alimentatore per elettroforesi
- Tampone in gel 1X (40xTAE, Promega n. V4281)
- Colorante in gel dell'acido nucleico GelStar® (Lonza Group Ltd. n. 50535)
- Transilluminatore UV (ChromatoVUE, UVP Inc. modello TM36)
- Sistema di scansione per immagini fotografiche

La migrazione relativa del prodotto a singolo filamento dipende dalla concentrazione di gel e dal sistema tampone adottato. Le migrazioni approssimative per ciascuna amplificazione sono elencate di seguito per i campioni esaminati con gel di agarosio al 2% in tampone TAE 1X.

### Condizioni per l'elettroforesi

1. Prelevare il colorante dell'acido nucleico GelStar® (Lonza Group Ltd. n. 50535) dal congelatore e scongelarlo. Tenerlo al riparo dalla luce.
2. Il gel utilizzato per questa procedura deve essere al 2%, vale a dire che per uno strato di gel di 200 ml vanno usati 4 grammi di agarosio in 200 ml di TAE 1X (diluire dal TAE 40X). Aggiungere 10 µl di colorante dell'acido nucleico GelStar® all'agarosio sciolto. Quando si versa il gel, accertarsi di lasciare spazio sufficiente per consentire al DNA di migrare in modo significativo (da 2,5 a 5 cm circa). **PRESTARE ATTENZIONE: GelStar® è un potenziale carcinogeno.**

NOTA: è possibile spandere i gel con 20 µl di bromuro di etidio da 10 mg/ml in sostituzione del colorante dell'acido nucleico GelStar®. L'intensità della banda risulterà inferiore nei gel contenenti bromuro di etidio rispetto ai gel contenenti GelStar®. **PRESTARE ATTENZIONE: il bromuro di etidio è un noto carcinogeno.**



3. Tenere il gel al riparo dalla luce e permetterne la solidificazione.
4. Caricare una miscela di 2,5 µL di ogni prodotto PCR e 2,5 µL di tampone 2 X con colorante visibile per campione, per ogni amplificazione di carico. Far espandere il gel al riparo dalla luce a circa 160 volt per 45 minuti o fino a quando il campione si espande in modo sufficiente da produrre bande distinte (la banda del blu di bromofenolo o un altro marker visibile si sposta di 2,5/5 cm circa dai pozzetti).
5. Fotografare con il transilluminatore UV munito di filtro fotografico giallo GelStar® (Lonza Group Ltd. n. 50536).

**ATTENZIONE: indossare abbigliamento protettivo quando si manipola il colorante dell'acido nucleico GelStar® o il bromuro di etidio e quando si fotografa il gel con il transilluminatore UV.**

6. Analizzare il gel

	<b>Nulla Classe 1</b>	<b>Nulla Classe 2</b>
<b>Doppio filamento (bp)</b>	~210, ~280	~180, ~280
<b>Singolo filamento (bp)</b>	~150,~180	~140,~180

### Interpretazione del gel

	Amplificazione	Nessuna amplificazione
Pozzetto		
DNA a doppio filamento	----- (luminoso)	
DNA a singolo filamento	----- (meno luminoso)	
Banda del primer	