



Οδηγίες χρήσης για τα διαγνωστικά σύνολα τυποποίησης Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits Έκδοση 4. Ιούνιος 2011.

1. Σκοπός χρήσης

Τα διαγνωστικά σύνολα Biofortuna HLA SSPGo Kits είναι σύνολα ποιοτικού προσδιορισμού με βάση το DNA για τον καθορισμό των αλληλόμορφων HLA είτε σε διαγνωστικά σύνολα "υψηλής ανάλυσης" είτε σε διαγνωστικά σύνολα "μέσου επιπέδου" ανάλυσης ενίσχυσης ειδικής ομάδας αλληλόμορφων. Ο συνήθης ορισμός της ανάλυσης μεσαίου επιπέδου είναι όταν η πλειονότητα των αποτελεσμάτων ορίζεται σαφώς σε επίπεδο δύο ψηφίων, π.χ. DQB1*02, DQB1*05, κ.λπ. Η υψηλή ανάλυση ορίζεται γενικά ως η πλειονότητα των αλληλόμορφων σε επίπεδο τεσσάρων ψηφίων, όπως DQB1*02:01, DQB1*05:01, κ.λπ. Αυτό είναι ένα διαγνωστικό προϊόν *in vitro* που προορίζεται για χρήση μόνο από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό.

2. Εισαγωγή

Τα μόρια HLA παίζουν ζωτικό ρόλο στην ανοσία και την αναγνώριση του ομόλογου έναντι του αλλογενούς (self versus non-self), με συνέπεια η τυποποίηση του γονότυπου HLA και το ταίριασμα HLA να είναι υποχρεωτικό πριν από τις περισσότερες μορφές μεταμόσχευσης. Καθώς τα αντιγόνα HLA περιορίζουν την ειδικότητα των ανοσολογικών αποκρίσεων μέσω των T-κυττάρων, η τυποποίηση γονότυπου HLA είναι ένα χρήσιμο ερευνητικό εργαλείο για κάθε ανοσολογική διαταραχή ή οποιαδήποτε ανοσολογική απόκριση σε παθογόνα, εμβόλια ή φαρμακευτική θεραπεία. Η τυποποίηση του γονότυπου HLA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση νόσων στις οποίες έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα αλληλόμορφα HLA συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τις νόσους αυτές.

Τα περισσότερα γονίδια HLA είναι σε μεγάλο βαθμό πολυμορφικά και σε γενικές γραμμές η τυποποίηση του γονότυπου DNA είναι απαραίτητη για τον ακριβή προσδιορισμό των αντιγόνων HLA. Η τυποποίηση γονότυπου PCR με χρήση εκκινητών συγκεκριμένης ακολουθίας (SSP)¹, είναι μια ταχεία μέθοδος τυποποίησης του γονότυπου HLA, ειδικότερα κατάλληλη για καταστάσεις όπου απαιτείται ανάλυση μέσου επιπέδου. Τα διαγνωστικά σύνολα Biofortuna SSP διαθέτουν όλα τα αντιδραστήρια λυοφιλοποιημένα, συμπεριλαμβανομένης της πολυμεράσης, ώστε ο χειριστής να προσθέτει μόνο το DNA πριν την PCR.

Καταβάλλεται κάθε προσπάθεια τα διαγνωστικά σύνολα να είναι σύμφωνα με τις νεότερες εξελίξεις ευθυγράμμισης HLA με τη διεθνή βάση δεδομένων IMGT. Οι ανανεώσεις των συνόλων είναι διαθέσιμες από τον ιστότοπο www.biofortuna.com.

3. Περιγραφή εξέτασης

Οι PCR SSP βασίζονται στην αρχή ότι μόνο οι εκκινητές με πλήρη συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο στην ακολουθία στόχο θα ενισχύονται. Οι εκκινητές χωρίς πλήρη συμπληρωματικότητα δεν δίνουν προϊόντα ενίσχυσης.² Ένα ζεύγος εσωτερικών εκκινητών προτύπων ελέγχου που ενισχύει μια συντηρημένη περιοχή του συστατικού γονιδίου

(housekeeping gene), συμπεριλαμβάνεται σε κάθε μίγμα αντίδρασης PCR. Το ζεύγος εκκινητών εσωτερικού ελέγχου είναι ένας δείκτης της ακεραιότητας της αντίδρασης PCR. Η τυποποίηση γονότυπου SSP γενικά χρησιμοποιεί πολλές αντιδράσεις από την κοινή ανάλυση των οποίων προκύπτει ο γονότυπος. Η οπτική απεικόνιση των ενισχυμένων προϊόντων μπορεί να επιτευχθεί μέσω συστημάτων ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης, τα οποία διαχωρίζουν τα θραύσματα DNA με βάση το μέγεθος.

4. Περιεχόμενα συνόλου

- 10-40x Δίσκοι PCR πολυπροπυλενίου ή ταινίες που αποτελούνται από 1 έως 96 υποδοχείς PCR (ανάλογα με το διαγνωστικό σύνολο) και κάθε υποδοχέας περιέχει 10μl ήδη εισηγμένων λυοφιλοποιημένων εκκινητών, πολυμεράσης, dNTPs* και ρυθμιστικού διαλύματος. Κάθε εξέταση ή σύνολο ταινιών διατίθεται σε μεμονωμένη συσκευασία αλουμινίου.
- 1x Οδηγίες χρήσης.
- Οι πίνακες ερμηνείας, τα δελτία δεδομένων ασφαλείας (MSDS) και το πιστοποιητικό ανάλυσης είναι διαθέσιμοι από τον ιστότοπο της Biofortuna www.biofortuna.com. Αν δεν μπορείτε να τα κατεβάσετε από τον ιστότοπο, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της χώρας σας.

*Η άδεια χρήσης των CleanAmp™ dNTPs εκχωρείται από την Trilink Biotechnologies Inc για χρήση με τα προϊόντα Biofortuna SSPGo.

5. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που δεν παρέχεται

- Κατάλληλοι αναρροφητήρες και αποστειρωμένα ρύγχη π.χ. αναρροφητήρες P10 με φίλτρο 10μl.
- Διαγνωστικό σύνολο/ εξοπλισμός απομόνωσης DNA.
- Φασματοφωτόμετρο UV.
- Σωληνάρια πολυπροπυλενίου.
- Αποστειρωμένο νερό εφαρμογών μοριακής βιολογίας
- Φύλλα σφράγισης PCR ή καπάκια. (Τα καπάκια σε σειρά παρέχονται για σύνολα με σωληνάρια σε σειρά)
- Θερμικός κυκλοποιητής 96 βοθρίων με θερμαινόμενο καπάκι. Οι πλάκες PCR και τα σωληνάρια που χρησιμοποιούνται στα διαγνωστικά σύνολα της Biofortuna έχουν εξεταστεί και εγκριθεί για χρήση με την πλειονότητα των διαθέσιμων θερμικών κυκλοποιητών που κυκλοφορούν στην αγορά, συμπεριλαμβανομένων των MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS και Techne TC-512. Διαφορετικά μοντέλα είναι πιθανό να απαιτούν περαιτέρω επικύρωση από το χειριστή.
- Τα αντιδραστήρια ηλεκτροφόρησης γέλης (αγαρόζης, 0,5x TBE, 1000bp DNA δείκτη μοριακού βάρους, 10mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου).
- Εξοπλισμός ηλεκτροφόρησης γέλης (δεξαμενές γέλης, τροφοδοτικό ρεύματος, σύστημα τεκμηρίωσης γέλης με συσκευή εκπομπής υπεριώδους φωτός (UV transilluminator).

6. Ασφάλεια και Προειδοποιήσεις

- Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
- Οι εξετάσεις πρέπει να εκτελούνται μόνο από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό.
- Όλα τα αποτελέσματα τυποποίησης πρέπει να επαληθεύονται από το κατάλληλο προσωπικό και εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για λήψη κλινικής απόφασης, τα αποτελέσματα αυτά πρέπει να ελέγχονται με άλλη μέθοδο τυποποίησης.
- Ο χειρισμός όλων των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις αρχές της ορθής εργαστηριακής πρακτικής.
- Οι περιοχές πριν και μετά την PCR πρέπει να είναι σαφώς διαχωρισμένες. Μην μεταφέρετε υλικά μετά την PCR πίσω στην περιοχή πριν την PCR.
- **Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου:** Όλα τα προϊόντα αίματος πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά και πρέπει να τυγχάνουν της ανάλογης μεταχείρισης.
- **Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου:** Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι δυνητικά καρκινογόνο. Σε περίπτωση χρήσης του, να φοράτε πάντοτε γάντια, ποδιά εργαστηρίου και προστατευτικά γυαλιά.

- **Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου:** Να προσέχετε όταν χρησιμοποιείτε πηγές UV - να φοράτε πάντοτε γάντια, ποδιά εργαστηρίου και προστατευτικά γυαλιά. Ποτέ μην κοιτάζετε απευθείας στην πηγή υπεριώδους φωτός (UV).
- Φύλλα δεδομένων ασφαλείας (MSDS) διατίθενται στην ιστοσελίδα www.biofortuna.com.

7. Αποθήκευση και σταθερότητα

Τα διαγνωστικά σύνολα Biofortuna SSPGo πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4-30°C. Μετά το άνοιγμα της αλουμινένιας συσκευασίας και την αφαίρεση των σωληναρίων PCR, τα αντιδραστήρια πρέπει να υδατώνονται με DNA εντός 3 ωρών. Ανατρέξτε στη συσκευασία για την ημερομηνία λήξης. Μην χρησιμοποιείτε τα προϊόντα μετά την εκτυπωμένη ημερομηνία.

Μην χρησιμοποιείτε τα διαγνωστικά σύνολα αν η συσκευασία αλουμινίου είναι σχισμένη ή τρυπημένη.

Βεβαιωθείτε ότι τα σωληνάρια PCR είναι καλά κλεισμένα μετά την προσθήκη του DNA, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εξάτμιση κατά την ενίσχυση PCR. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται σε άκρα και γωνίες.

8. Οδηγίες χρήσης

Απαιτήσεις δείγματος DNA

Κάθε αντίδραση στην εξέταση είναι βελτιστοποιημένη για να χρησιμοποιεί 50 - 100ng DNA, παραμένει όμως ζωτικής σημασίας κάθε αντίδραση να υδατώνεται με 10μl υγρού ακριβώς. Για το λόγο αυτό, η εξέταση μπορεί να πραγματοποιηθεί με 10μl DNA στα 5-10ng/μl ή να προστεθεί πρώτα ένας όγκος νερού για να είναι δυνατή η προσθήκη DNA σε υψηλότερη συγκέντρωση, π.χ. με προσθήκη 9μl νερού και στη συνέχεια 1μl DNA στα 50-100ng/μl. Καθώς η ηπαρίνη μπορεί να αναστέλλει την PCR, συνιστάται το DNA να μην εξάγεται από ηπαρινισμένα δείγματα αίματος. Το OD_{260/280} του δείγματος DNA πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,6 και 2 όπως μετράται με φασματοφωτομετρία UV.

Οδηγίες πριν την PCR

- Βγάλτε ένα δίσκο ή μια ταινία SSPGo από το σφραγισμένο σακουλάκι.
- Σημειώστε τον αριθμό παρτίδας, τον κωδικό προϊόντος και την έκδοση της εξέτασης.
- Πρέπει να λαμβάνετε υπόψη ότι η πρώτη αντίδραση από κάθε τόπο εξέτασης είναι πάντα κόκκινη σε χρώμα έναντι του υπολοίπου συνόλου.
- Ορισμένοι δίσκοι PCR περιέχουν μια πλήρη αντίδραση χρώματος μωβ "No Template Control" στο τελευταίο βοθρίο του δίσκου.
- Με τον αποστειρωμένο εξοπλισμό αναρροφήστε 10μl διαλύματος DNA σε κάθε υποδοχέα του δίσκου ή της ταινίας. Δείτε τη σημείωση στο Κεφάλαιο 8 Απαιτήσεις δείγματος DNA. Αν ο δίσκος περιέχει υποδοχέα αντίδρασης χρώματος μωβ "No Template Control", τότε προσθέστε με τον αναρροφητήρα 10μl αραιωτικού διαλύματος δείγματος (χωρίς DNA) σε αυτόν. Δείτε τη σημείωση στο Κεφάλαιο 8 για το "No Template Control".
- Βεβαιωθείτε ότι το DNA έρχεται σε επαφή με λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια σε κάθε υποδοχέα πριν το θερμικό κύκλο. Μπορείτε να πραγματοποιήσετε ένα βήμα σύντομης φυγοκέντρησης για να εξασφαλίσετε ότι το διάλυμα DNA έρχεται σε επαφή με τα λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια.
- Κλείστε καλά τους υποδοχείς με ένα φύλλο σφράγισης ή με καπάκια σωληναρίων PCR. Βεβαιωθείτε ότι έχουν κλείσει πολύ καλά ώστε να αποφύγετε πιθανή εξάτμιση. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται σε άκρα και γωνίες.
- Τοποθετήστε το δίσκο ή τις ταινίες απευθείας μέσα στον θερμικό κυκλοποιητή. Βεβαιωθείτε ότι οι υποδοχείς έχουν τοποθετηθεί σωστά στη θερμική βάση και ότι το καπάκι είναι εντελώς κλειστό. Σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να αποτύχει η PCR. Σε ορισμένα μοντέλα PCR ίσως είναι απαραίτητη η χρήση επιθεμάτων ή πλακέτας πίεσης για να επιτευχθεί η κατάλληλη συμπίεση του προϊόντος στην πλακέτα.
- Εκτελέστε το πρόγραμμα PCR (ανατρέξτε στις παραμέτρους PCR).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΓΙΑ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΕΝΑΙΩΡΗΣΗΣ: Βεβαιωθείτε ότι τα μίγματα PCR επαναιωρούνται με το δείγμα DNA εντός 3 ωρών από την απομάκρυνση του δίσκου από τη συσκευασία αλουμινίου.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ NO TEMPLATE CONTROL: Μερικά διαγνωστικά σύνολα συμπεριλαμβάνουν ένα no template control (NTC) ως τελική αντίδραση στην πλάκα. Αυτός ο υποδοχέας περιέχει μια βαφή χρώματος μωβ για να ξεχωρίζει από τις άλλες αντιδράσεις και η παρουσία της σε ένα σύνολο σημειώνεται στους συνοδευτικούς πίνακες ερμηνείας. Το NTC έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει μόλυνση PCR ή γενωμική μόλυνση DNA από τα διαγνωστικά σύνολα Biofortuna SSPGo που μπορεί να υπάρχουν στο νερό που χρησιμοποιήθηκε στην επαναιώρηση του DNA. Αν υπάρχει μόλυνση PCR θα παρατηρηθούν αμπλικόνια ποικίλου μεγέθους, αν η μόλυνση είναι γενωμικό DNA θα παρατηρηθεί ένα αμπλικόνιο 187bp.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΠΡΟΦΙΛ ΥΨΟΥΣ ΠΛΑΚΑΣ/ΤΑΙΝΙΑΣ PCR : Συνιστάται το προφίλ ύψους των πλακών και ταινιών να είναι ισοδύναμα όταν τοποθετούνται στην ίδια συσκευή PCR. Τα διαφορετικά προφίλ ύψους μπορούν να προκαλέσουν ανεπαρκή επαφή με το θερμαινόμενο καπάκι των συσκευών PCR. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή ή ανεπιτυχή ενίσχυση PCR.

Παράμετροι PCR

Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι παρακάτω παράμετροι PCR. Βεβαιωθείτε ότι ο κυκλοποιητής αυξάνει τη θερμοκρασία κατά τουλάχιστον 1°C ανά δευτερόλεπτο και εξασφαλίζει σωστή λειτουργία για το θερμαινόμενο καπάκι. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή του θερμικού κυκλοποιητή για πλήρεις οδηγίες χρήσης. Οι θερμικοί κυκλοποιητές πρέπει να βαθμονομούνται σύμφωνα με τους κανόνες διαπίστευσης της Αμερικανικής Εταιρείας Ιστοσυμβατότητας και Ανοσογενετικής (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics, ASHI) ή της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Ανοσογενετικής (European Federation of Immunogenetics, EFI).

Αποδιάταξη	94°C	5 λεπτά		
Αποδιάταξη	96°C	15 δευτερόλεπτα	←	10 κύκλοι
Αναδιάταξη	66°C	50 δευτερόλεπτα		
Επιμήκυνση	72°C	30 δευτερόλεπτα		
Αποδιάταξη	96°C	15 δευτερόλεπτα	←	20 κύκλοι
Αναδιάταξη	64°C	50 δευτερόλεπτα		
Επιμήκυνση	72°C	30 δευτερόλεπτα		
HOLD (Αναμονή)	15°C			

Ηλεκτροφόρηση γέλης

Οι οδηγίες αφορούν την οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης: Παρασκευάστε γέλη αгарόζης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Όταν η γέλη φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 60°C προσθέστε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Τοποθετήστε τη γέλη στη δεξαμενή και εισάγετε τα χτένια τύπου μικροτιτλοδότησης (π.χ. 12x8 βοθρία με διάκενο 9mm). Μόλις σταθεροποιηθεί, αφαιρέστε τα χτένια και καλύψτε τη γέλη με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Μεταφέρετε τουλάχιστον 5μl και όχι παραπάνω από 10μl αντιδραστήριου από κάθε δίσκο ή ταινία στο αντίστοιχο βοθρίο στη γέλη, σημειώνοντας τη θέση κάθε αντιδραστήριου. Μια κλίμακα 100bp μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βοηθητικό για τον καθορισμό του μεγέθους. Μετρήστε τη γέλη για 20 λεπτά στα 10V/cm.

Ανατρέξτε στις οδηγίες του κατασκευαστή του συστήματος ηλεκτροφόρησης για λεπτομέρειες σχετικά με συγκεκριμένο εξοπλισμό. Οι γέλες πρέπει να απεικονίζονται οπτικά με ένα σύστημα τεκμηρίωσης γέλης UV με τη συσκευή εκπομπής υπεριώδους φωτός (UV transilluminator).

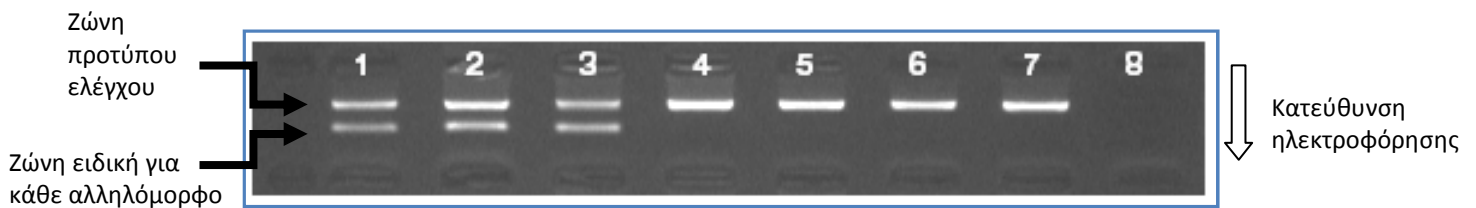
9. Ερμηνεία

Τα διαγνωστικά σύνολα SSPGo είναι σχεδιασμένα ώστε τα αποτελέσματα να ορίζονται με μη αυτόματο τρόπο με πίνακες ερμηνείας που θα βρείτε στην ηλεκτρονική διεύθυνση www.biofortuna.com. Αν αντιμετωπίσετε προβλήματα με την πρόσβασή σας στον ιστότοπο, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο.

Εφαρμόστε τη φωτογραφία γέλης στον αντίστοιχο τύπο ερμηνείας ταιριάζοντας το σύνολο και τους αριθμούς έκδοσης. Εξετάστε την απεικόνιση γέλης. Κάθε αντίδραση πρέπει να περιέχει μια ζώνη θετικού προτύπου ελέγχου. Ανατρέξτε στους πίνακες ερμηνείας καθώς μπορεί να είναι διαφορετικού μεγέθους σε διαφορετικά προϊόντα SSPGo. Οι ζώνες εσωτερικών προτύπων ελέγχου μπορεί να εμφανίζονται πιο ασθενείς όταν υπάρχουν ζώνες ειδικές για κάθε αλληλόμορφο. Αν υπάρχει μια ζώνη ειδική για κάθε αλληλόμορφο αλλά δεν υπάρχει ζώνη προτύπου ελέγχου, πρέπει αυτό να θεωρείται θετικό αποτέλεσμα. Αγνοήστε ζώνες με λιγότερα από 70bp καθώς πρόκειται για μη ενσωματωμένους εκκινητές.

Προσδιορίστε τις θετικές αντιδράσεις. Οι θετικές αντιδράσεις υποδεικνύονται από ζώνες του αναμενόμενου μεγέθους, όπως ορίζεται στους πίνακες ερμηνείας. Να λάβετε υπόψη ότι μπορεί να υπάρχουν περισσότερα από ένα μεγέθη προϊόντων σε μια δεδομένη αντίδραση - αυτές είναι αντιδράσεις πολλαπλών στόχων και σημειώνονται στους πίνακες ερμηνείας.

Συγκρίνετε τις θετικές αντιδράσεις με τους πίνακες ερμηνείας. Το θετικό αποτέλεσμα σε μια αντίδραση δείχνει την παρουσία τουλάχιστον ενός από τα αλληλόμορφα που αναγράφονται έναντι αυτού στον πίνακα ερμηνείας. Το οποιοδήποτε δεδομένο αλληλόμορφο μπορεί να ενισχυθεί σε πολλά σωληνάκια - εάν υπάρχει αλληλόμορφο πρέπει να υπάρχει θετική αντίδραση σε όλες τις σχετικές αντιδράσεις.



Σχήμα 1 Παραδείγματα θετικών αντιδράσεων, που υποδεικνύονται από την παρουσία ζωνών ειδικά για κάθε αλληλόμορφο και ζωνών προτύπου ελέγχου (αντιδράσεις 1-3), αρνητικές αντιδράσεις, που υποδεικνύονται από την παρουσία ζωνών προτύπων ελέγχου αλλά την απουσία ζωνών ειδικά για κάθε αλληλόμορφο (αντιδράσεις 4-7) και μια αποτυχημένη αντίδραση που υποδεικνύεται από την απουσία οποιασδήποτε ζώνης (αντίδραση 8).

Βεβαιωθείτε ότι η έκδοση του διαγνωστικού συνόλου ταιριάζει σωστά με την έκδοση του πίνακα ερμηνείας.









10. Διασφάλιση και Έλεγχος ποιότητας

Κάθε παρτίδα προϊόντων SSPGo υπόκειται σε έλεγχο ποιότητας πριν οποιοδήποτε προϊόν φύγει από την Biofortuna. Γίνεται δειγματοληπτικός έλεγχος σε κάθε παρτίδα διαγνωστικών συνόλων έναντι συγκεκριμένης ομάδας δειγμάτων ανθρώπινου DNA για να διασφαλίζεται η σωστή τους απόδοση. Κάθε αντιδραστήριο έχει ελεγχθεί έναντι τουλάχιστον 48 καλά χαρακτηρισμένα δείγματα DNA κυτταρικών σειρών. Η Biofortuna συνιστά κάθε εργαστήριο να πραγματοποιεί τους δικούς του εσωτερικούς ελέγχους σε όλα τα νέα προϊόντα τυποποίησης πριν τη χρήση τους σε κλινικά δείγματα. Μόνο πλήρως εκπαιδευμένο και κατάλληλο προσωπικό πρέπει να εκτελεί διαγνωστική τυποποίηση και τα αποτελέσματα πρέπει να διασταυρώνονται από άλλο εξίσου καλά εκπαιδευμένο άτομο του προσωπικού του εργαστηρίου.

11. Παραπομπές

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

12. Επεξήγηση πίνακα συμβόλων

	Αριθμός εξετάσεων
	Αντιπρόσωπος στην ΕΚ
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Τόπος παρασκευής
	<i>In vitro</i> διαγνωστική εξέταση
	Ημερομηνία λήξης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Αριθμός παρτίδας

13. Στοιχεία επικοινωνίας με τον κατασκευαστή

Biofortuna Ltd
 1 Hawkshead Road
 Croft Business Park
 Bromborough, CH62 3RJ, UK
 T: +44 (0) 151 334 0182
 E: info@biofortuna.com
 W: www.biofortuna.com



14. Μεταφράσεις

Française:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Ελληνικά:	Διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россия:	Переводы доступны
Slovenskému:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

15. Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων SSPGo

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Τρόπος αντιμετώπισης
Καμία ενίσχυση σε οποιαδήποτε αντίδραση	Λανθασμένη συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιείται	Μετρήστε την ποσότητα DNA και βεβαιωθείτε ότι προστίθενται συνολικά 50 - 100ng DNA σε όγκο 10μl, ανά υποδοχέα.
	Αναστολείς PCR παρόντες στο δείγμα DNA	Αποφύγετε το ηπαρινισμένο αίμα ή αν δεν μπορείτε να το αποφύγετε, εξάγετε DNA από πλυμένα άθικτα λεμφοκύτταρα ώστε η ηπαρίνη να μην έρχεται σε επαφή με το DNA. Έχουν περιγραφεί τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν ηπαρινάση για την απομάκρυνση της ηπαρίνης από δείγματα. Επανεξαγωγή DNA. Βλέπε οδηγίες του κατασκευαστή για χρήση του συνόλου εξαγωγής DNA.
	Χρησιμοποιήθηκε DNA κακής ποιότητας	Μετρήστε την ποιότητα του DNA. Η αναλογία A260/A280 πρέπει να είναι 1,6 – 2,0 με βάση φασματοφωτομετρία στο υπεριώδες (UV). Βεβαιωθείτε ότι το DNA έχει πλήρως επαναιωρηθεί και το μίγμα έχει ομογενοποιηθεί πριν τη χρήση.
	Τα αντιδραστήρια δεν έχουν επαναιωρηθεί πλήρως	Βεβαιωθείτε ότι τα ιζήματα είναι πλήρως επανυδατωμένα κατά την προσθήκη του DNA. Αν είναι απαραίτητο, φυγοκεντρήστε για μικρό χρονικό διάστημα την πλάκα. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται διάλυμα DNA 10μl ανά υποδοχέα.
	Ο θερμικός κυκλοποιητής δεν είναι σωστά ρυθμισμένος	Βεβαιωθείτε ότι το πρόγραμμα PCR έχει εισαχθεί σωστά, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης. Βεβαιωθείτε ότι το θερμαινόμενο καπάκι του θερμικού κυκλοποιητή είναι στη θέση του και επαρκώς σφιγμένο. Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του θερμικού κυκλοποιητή για περισσότερες λεπτομέρειες.
	Προβλήματα ηλεκτροφόρησης	Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει ρεύμα στη δεξαμενή ηλεκτροδότησης - ελέγξτε την τροφοδοσία ρεύματος και καθαρίστε τα ηλεκτρόδια. Μετρήστε τη γέλη σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται 0,5μg/ml φρέσκου βρωμιούχου αιθιδίου. Ελέγξτε ότι υπάρχει επαρκής φωτισμός UV κατά την απεικόνιση της γέλης. Ανατρέξτε στις οδηγίες του κατασκευαστή της δεξαμενής γέλης και της τροφοδοσίας ρεύματος για περισσότερες λεπτομέρειες.

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Τρόπος αντιμετώπισης
	Οι πλάκες δεν έχουν σφραγιστεί σωστά	<p>Οι ανεπαρκώς σφραγισμένες πλάκες μπορεί να οδηγήσουν σε εξάτμιση κατά τη διάρκεια της PCR. Η Biofortuna παρέχει εγγυημένα φύλλα σφράγισης (κωδ. προϊόντος BF-40-11).</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει επαρκής σφράγιση σε όλα τα βοθρία. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στα βοθρία που είναι κοντά στα άκρα του δίσκου ή της ταινίας PCR.</p>
Τυχαία διασπορά προτύπων ελέγχου ή/και αμπλικόνων συγκεκριμένων αλληλόμορφων.	Σφάλματα γέλης	<p>Βεβαιωθείτε ότι έχουν φορτωθεί στη γέλη με τη σωστή σειρά όλα τα βοθρία και ο ίδιος όγκος αντιδράσεων PCR προστέθηκε σε καθένα από αυτά.</p> <p>Βαθμονομήστε τους αναροφητήρες όπως περιγράφεται στις οδηγίες του κατασκευαστή.</p> <p>Ελέγξτε ότι όλα τα βοθρία έχουν σχηματιστεί σωστά στη γέλη. Να είστε προσεκτικοί κατά την αφαίρεση των χενών καθώς είναι πιθανό να προκληθούν σχισμές στο κάτω μέρος των βοθρίων.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι η αгарόζη διαλύεται πλήρως πριν την προσθήκη της γέλης.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι η γέλη δεν εκτείνεται σε μεγάλο χώρο, καθώς τα μικρότερα αμπλικόνια μπορεί να φύγουν από τα άκρα.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι η γέλη έχει επεκταθεί επαρκώς ώστε να μπορούν οι ζώνες να χωριστούν.</p> <p>Χρησιμοποιήστε διάλυμα φρέσκου βρωμιούχου αιθιδίου.</p>
	Προβλήματα με το θερμικό κυκλοποιητή	<p>Αποτυχίες, ειδικά στα άκρα του δίσκου ή των ταινιών αντίδρασης μπορεί να οφείλονται σε ανεπαρκή πίεση για κλείσιμο του καπακιού. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εξάτμιση και συμπύκνωση της αντίδρασης PCR περίπου στο μέσο του δοχείου PCR και μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία της PCR.</p> <p>Φροντίστε να ακολουθείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή για τη συντήρηση και τη βαθμονόμηση του θερμικού κυκλοποιητή.</p> <p>Ελέγξτε ότι οι παράμετροι της PCR είναι σωστοί, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης.</p>
	Προβλήματα εξάτμισης	<p>Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει επαρκής σφράγιση σε όλα τα βοθρία. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στα βοθρία που είναι κοντά στις άκρες του δίσκου ή της ταινίας PCR.</p>

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Τρόπος αντιμετώπισης
		Βεβαιωθείτε ότι έχει ενεργοποιηθεί το θερμαινόμενο καπάκι και ότι ασκείται επαρκής πίεση μέσω αυτού. Η Biofortuna παρέχει εγγυημένα φύλλα σφράγισης (κωδ. προϊόντος BF-40-11).
	Σποραδικές αποτυχίες λόγω προβλημάτων του DNA	<p>Δεν υπάρχει DNA. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει DNA σε όλα τα βοθρία.</p> <p>Λανθασμένος όγκος: Βεβαιωθείτε ότι προστίθενται 10μl διαλύματος DNA σε κάθε υποδοχέα.</p> <p>Προστέθηκε πλεονάζουσα ποσότητα DNA: Συγκέντρωση μεγαλύτερη των 200ng μπορεί να προκαλέσει αποτυχία της PCR.</p> <p>Μολυσματικές ουσίες στο DNA μπορεί να προκαλέσουν σποραδικές ή εκτεταμένες αποτυχίες ενίσχυσης.</p>
Απεικόνιση γέλης με επίχρισμα	DNA	Ελέγξτε τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του DNA. Η προσθήκη πάρα πολύ μεγάλης ποσότητας DNA στις αντιδράσεις PCR μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα απεικονίσεις γέλης με επίχρισμα.
Αδύναμη ενίσχυση	Πρόβλημα συγκέντρωσης DNA	Ελέγξτε ότι η συγκέντρωση του DNA δεν είναι ούτε πολύ μεγάλη ούτε πολύ μικρή. Ο στόχος πρέπει να είναι 100ng DNA ανά υποδοχέα, σε 10μl.
	Προβλήματα με το θερμικό κυκλοποιητή	<p>Φροντίστε να ακολουθείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή για τη συντήρηση και τη βαθμονόμηση του θερμικού κυκλοποιητή.</p> <p>Ελέγξτε ότι οι παράμετροι της PCR είναι σωστοί, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης.</p>
	Σφάλματα γέλης	<p>Βεβαιωθείτε ότι ο ίδιος όγκος αντιδραστήριου προστέθηκε σε κάθε βοθρίο, μεταξύ 5μl και 10μl.</p> <p>Βαθμονομήστε τους αναρροφητήρες όπως περιγράφεται στις οδηγίες του κατασκευαστή.</p> <p>Χρησιμοποιήστε διάλυμα φρέσκου βρωμιούχου αιθιδίου.</p>
Μη συγκεκριμένη ενίσχυση	Πρόβλημα συγκέντρωσης DNA	Ελέγξτε ότι η συγκέντρωση του DNA δεν είναι ούτε πολύ μεγάλη ούτε πολύ μικρή. Ο στόχος πρέπει να είναι 50-100ng DNA ανά υποδοχέα, σε 10μl.
	Τα αντιδραστήρια φορτώθηκαν με λανθασμένη σειρά	<p>Ελέγξτε την ευθυγράμμιση της PCR και των γραμμών γέλης.</p> <p>Αποφύγετε την υπερχειλίση από τα γειτονικά βοθρία κατά την ηλεκτροφόρηση δίνοντας προσοχή στην υπερφόρτωση και την τοποθέτηση της γέλης πριν την αφαίρεση των χτενιών.</p>
	Εντοπίστηκε νέο αλληλόμορφο	Στο νέο μοτίβο ενίσχυσης μπορεί να υπάρχουν ασυνεχή αλληλόμορφα. Αν χρησιμοποιείτε παλαιότερα φύλλα

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Τρόπος αντιμετώπισης
		ερμηνείας, κατεβάστε την πιο πρόσφατη ενημέρωση ευθυγράμμισης από την ηλεκτρονική διεύθυνση www.biofortuna.com . Αν αυτό δεν συμφωνεί το νέο μοτίβο πρέπει να προχωρήσετε σε έλεγχο χρησιμοποιώντας διαφορετικό διαγνωστικό σύνολο Biofortuna ή να δοκιμάσετε να αναγνωρίσετε την αλληλουχία μέσω ανάλυσης αλληλουχίας. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα επικοινωνίας με την τεχνική εξυπηρέτηση της Biofortuna για περισσότερη βοήθεια και καθοδήγηση.
Το μοτίβο ενίσχυσης δεν είναι ερμηνεύσιμο	Λανθασμένη ερμηνεία ενός τεχνητού προϊόντος ως συγκεκριμένη ζώνη	Ελέγξτε τους πίνακες ερμηνείας της συγκεκριμένης έκδοσης για το σωστό μέγεθος ζώνης. Ελέγξτε αν οι συγκεκριμένες ενισχύσεις είναι στο σωστό μέγεθος ή αν κάποιο τεχνητό προϊόν (επιμόλυνση εκ μεταφοράς, εκκινητής διμερούς) έχει παρεμηνευτεί ως ενίσχυση.
	Τα αντιδραστήρια φορτώθηκαν με λανθασμένη σειρά	Ελέγξτε την ευθυγράμμιση της PCR και των γραμμών γέλης.
	Μεμονωμένη αποτυχία PCR	Ελέγξτε αν υπάρχουν όλα τα εσωτερικά πρότυπα ελέγχου. Επαναλάβετε την ερμηνεία χωρίς να παραλείψετε κάποια αντίδραση.
	Λείπουν μικρά αμπλικόνια	Η ηλεκτροφόρηση προχώρησε πολύ, τα μικρά αμπλικόνια έχουν ξεφύγει από την άκρη της γέλης ή έχουν ξεπεράσει το μέτωπο του βρωμιούχο αιθιδίου ή έχουν διασπαρεί αφού μπήκαν στο προηγούμενο βοθρίο γέλης. Χρησιμοποιήστε συνθήκες ηλεκτροφόρησης κατάλληλες για το δικό σας σύστημα γέλης.
	Εντοπίστηκε νέο αλληλόμορφο στο δείγμα	Μερικές φορές νέα αλληλόμορφα μπορεί να ανακαλυφθούν τα οποία αυξάνουν το μοτίβο ενίσχυσης που δεν αντιστοιχεί σε υπάρχον(τα) αλληλόμορφο(α). Απευθυνθείτε στους υπεύθυνους πωλήσεων της περιοχής σας.