

CZ

Návod k použití

FastQ B*27

Souprava pro průkaz HLA-B*27 na molekulárně genetickém základu.

Návody v elektronické podobě najdete na www.bag-diagnostics.com

IVD**REF 728208 FastQ B*27****C**

Obsah

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ	2
2. POPIS VÝROBKU	2
3. PRINCIP TESTU	2
4. MATERIÁL	2
4.1 Obsah soupravy FastQ B*27	2
4.2 Doplnkové reagenty a přístroje nutné k provedení testu	2
4.3 Validované cykléry a reakční zkumavky	3
4.4 Doporučení pro nevalidované cykléry a reakční zkumavky	3
5. SKLADOVÁNÍ A STABILITA	3
6. PRŮBĚH TESTU	4
6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky	4
6.2 Izolace DNA	4
6.3 Amplifikace	4
6.4 Interpretace výsledků	6
7. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ	7
8. SPECIFIKACE VÝKONNOSTNÍCH CHARAKTERISTIK	7
9. OMEZENÍ METODY	7
10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY	8
11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	8
12. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH:	9
13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH	9
14. LITERATURA	9

Verze: 2/2020 / Publikováno: 2020-01**Změny oproti verzi 1/2019 označeny žlutě.**

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Zamýšlené použití souprav produktové řady FastQ je genetické testování lidského genomu na markery asociované s nemocemi a farmakogentikou. Pro soupravu FastQ B*27 jde o průkaz přítomnosti alel HLA-B*27, které jsou asociované s určitými autoimunitními onemocněními. (viz Popis výrobku).

2. POPIS VÝROBKU

Souprava **FastQ B*27** se používá k molekulárně-genetickému průkazu alel HLA-B*27. Protein HLA-B27 je variantou lidského leukocytárního antigenu B (HLA-B). Protein HLA-B27 je asociován s řadou autoimunitních onemocnění (Bechtěrevova choroba, ankylozující spondylitida, Reiterův syndrom, reaktivní artritida), a je proto používán jako součást diagnostického postupu (1, 2). Pozitivita na HLA-B27 je asociována s velmi vysokým rizikem onemocnění. U jedinců suspektních na Bechtěrevovu chorobu přispívá průkaz HLA-B*27 významně ke stanovení léčby pacienta. U 3% až 6% populace nesoucí gen HLA-B*27 se vyvine ankylozující spondylitida a více než 90% všech pacientů se séronegativní artritidou jsou nosiči tohoto genu.

Souprava **FastQ B*27** zahrnuje všechny běžné subtypy HLA-B*27. Souprava navíc umožňuje rozlišit mezi subtypy asociovanými s onemocněním od subtypů HLA-B*27:06 a HLA-B*27:09, které s ankylozující spondylitidou asociovány nejsou (3).

3. PRINCIP TESTU

Test využívá genomickou DNA jako základní materiál. DNA je namnožena v PCR se sekvenčně - specifickými primery (SSP). Primery byly specificky vyvinuty pro selektivní amplifikace exonů 2 a 3 genu HLA-B*27 a rozpoznávají subtypy B*27. Amplikony jsou detekovány hydrolyzačními próbami (TaqMan® próby), které jsou rovněž lokus specifické a jsou značené fluorescenčními barvami, což zvyšuje senzitivitu i specifitu reakce oproti klasické SSP.

Pokud jsou amplikony přítomny, jsou próby hydrolyzovány pomocí Taq polymerázy a je emitován fluorescenční signál úměrně s rostoucím množstvím PCR produktu. Fluorescenční signál je měřen pomocí optické detekční jednotky v RT-PCR cykléru.

Test je prováděn v jediné PCR reakci, která umožňuje detekci vnitřní pozitivní kontroly (lidský gen HBB), subtypů asociovaných s onemocněním a subtypů s onemocněním neasociovaných v samostatných kanálech s různými fluorescenčními barvami.

4. MATERIÁL

4.1 Obsah soupravy FastQ B*27

- **260 µl Q Primermix B27**, připraven k použití, obsahuje primery a próby
- **260 µl Q Plex Mix**, připraven k použití, obsahuje dNTP , Taq polymerázu, reakční pufr
- **Návod k použití**

4.2 Doplnkové reagentie a přístroje nutné k provedení testu

- Reagentie pro izolaci DNA (validované soupravy pro DNA izolaci viz 6.2)
- Real -Time PCR cyklér (validované cykléry viz 4.3)
- RT-PCR reakční zkumavky s víčky či fólií (validované výrobky viz 4.3)

- Destilovaná voda
- Pipety (0,5 – 1000 µl) a špičky

4.3 Validované cykléry a reakční zkumavky

Cyklér	RT-PCR reakční zkumavky	RT-PCR uzávěry
CFX96™ Real-Time PCR Detection System Comp. Bio-Rad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, 96 clear wells, clear frame, Product No. 4ti-1200/C Comp. 4titude / Brooks Life Sciences	4titude Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Optically clear adhesive film, Product No. 4ti-0560 Comp. 4titude/Brooks Life Sciences

Speciální poznámka: Pokud je použit jiný real - time cyklér, reakční zkumavky či uzávěry, je nutno provést validaci uživatelem.

4.4 Doporučení pro nevalidované cykléry a reakční zkumavky

Pro níže uvedené cykléry byly provedeno základní testování, ale nikoliv plná validace. Tabulka ukazuje doporučené specifikace.

Cyklér	RT-PCR reakční zkumavky	RT-PCR uzávěry
LightCycler® 480 System, Comp. Roche	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, Product No. 04729692001, Comp. Roche	LightCycler® 480 Sealing Foil, Product No. 04729757001 Comp. Roche
MIC (Magnetic Induction Cyler) Comp. Bio Molecular Systems	Tubes and caps: MIC-TUBES No. 68MIC-60653 Exclusive distributor (D/A): Comp. Biozyme	
Rotor-Gene Q Comp. Qiagen	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, Cat No./ID: 981103 or 981106, Comp. Qiagen	
Lightcycler 2.0 Comp. Roche	n.a.	

5. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Soupravy jsou distribuovány s chladicími vložkami. Po přijetí je nutno skladovat veškeré reagenty při ≤ -20 °C. Datum expirace je vyznačeno na etiketě každé reagenty. Datum expirace vyznačené na vnějším obalu soupravy odpovídá datu expirace té reagenty ze soupravy, která má dobu expirace nejkratší. **Test opakovaného zamražení - rozmražení neukázal žádný vliv na kvalitu testu pro Plex Mix do šesti opakování a pro Q Mastermix do patnácti opakování. Pro více cyklů rozmrazování nejsou zatím dostupná data. Proto doporučujeme, pokud je to potřeba, si připravit aliquoty.**

6. PRŮBĚH TESTU

6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky

Molekulárně genetické metody jsou velmi citlivé a musí být prováděny pouze dobře zaškolenými osobami, zkušenými jak v technikách PCR, tak i v testování histokompatibility. Výsledky těchto testů nelze použít jako jediný základ pro klinická rozhodnutí.

Je nutné dodržovat zvláštní bezpečnostní opatření, aby se předešlo kontaminacím, a tím i falešným výsledkům:

- ◆ Pracujte v rukavicích (pokud je to možné, tak bez obsahu pudru).
- ◆ Používejte novou špičku (s integrovaným filtrem) na každý pipetovací krok.
- ◆ Používejte oddělená pracovní místa pro jednotlivé kroky: pre-amplifikační fáze (DNA izolace a příprava reakce) a post-amplifikační fáze (detekce).
- ◆ Používejte nástroje, reagentie a přístroje samostatně pro každé pracovní místo zvlášť a nepřenášejte je.

6.2 Izolace DNA

Materiál pro izolaci genomické DNA musí být dodán ve vhodném sběrném systému. Pro test je vhodná EDTA nebo citrátová krev. Přítomnost heparinu může inhibovat PCR, a tudíž nejsou sběrné systémy s heparinem vhodné (4) a nelze je použít.

Doporučujeme používat **CE** IVD certifikované metody extrakce DNA.

Validované soupravy pro izolaci DNA:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (kolonky)
- Chemagic™ 360 (magnetické částice)
- **EXTRA-GENE I (vysolovací metoda)**

Koncentrace DNA k provedení FastQ B*27 testu je požadována v rozmezí 10-20 ng/μl.

DNA musí mít tyto indexy čistoty:

- $OD_{260}/OD_{280} = > 1.5 \text{ and } < 2.0$
Vyšší hodnoty znamenají přítomnost RNA, nižší kontaminaci proteiny.
- $OD_{260}/OD_{230} = > 1.8$
Nižší hodnota indikuje možné znečištění uhlovodíky, solemi nebo organickými rozpouštědly.

6.3 Amplifikace

Je žádoucí používat reakční zkumavky doporučené výrobcem cykléru nebo zkumavky doporučené v kapitole 4.3.

Pro každý vzorek připravte následující reagentie a napipetujte je do reakční zkumavky:

- 2 μl** Q Primermix
- 2 μl** Plex Mix
- 1 μl** vzorek DNA (10 – 20 ng/μl)
- 5 μl** destilovaná voda.

Reakční objem pro každý RT-PCR test je 10 μl.

Doporučené výjimky

Rotor-Gene Q Cyclcr

Při použití cykléru Rotor-Gene Q je nutno použití většího reakčního objemu. Na cykléru je třeba nastavit reakční objem 20 μ l.

Jsou tři možnosti pro přípravu reakční směsi:

- Použijte dvojnásobné množství reagentů než je uvedeno výše a tím dosáhněte reakčního objemu 20 μ l.
- Přidejte dalších 5 μ l destilované vody (15 μ l celkově).
- Překryjte PCR mix 5 μ l minerálního oleje (15 μ l celkově).

Lightcycler 2.0

Při použití cykléru Roche LC 2.0 je nutno pro rozpoznání reakčních trubiček (kapilár) přístrojem použít referenční barvu (ROX).

Koncentrace referenční barvy v celkovém reakčním objemu 10 μ l musí být 120 nM. Doporučujeme nahradit objem destilované vody (5 μ l) stejným objemem před ředěné ROX (240 nM).

Pokud připravujeme směs z Q Primermix, Plex Mix a destilované vody pro více vzorků je vhodné přidat rozumný objem navíc kvůli možným pipetovacím ztrátám.

Pokud provádíte **negativní kontrolu (NTC)** připravte reakci s destilovanou vodou místo DNA.

Uzavřete reakční zkumavky a krátce stočte obsah. Ujistěte se, že ve zkumavkách nejsou žádné bublinky. Pokud jsou bublinky přítomny, odstraňte je lehkým poklepáním o desku stolu. Spusťte PCR program s následujícími parametry:

Krok	Čas [s]	Teplota [°C]	Ramp rate [°C/s]	Plate read	Počet cyklů
Počáteční inicializace	120	96	2,5	-	1
Denaturace	5	98	2,5	-	13
Annealing + Extenze	25	68	2,2	-	
Denaturace	5	98	2,5	-	37
Annealing + Extenze	25	68	-	ano	

Pro práci se soupravou **FastQ B*27** byly validovány tyto cykly:

Biorad: CFX96™ Real-Time PCR Detection System: použijte standardní nastavení

Doporučení pro testované, ale nevalidované cykly:

- Při použití cykléru LightCycler® 480 nastavte ramp rate na 4.4°C/s pro denuraci a 2.2°C/s pro annealing a extenzi. Následně proveďte barevnou kompenzaci ("color compensation").

- Při použití cykléru Rotor-Gene Q je nutno upravit reakční objem v nastavení cykléru na 20 µl. Pro analýzu dat můžete použít funkci "Use noise slop correction".

6.4 Interpretace výsledků

Všechny testy, ve kterých je přítomna humánní genomická DNA (gDNA), musí vykazovat fluorescenční signál v zeleném kanálu (FAM) s vnitřní kontrolou. Vzorky pozitivní pro HLA B*27 musí navíc vykazovat pozitivní signál v oranžovém kanálu (CAL Fluor Orange 560). Červený kanál (CAL Fluor RED 610) dává pozitivní signál tam, kde jsou přítomny alely B*27:06 a B*27:09, které jsou detekovány nezávisle.

Fluorofor	Specifická
Oranžový CAL Fluor Orange 560 (B*27 pozitivní)	B*27:01-17,19-21,24-28,30-47,76-84,86-156,158-164
Červený CAL Fluor Red 610 (B*27:06, *27:09 pozitivní)	B*27:06,09 #

Nelze vyloučit následující alely: B*27:91,106,136,154. Tyto alely jsou ale extrémně vzácné a nejedná se o CWD alely.

Amplifikační signál negativní kontroly (B*27 negative) hodnoty Cq musí být mimo definovanou oblast pro oba kanály. Negativní kontrola s destilovanou vodou by neměla vykazovat žádný fluorescenční signál v průběhu celé Q-PCR a slouží jako kontaminační kontrola. Fluorescenční signál v rozsahu definovaných Cq hodnot v negativní kontrole s destilovanou vodou je důkazem kontaminace. Fluorescenční signál mimo rozsah hodnot Cq může být způsoben díky vysoké citlivosti metody nesprávným pipetováním. V těchto případech by měl být test zopakován.

Tyto signály jsou považovány za pozitivní:

	Fluorofor	Hodnota Cq	Vlnová délka v nm
Vnitřní pozitivní kontrola	zelený FAM	≤ 20	Excitace: 495 Emise: 520
B*27 pozitivní	oranžový CAL Fluor Orange 560 (HEX)	≤ 25	Excitace: 538 Emise: 559
B*27:06 pozitivní B*27:09 pozitivní	Červený CAL Fluor Red 610 (RED)	≤ 20	Excitace: 590 Emise: 610

7. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

Soupravy **FastQ B*27** jsou určeny pouze pro in vitro diagnostické použití a měly by být používány pouze dobře zaškolenými a kvalifikovanými osobami. Veškerá práce by měla probíhat za dodržování Standardů správné laboratorní práce.

S biologickým materiálem použitým k extrakci DNA (t.j. krví nebo lidskou tkání) je nutné zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Při manipulaci s biologickým materiálem doporučujeme odpovídající opatření (nepipetujte ústy, noste jednorázové rukavice při manipulaci se vzorkem i při provádění testu, dezinfikujte si ruce po provedení testu).

Biologický materiál je nutné před likvidací inaktivovat (např. v autoklávu). Stejně tak jednorázové pomůcky by měly být po použití inaktivovány nebo spáleny.

Vylitý potenciálně infekční materiál by měl být ihned odstraněn savým papírovým ubrouskem a kontaminovaná oblast očištěna standardním desinfekčním prostředkem nebo 70% alkoholem.

Materiál použitý na úklid včetně rukavic je nutné před likvidací inaktivovat (např. v autoklávu).

Likvidace všech vzorků, nepoužitých činidel a odpadu by měla být v souladu s místní legislativou a nařízeními.

Je třeba zabránit mikrobiální kontaminaci reagensů při tvorbě aliquotů. Doporučujeme používat sterilní jednosměrné pipety a špičky. Zakalené reagensie a/nebo reagensie vykazující jakékoli znaky mikrobiální kontaminace nesmí být použity.

Bezpečnostní listy, respektive prohlášení k Bezpečnostním listům jsou k dispozici ke stažení na www.baq-diagnostics.com.

8. SPECIFIKACE VÝKONNOSTNÍCH CHARAKTERISTIK

Kombinace primerů a práb zaručuje přesnou identifikaci alel B*27 specifikovaných v kapitole 6.4. Přesnost a reprodukovatelnost testu je verifikována pro každou novou šarži pomocí referenčních vzorků se známým HLA typem.

Pro evaluační studii soupravy FastQ B* bylo použito 95 předem otypovaných vzorků. Výsledky studie byly porovnány s výsledky dosaženými pomocí s dalších C certifikovaných typizačních souprav (mezi ostatními SSP, SSO a sérologie) a/nebo sekvenováním. Nebyly pozorovány žádné diskrepance v detekci B*27 mezi testy.

DNA vzorky	Interní studie celkem	Procento shody [%]
B27 negativní	84	100
B27 pozitivní	11	100
Celkem	95	100

Tabulka: Shmutí interní studie ukazující procento shody k referenční typizaci a průkazu B*27.

9. OMEZENÍ METODY**10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY**

Interní kontrolu kvality nové šarže soupravy FastQ B*27 kit lze provést použitím kombinace vzorků DNA se známým HLA typem.

Vnitřní pozitivní kontrola úspěšné amplifikace je obsažena v Q Primermix. Negativní kontrolu k rozpoznání možné kontaminace provedeme testem, kde DNA nahradíme destilovanou vodou (NTC).






11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Projev	Možná příčina	Možné/á řešení
Špatný, nebo žádný signál	Přítomnost inhibitoru.	Použijte čisté reagensie.
	V reakci není žádná gDNA.	Zopakujte test. Buďte pozorní na správné pipetování.
	Špatné parametry amplifikace.	Zkontrolujte program PCR a ramp rate.
	Kontaminovaná nebo degradovaná DNA.	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA. Zkontrolujte DNA na gelu. Zopakujte izolaci DNA.
	Fluorescenční próby nebo primery jsou degradovány.	Použijte čerstvý Q PrimerMix. Zabraňte osvětlení a častému zamrazování a rozmrazování. Zkontrolujte podmínky skladování!
	Bublinky v PCR reakčních zkumavkách / zbytky roztoku na vnitřních stěnách zkumavky.	Pečlivě pipetujte. Stočte PCR desku.
	Nekompatibilní nebo nekvalitní spotřební plast.	Použijte kompatibilní a vysoce kvalitní spotřební plast (viz kapitola 3.3).
	Špatný výpočet signálu z důvodu abnormálního signálu v počátečních cyklech běhu testu.	Použijte v softwaru opravný výpočet (např. "apply fluorescence drift correction" – funkce v systémech Bio-Rad, nebo vynechte prvních pět cyklů z analýzy.
	Vypaření reagensů díky nesprávnému uzavření reagenčních zkumavek.	Ujistěte se, že zkumavky jsou správně uzavřeny. Buďte opatrní na krajích přelepovací fólie.
Signál v negativní kontrole	DNA kontaminace negativní kontroly	Zopakujte negativní kontrolu. Dekontaminujte pracovní prostor.

12. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH:

TaqMan® je ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems Inc.

13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH

	Dostatečné pro N testů
	Teplota skladování / Omezení teploty
	Spotřebujte do
	Viz návod k použití
	Výrobce
CONT	Obsah, obsahuje
GENOTYPING	Zamýšlené použití: Typizování lidských genetických markerů, které jsou asociovány s chorobami, nebo farmakogenetickými reakcemi.
IFU	Návod k použití
IVD	Pouze pro IN VITRO použití
LOT	Číslo šarže
Q PRIMERMIX B27	Primermix pro typizaci HLA-B*27 pomocí soupravy FastQ B*27
PLEX MIX	Mastermix pro RT-PCR
REF	Katalogové číslo

14. LITERATURA

1. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
2. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706
3. Kahn, MA et al., 2007. Autoimmunity Reviews 6: 183–189
4. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166

Návody k použití v jiných jazycích na: <http://www.bag-diagnostics.com> nebo přímo na info@bag-diagnostics.com nebo telefonu +49 (0)6404-925-125