

CZ

Návod k použití

HISTO TYPE B*27 Q

Souprava pro tkáňovou typizaci HLA alel na molekulárně genetickém základě

Návody v elektronické podobě najdete na www.bag-healthcare.com**IVD****REF** 728200**HISTO TYPE B*27 Q****CE** 0123**Obsah:**

1. POPIS VÝROBKU	2
2. PRINCIP TESTU	2
3. MATERIÁL	2
3.1 Obsah soupravy HISTO TYPE B*27 Q	2
3.2 Doplnkové reagensie a přístroje nutné k provedení testu	2
3.3 Validované cykléry a reakční zkumavky	3
4. SKLADOVÁNÍ A STABILITA	3
5. PRŮBĚH TESTU	3
5.1 Bezpečnostní a speciální poznámky	3
5.2 Izolace DNA	3
5.3 Amplifikace	4
5.4 Interpretace výsledků	5
6. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ	5
7. SPECIFIKACE VÝKONNOSTNÍCH CHARAKTERISTIK	6
8. OMEZENÍ METODY	6
9. INTERNÍ KONTROLA KVALITY	7
10. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	7
11. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH:	8
12. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH	8
13. LITERATURA	8

Verze: 01/2018 / Publikováno: 2018-03

1. POPIS VÝROBKU

Souprava HISTO TYPE B*27 Q 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 **HISTO TYPE B*27 Q** 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).

2. 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.

3. MATERIÁL

3.1 Obsah soupravy HISTO TYPE B*27 Q

- **230 µl Q Primermix B27**, připraven k použití, obsahuje primery a próby
- **230 µl Q Mastermix**, připraven k použití, obsahuje dNTPs (deoxynukleotidtrifosfáty), Taq polymerázu, reakční pufr
- **Návod k použití**

3.2 Doplnkové reagentie a přístroje nutné k provedení testu

- Reagentie pro izolaci DNA (validované soupravy pro DNA izolaci viz 5.2)
- Real -Time PCR cyklér (validované cykléry viz 3.3)
- RT-PCR reakční zkumavky s víčky či fólií (validované výrobky viz 3.3)
- Destilovaná voda
- Pipety (0,5 – 1000 µl) a špičky

3.3 Validované cykléry a reakční zkumavky

Cyklér	Verze softwaru	RT-PCR reakční zkumavky	RT-PCR uzávěry
CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Comp. Bio-Rad	3.1.1517.0823.	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, 96 clear wells, clear frame, Product No. 4ti-1200/C Comp. 4titude	4titude Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Comp. 4titude
		Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/white #HSP9655 Comp. Bio-Rad	0.2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips, optical, ultraclear #TCS0803 Comp. Bio-Rad
LightCycler® 480 System, Comp. Roche	LCS480 1.5.0.39	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, Product No. 04729692001 Comp. Roche	LightCycler® 480 Sealing Foil, Product No. 04729757001 Comp. Roche

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

4. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Soupravy jsou distribuovány s chladičnými 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 ani při 15-ti opakováních.

5. PRŮBĚH TESTU

5.1 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, reagenty a přístroje samostatně pro každé pracovní místo zvlášť a nepřenášejte je.

5.2 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  IVD certifikované metody extrakce DNA.

Validované soupravy pro izolaci DNA:

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

Pokud je v laboratoři používána jako standardní jiná metoda izolace genomické DNA, musí ji uživatel validovat.

Koncentrace DNA k provedení HISTO TYPE B*27 Q testu je požadována v rozmezí 10-150 ng/μl. DNA musí mít tyto indexy čistoty:

- $OD_{260}/OD_{280} = > 1,5$ a $< 2,0$
Vyšší hodnoty znamenají přítomnost RNA, nižší kontaminaci proteiny.
- $OD_{260}/OD_{230} = > 1,8$
Nižší hodnota indikuje možné znečištění uhlovodíky, solemi nebo organickými rozpouštědly.

5.3 Amplifikace

Je žádoucí používat reakční zkumavky doporučené výrobcem cykléru nebo zkumavky doporučené v kapitole 3.3.

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

- 2 μl** Q Primermix
- 2 μl** Q Mastermix
- 1 μl** vzorek DNA (10-150 ng/μl)
- 5 μl** destilovaná voda

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

Pokud připravujeme směs z Q Primermix, Q Mastermix a destilované vody pro více vzorků je vhodné přidat rozumný objem 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	Teplota	Počet cyklů
Počáteční inicializace	10 min	96 °C	1 cyklus
Denaturace	20 s	96 °C	40 cyklů
Annealing + Extenze	40 s + odečítání/reading	64 °C	

Pro práci se soupravou HISTO TYPE B*27 Q byly validovány tyto cykléry:

Biorad: CFX96™ Real-Time PCR Detection System

Roche: LightCycler® 480 System

Speciální poznámka: Při použití přístroje LightCycler® 480 nastavte ramp rate (rychlost změny teploty) pro denaturaci na 4,4 °C/s a pro annealing a extenzi 2,2 °C/s. Následně je třeba provést "color compensation". S přístrojem CFX96™ Real-Time PCR Detection System je vhodné použít základní (default) nastavené hodnoty. Při použití jiných cyklérů musí uživatel provést validaci.

5.4 Interpretace výsledků

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

Kanál	Specifická
Zelený (B*27 pozitivní)	B*27:01-17,19-21,24-28,30-47,76-84,86-156,158-164
Červený (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 (zelený, červený). Negativní kontrola s destilovanou vodou by neměla vykazovat žádný fluorescenční signál v průběhu celé Q-PCR a slouží jako kontaminační kontrola.

Tyto signály jsou považovány za pozitivní:

	Barevný kanál	Před - definovaný práh	Cq-Level	LOD-Cq	Vlnová délka v nm
Vnitřní pozitivní kontrola	Žlutý (VIC)	15	21	29	excitace: 538 emise: 554
B*27 pozitivní	Zelený (FAM)	50	27	35	excitace: 495 emise: 520
B*27:06 pozitivní B*27:09 pozitivní	Červený (Texas Red)	50	23	31	excitace: 597 emise: 616

Speciální poznámka: Předdefinovaný práh by měl být použit pouze pro kombinaci cykléru CFX96 s čírymi PCR zkumavkami. Pokud jsou použity pouze bílé PCR zkumavky, je nutno použít automatický výpočet prahu za pomoci odpovídajícího softwaru.

Cq-level je první cyklus PCR, který ukazuje pozitivní detekci oproti pozadí.

LOD-Cq je poslední PCR cyklus, který lze spolehlivě odečíst jako pozitivní oproti pozadí.

6. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

Soupravy HISTO TYPE B*27 Q 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 vzorků, nepoužitých reagentů a odpadu musí být ve shodě s příslušnými místními předpisy.

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.bag-healthcare.com.

7. SPECIFIKACE VÝKONNOSTNÍCH CHARAKTERISTIK

Kombinace primerů a prób zaručuje přesnou identifikaci alel B*27 specifikovaných v kapitole 5.4. Přesnost a reprodukovatelnost testu je verifikována pro každou novou šarži pomocí referenčních vzorků se známým HLA typem.

Pro evaluační studii soupravy HISTO TYPE B*27 Q bylo použito 126 předem otypovaných vzorků. Výsledky studie byly porovnány s výsledky dosaženými pomocí s dalších 66 certifikovaných typizačních souprav (mezi ostatními SSP, SSO a sérologie) a/nebo sekvenováním. Nebyly pozorovány žádné diskrepance v detekci B*27 mezi testy.

DNA vzorky	Celkový počet (interní a externí studie)	Interní studie celkem	Externí studie celkem	Procento shody [%]
B27 negativní	101	74	27	100
B27 pozitivní	25	21	4	100
Celkem	126	95	31	100

Tabulka: Shrnutí interních a externích studií ukazující procento shody průkazů B*27.

8. OMEZENÍ METODY

Protože Q-PCR je metoda vysoce citlivá na kontaminaci, je třeba dbát velké opatrnosti při extrakci DNA. Validační testy provedené v rámci evaluační studie soupravy HISTO TYPE B*27 Q ukázaly, že množství DNA v rozmezí od 10 ng do 150 ng nemá žádný zásadní vliv na průkaz alel B*27.

Je třeba věnovat maximální pozornost zabránění kontaminace souprav a dalšího laboratorního materiálu a vybavení amplikony DNA. Proto jsou doporučeny pravidelné stěrové testy (např. BAG WipeTest, kat. č. REF 7091) a negativní kontroly v každém běhu. Při negativní kontrole s destilovanou vodou nesmí být přítomen žádný fluorescenční signál ($C_q > N.A.$). Pokud se signál při negativní kontrole (žlutý kanál) objeví, je nutno dekontaminovat pracovní prostor pro PCR a v případě potřeby vyměnit reagensie.

Veškeré přístroje (t. j. pipety, real-time cykléry) musí být kalibrovány podle pokynů výrobce.

9. INTERNÍ KONTROLA KVALITY

Interní kontrolu kvality nové šarže soupravy HISTO TYPE B*27 Q 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).






10. 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 reagensí 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.

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

TaqMan[®] je ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems Inc.

12 VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH

	Dostatečné pro N testů
	Teplota skladování / Omezení teploty
	Spotřebujte do
	Viz návod k použití
	Výrobce
HLA TYPING	Zamýšlené užití: HLA typizace
IFU	Návod k použití
IVD	Pouze pro IN VITRO použití
LOT	Číslo šarže
Q Primermix B27	Primermix pro typizaci HLA-B*27 pomocí soupravy HISTO TYPE B*27 Q
Q Mastermix	Mastermix pro soupravu HISTO TYPE B*27 Q
REF	Katalogové číslo

13. 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-healthcare.com>
<http://service.bag-healthcare.com> nebo telefonním čísle +49 (0)6404-925-125