

CZ

Návod k použití

HISTO SPOT[®] SSO soupravy

testovací soupravy pro tkáňovou typizaci HLA alel molekulárně biologickými metodami
elektronická verze návodu k použití na www.bag-healthcare.com

IVD

katalogové číslo REF 726010: HISTO SPOT [®] A 4D	CE 0123
katalogové číslo REF 726011: HISTO SPOT [®] A Xtend	CE 0123
katalogové číslo REF 726020: HISTO SPOT [®] B 4D	CE 0123
katalogové číslo REF 726021: HISTO SPOT [®] B Xtend	CE 0123
katalogové číslo REF 726030: HISTO SPOT [®] C 4D	CE
katalogové číslo REF 726040: HISTO SPOT [®] DRB1 4D	CE 0123
katalogové číslo REF 726041: HISTO SPOT [®] DRB1 Xtend	CE 0123
katalogové číslo REF 726045: HISTO SPOT [®] DRB3/4/5	CE 0123
katalogové číslo REF 726050: HISTO SPOT [®] DQB1 4D	CE
katalogové číslo REF 726051: HISTO SPOT [®] DQB1 4D / DQA1	CE
katalogové číslo REF 726060: HISTO SPOT [®] DPB1 (96 testů)	CE
katalogové číslo REF 726061: HISTO SPOT [®] DPB1 (24 testů)	CE
katalogové číslo REF 726070: HISTO SPOT [®] On-Call Typing kit	CE 0123
katalogové číslo REF 726071: HISTO SPOT [®] Coeliac Disease	CE
katalogové číslo REF 726098: HISTO SPOT [®] Reagent Kit	CE

Soupravy HISTO SPOT[®] CWD high res již nejsou v nabídce a byly vyřazeny z návodu k použití.

Verze: 14/2017 / Vydáno: 2017-12 Změny vůči verzi 13/2017 jsou zvýrazněny žlutě.

Obsah

1. POPIS VÝROBKU	3
Systém HISTO SPOT [®] SSO je in vitro diagnostický test pro tkáňovou typizaci HLA alel na molekulárně biologickém základě poskytující výsledky typizací o nízkém až středním rozlišení pro alely zahrnuté v seznamu CWD 2.0.0 (Mack S.J. et al., 2013). Skládá se z HISTO SPOT [®] typizačních souprav, HISTO SPOT [®] reagenční soupravy, přístroje MR. SPOT [®] a interpretačního softwaru HISTO MATCH.....	3
2. PRINCIP TESTU	4
3. MATERIÁL.....	5
3.1 Reagaencie dodávané v typizačních soupravách HISTO SPOT [®] , HISTO SPOT [®] 4D, HISTO SPOT [®] Xtend a HISTO SPOT [®] Coeliac Disease	5
3.2 Reagaencie dodávané v soupravě HISTO SPOT [®] On-call typing kit.....	5
3.3 Reagaencie dodávané v HISTO SPOT [®] Reagent kit	5
3.5 Reagaencie a vybavení potřebné, ale nedodávané v soupravách	6
4. SKLADOVÁNÍ A STABILITA.....	6
5. PRACOVNÍ POSTUP	6
5.1 Bezpečnostní opatření a speciální poznámky	6
5.2 DNA izolace	6
5.4 Automatizovaná hybridizace v přístroji MR.SPOT [®]	8
5.4.1 Příprava reagenčních	8
<i>Obrázek 1: oddělení jednotlivých testovacích jamek</i> 5.4.2 Příprava přístroje MR.SPOT [®]	9
5.4.3 Přenesení výsledků k interpretaci do PC	10
5.4.4 Interpretace výsledků.....	10
Fotografie by měly vypadat tak, jak je vidíte na obrázku 2. Obrázek 3 znázorňuje schematický výsledek a význam jednotlivých prób.	10
<i>Obrázek 3: Schématická ilustrace výsledku a funkcí jednotlivých prób.</i>	10
6. VAROVÁNÍ A PŘEDBĚŽNÁ OPATŘENÍ	11
7.1 Vyhodnocení.....	12
7.2 PCR amplifikační reakce.....	12
8. OMEZENÍ METODY	12
9. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY	12
11. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH:.....	13
12. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH.....	14
13. LITERATURE	14

1. POPIS VÝROBKU

Systém HISTO SPOT[®] SSO je in vitro diagnostický test pro tkáňovou typizaci HLA alel na molekulárně biologickém základě poskytující výsledky typizací o nízkém až středním rozlišení pro alely zahrnuté v seznamu CWD 2.0.0 (Mack S.J. et al., 2013). Skládá se z HISTO SPOT[®] typizačních souprav, HISTO SPOT[®] reagenční soupravy, přístroje MR. SPOT[®] a interpretačního softwaru HISTO MATCH.

Typizační soupravy HISTO SPOT[®] obsahují veškeré reagencie potřebné pro PCR reakce a testovací jamky s navázanými sekvencemi specifickými oligonukleotidovými próbami pro detekci PCR produktů. HISTO SPOT[®] reagenční souprava obsahuje reagencie potřebné pro hybridizaci a detekci a lze ji použít se všemi typizačními soupravami. Přístroj MR.SPOT[®] je určen k použití se soupravami HISTO SPOT[®] a umožňuje zpracování 1-96 testů v jednom běhu, automatizuje celý proces hybridizace, detekce až k interpretaci výsledků. Software HISTO MATCH je nezbytný pro interpretaci výsledků.

Pro různé typy úloh jsou k dispozici soupravy s různou mírou rozlišení:

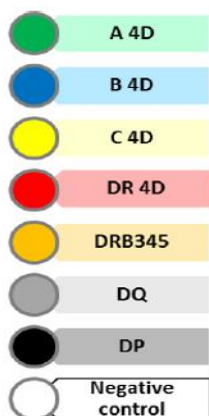
Soupravy HISTO SPOT[®] / soupravy HISTO SPOT 4D

Soupravy HISTO SPOT[®] jsou navrženy pro typizace bez ambiguit přinejmenším na úrovni skupin, tj. první pole nomenklatury. Různé kombinace alel z různých alelických skupin, které odpovídají stejnému reakčnímu vzoru prób, jsou považovány za ambiguitní.

Soupravy HISTO SPOT[®] 4D obvykle poskytují alelický výsledek (i druhé pole nomenklatury) pokud použijeme filtr pro hojné (common) alely (C v katalogu CWD 2.0.0)

Souprava HISTO SPOT[®] On-Call Typing Kit

Souprava HISTO SPOT[®] On-Call Typing Kit je kombinací všech testů potřebných pro orgánové transplantace. Kit je navržen tak, aby maximálně usnadnil práci v situacích kdy je na typizaci málo času (on-call). Amplifikační primery jsou předkapané a vysušené na dně PCR stripů a SSO testy jsou skombinovány v držáku (Obr. 1). V softwaru HISTO MATCH je připraven pro tyto testy zjednodušený postup.



Obr. : Uspořádání stripu HISTO SPOT[®] On-Call Typing Kit

Negativní kontrola obsahuje primery a próby pro lokusy HLA-A, -B a – DRB1 (změna obrázku).

Soupravy HISTO SPOT[®] Xtend

Soupravy HISTO SPOT[®] obsahují doplňující testovací jamky k jamkám ze souprav HISTO SPOT[®] 4D, které poskytují vyšší rozlišení zahrnující i alely dobře dokumentované (WD) z katalogu CWD 2.0.0. Obecně lze použít pro dosažení typizace s vysokým rozlišením při použití filtru CWD v softwaru HISTO MATCH, nebo pro řešení ambiguit u jednotlivých vzorků.

Souprava HISTO SPOT[®] Coeliac Disease Kit

Celiakie je autoimunitní onemocnění spouštěné glutenem obsaženém v mnohých obilovinách. Pokud není diagnostikováno brzo vede k chronickému zánětu a destrukci tenkého střeva. Celiakii

je silně asociována s haplotypy DQA1*05:01- DQB1*02:01 a DQA1*03-DQB1*03:02. Souprava HISTO SPOT® Coeliac Disease Kit rozpoznává alely asociované s celiakií a software HISTO MATCH poskytne při interpretaci výpočet rizika (založeno na modelu podle Megiorni and Pizzuti, 2012).

2. PRINCIP TESTU

Test zahrnuje čtyři základní kroky:

- izolaci DNA
- PCR amplifikaci
- hybridizaci a detekci
- interpretaci dat

Izolace DNA je provedena z klinického materiálu použitím DNA izolačních metod zavedených v dané laboratoři nebo standardním komerčním kitem. DNA je poté amplifikována v lokus specifické PCR reakci za použití reagensů obsažených v kitu (mastermix, roztoku $MgCl_2$ respektive PCR stripy s vysušenými primery, PCR pufr a roztok $MgCl_2$). Specifita amplifikace je zaručena sestavou biotinylovaných primerů navržených k unikátní amplifikaci daného HLA lokusu. Po PCR reakci je PCR destička, nebo PCR strip, obsahující biotinem značené produkty přenesena do přístroje MR.SPOT®. MR.SPOT® přidá hybridizační pufr k amplikonům a potom směs přenesena do testovacích jamek se setem navázaných specifických oligonukleotidových (SSO) prób. Tyto próby jsou buďto samostatné oligonukleotidové próby nebo kombinace dvou nebo více samostatných prób imobilizovaných na stejném místě (mozaikové próby), které byly navrženy pro přesnější identifikaci cis lokalizovaného polymorfismu.

Biotinem značené amplikony se naváží na ty SSO próby, které obsahují komplementární cílovou sekvenci a mohou být pak prokázány kolorimetrickou reakcí. Aby se zabránilo nespecifickým vazbám amplikonů na povrch testovacích jamek, MR.SPOT® před přenesením amplikonů blokuje povrch jamek blokovacím pufrům.

Po promytí zesilujícím roztokem se odstraní veškeré nenavázané amplikony. Přidá se streptavidin zásaditý fosfatázový konjugát, který se naváže na biotin značené amplikony již navázané na SSO próbách. Po dalším promývacím kroku se přidá BCIP/NBT substrát, který se zbarví modrofialově, je-li změněn alkalickou fosfatázou. Výsledkem jsou tmavé tečky na dně jamky, které jsou vyfotografovány v přístroji MR.SPOT® a obrázek je přenesen do softwaru HISTO MATCH v PC uživatele. Při analýze obrazu HISTO MATCH software určí intenzitu každé tečky na dně jamky v testu a porovná ji s intenzitou pozadí. Z těchto dat jsou pak vypočítány pozitivní a negativní reakce. Následně interpretační část programu HISTO MATCH určí na základě uspořádání hybridizačního patternu/vzoru HLA typ vzorku.

3. MATERIÁL

3.1 Reagaencie dodávané v typizačních soupravách HISTO SPOT[®], HISTO SPOT[®] 4D, HISTO SPOT[®] Xtend a HISTO SPOT[®] Coeliac Disease

- Testovací jamky, samostaně balené, každý strip o 8 jamkách obsahujících imobilizované sekvence specifické oligonukletidové (SSO) próby.
- **Mastermix**, připraven k použití, obsahuje biotinylované primery pro daný lokus, dNTPs, Taq polymerázu, reakční pufr, 0,05% azid sodný.
- **Chlorid hořečnatý**, 6 mM, připraven k použití.
- Návod k použití, informace k dané šarži a verzi, hit tabulku, a informace o próbách jsou přiložena na CD.

3.2 Reagaencie dodávané v soupravě HISTO SPOT[®] On-call typing kit

- Individuálně balené kombinované testovací jamky v plastovém držáku. Testovací jamky obsahují imobilizované sekvence specifické oligonukletidové (SSO) próby.
- **PCR stripy** s vysušenými primery pro lokus specifickou amplifikací daného HLA lokusu. Primery odpovídají vzorku prób v odpovídající testovací jamce.
- **PCR víčka**.
- **PCR pufr**, připraven k použití, obsahuje DNTp, Taq polymerázu, reakční pufr, 0,05% azid sodný.
- **Chlorid hořečnatý**, 6 mM, připraven k použití.
- Návod k použití, informace k dané šarži a verzi, hit tabulku, a informace o próbách jsou přiložena na CD.

3.3 Reagaencie dodávané v HISTO SPOT[®] Reagent kit

Blocking Buffer, Blokovací pufr, připraven k použití, obsahuje 0,001% Proclin[®] 150

Hybridisation Buffer, Hybridizační pufr, připraven k použití, obsahuje 0,001% barvivo, 0,1% dodecyl sulfát sodný, 0,001% Proclin[®] 150

Stringent Wash Buffer, Zesilující pufr, připraven k použití, obsahuje 0,001% barvivo, 0,1% dodecyl sulfát sodný, 0,001% Proclin[®] 150

TBS promývací pufr (Tris pufovaný fyziologický roztok), připraven k použití, obsahuje 20 mM Tris, 0,003% barvivo, 0,001% Proclin[®] 150

BCIP[®] / NBT substrát, připraven k použití, (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát / nitroblue tetrazolium chlorid)

Conjugate, Konjugát, Streptavidin alkalická fosfatáza, KONCENTROVANÝ, obsahuje < 0,1% azid sodný, musí být naředěn 1:1666 v blokovacím pufru)

3.4 Definice šarží a verzí (lots and batches)

- **Souprava (Kit)**: např. **HISTO SPOT A**, definuje lokus, který lze danou soupravou testovat.
- **Šarže (Lot)**: např. **A084**, **A085** definuje uspořádání SSO prób použitých v dané soupravě a jejich specifitu. Každá šarže může obsahovat více verzí.
- **Verze (Batch)**: např. **A085-1**, **A085-2**, **A085-3** definuje jak dané próby reagují v porovnání s kontrolními próbami (hodnota cut off) a definuje datum výroby a expirace stripů. Některé próby mohou být v jednotlivých verzích jedné šarže vypnuty. Tyto informace naleznete na k šarži specifickém CD dodávaném spolu se soupravou (Hit tables – excelový soubor).

3.5 Reagencie a vybavení potřebné, ale nedodávané v soupravách

- přístroj MR.SPOT[®], [REF] kat.č. 726100, nebo přístroj MR.SPOT[®] 2.0, [REF] kat.č. 726110
- software HISTO MATCH, [REF] kat.č. 726102
- pipetovací špičky k přístroji MR.SPOT[®], 1000 µl [REF] kat.č. 726099 a 200 µl [REF] kat.č. 726097
- reagencie/souprava pro extrakci DNA (nelze použít vysolovací metody)
- PCR destičky s víčky nebo přelepovací fólií (HISTO SPOT PCR[®] Frameplates, [REF] kat.č. 726220, HISTO SPOT[®] PCR Caps, [REF] 726090, HISTO SPOT[®] PCR Foils, [REF] 726089)
- termální cyklér
- deionizovaná voda
- různé pipety (rozmezí 0,5 – 1000 µl) a špičky k pipetám

4. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Soupravy jsou dodávány při pokojové teplotě. Po převzetí by měly být veškeré reagencie a složky souprav skladovány při 2...8 °C. Datum expirace je vyznačeno na etiketě na každé reagentii a je platné pro originálně uzavřené reagentie. Datum expirace uvedené na krabici soupravy odpovídá datu expirace té reagentie ze soupravy, která má datum expirace nejkratší. Lze vyjmout jednotlivé jamky ze souprav HISTO SPOT[®], HISTO SPOT[®] 4D, HISTO SPOT[®] Xtend and HISTO SPOT[®] Coeliac Disease z obalů, odlomit od stripů a zbytek uchovat k pozdějšímu použití. Testovací jamky skladované v otevřené fólii je nutno použít do 30ti dnů. Ostatní otevřené reagentie je nutné zpracovat do 3 měsíců od prvního otevření. Roztok konjugátu je nutno připravovat vždy čerstvý.

5. PRACOVNÍ POSTUP

5.1 Bezpečnostní opatření 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 nesmí být použity samotně pro klinická rozhodnutí.

Je třeba dodržovat transplantační směrnice, stejně jako standardy EFI, aby se minimalizovalo nebezpečí falešné typizace, obzvláště v případech diskrepance mezi výsledky molekulárně biologických a sérologických metod.

Je nutno 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 na každý pipetovací krok (s integrovaným filtrem).
- ◆ Používejte oddělená pracovní místa pro jednotlivé kroky: pre-amplifikační fáze (DNA izolace a příprava reakce) a post-amplifikační fáze (hybridizace a detekce). Nejlépe ve dvou oddělených místnostech.
- ◆ Amplikony by neměly být nošeny zpět na místa, kde se připravuje PCR.
- ◆ Používejte nástroje, reagencie a přístroje samostatně pro každé pracovní místo zvlášť a nepřenášejte je.

5.2 DNA izolace

Silně doporučuje používat CE IVD certifikované metody extrakce DNA. Laboratorní standardní metoda musí být validována uživatelem. Nepoužívejte, pokud možno, metody založené na principu vysolování).

Validovaná metoda extrakce DNA:

- kolonky Qiagene

Metody úspěšně používané uživateli:

- EZ-1 / Geno M6 (Qiagend beads)
- Promega Maxwell 16
- QuatroProbe (BeeRobotics)

Přítomnost heparinu potenciálně blokuje PCR reakci, používejte tedy EDTA nebo citrátovou krev. Vzorek DNA by měl mít koncentraci přibližně 15-30 ng/μl a indexy čistoty:

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

5.3 Amplifikace**5.3.1 Soupravy HISTO SPOT[®], HISTO SPOT[®] 4D, HISTO SPOT[®] Xtend a HISTO SPOT[®] Coeliac Disease**

Použijte pro amplifikaci PCR destičky s okrajem (skirted), neboť musí být následně přidržovány sponou za okraj v přístroji MR.SPOT[®]. HISTO SPOT PCR plates jsou validovány pro amplifikaci, destičky od osatních výrobců musí být validovány uživatelem. Pro každý vzorek k amplifikaci pipetujte do mikrozkušavky následující množství:

- 10 μl** Mastermix
- 5 μl** MgCl₂
- 5 μl** vzorek DNA (15 ng/μl)

Celkový objem amplifikační reakce je 20 μl.

Při přípravě premixu: počet vzorků + 2 x 10 μl Mastermixu	}	použijte 15 μl pro každý vzorek
počet vzorků + 2 x 5 μl MgCl ₂		

Poznámka: Je důležité, aby koncentrace DNA byla v rozmezí 15-30 ng/μl. Vyšší koncentrace může vést s falešně pozitivní reakci prób a nižší koncentrace může způsobit chybu amplifikace.

Pokud provádíte **negativní kontrolu**, připravte PCR reakci s destilovanou vodou místo DNA.

Uzavřete amplifikační mikrozkušavky víčky, nebo přelepte fólií, krátce stočte a vložte do cykléru a amplifikujte s programem popsaném v kapitole 5.3.3.

5.3.2 Souprava HISTO SPOT[®] On-Call typing kit

Na každý kombinovaný test použijte jeden PCR strip se předkapanými amplifikačními primery **PCR Primers** z chladničky.

Připravte pre mix podle z těchto reagentů:

- 80 μl** PCR pufr
- 40 μl** MgCl₂
- 40 μl** vzorek DNA (15-30 ng/ μl)

Napipetujte 20 μl pre-mixu do každé jamky s předkapanými primery a resuspendujte primery v pre-mixu.

Poznámka: Je důležité, aby koncentrace DNA byla v rozmezí 15-30 ng/μl. Vyšší koncentrace může vést s falešně pozitivní reakci prób a nižší koncentrace může způsobit chybu amplifikace.

Pro **negativní kontrolu** v jamce číslo 8 v **HISTO SPOT[®] On-Call typing kitu** připravte jednu PCR reakci následujícího složení:

10 µl PCR pufr

5 µl MgCl₂

5 µl H₂O

Uzavřete amplifikační mikrozkuřavky víčky, krátce stočte a vložte do cykléru a amplifikujte s programem popsaném v kapitole 5.3.3.

5.3.3 PCR program

krok programu	čas	teplota	počet cyklů
první denaturace	2 min	96 °C	1 cyklus
denaturace	15 s	96 °C	10 cyklů
annealing+ extenze	60 s	65 °C	
denaturace	10 s	96 °C	20 cyklů
annealing	50 s	61 °C	
extenze	30 s	72 °C	
podržení	∞	22 °C	

Nastavení je stejné pro všechny cykléry, ale celkový čas se bude měnit podle rychlosti změn teplot (ramping speed) u jednotlivých typů cyklérů.

Následující cykléry byly validovány pro použití s HISTO SPOT SSO:

Applied Biosystems: PE 9600, PE 9700 (použijte ramp rate of PE 9600), Veriti™

Biorad: PTC 100 / PTC 200, MyCycler

Eppendorf: Mastercycler EP Gradient S

V ostatních cyklérech musí uživatel provést validaci sám, všeobecně doporučujeme používat Ramp rate 1-2° C/sec.

Po ukončení amplifikace mohou být vzorky testovány buď okamžitě nebo skladovány při 2...8 °C po dobu až pěti dnů. Nezamrazujte amplikony.

Není nutné provádět po amplifikaci kontrolu produktů na gelu. V mnoha případech to nepřinese žádnou informaci, neboť prožky jsou velmi slabé a nemusí být na gelu patrné. Pokud přesto chcete provést gelovou elektroforézu, neměli byste odebrat více než 2-3 µl amplikonů.

Velikost amplikonů se mění u jednotlivých souprav, v každé soupravě jsou k dispozici na příloženém CD (Hit table v excelovém formátu, druhý list „Notes/poznámky“).

5.4 Automatizovaná hybridizace v přístroji MR.SPOT®

5.4.1 Příprava reagensů

Vyjměte reagenty HISTO SPOT® a testovací jamky HISTO SPOT® z lednice a nechte je vytemperovat na pokojovou teplotu.

Někdy mohou být pozorovatelné krystalky soli v hybridizačním pufru a/nebo v zesilovacím pufru. Pokud krystalky zpozorujete, zahřejte reagenty na 30 °C a krystalky se rozpustí. Zahřívajte celý obsah lahvičky, ne část!

Konjugát je nutno naředit v poměru 1:1666 v blokovacím pufru. Roztok konjugátu je nutno vždy připravit čerstvý pro každé testování.

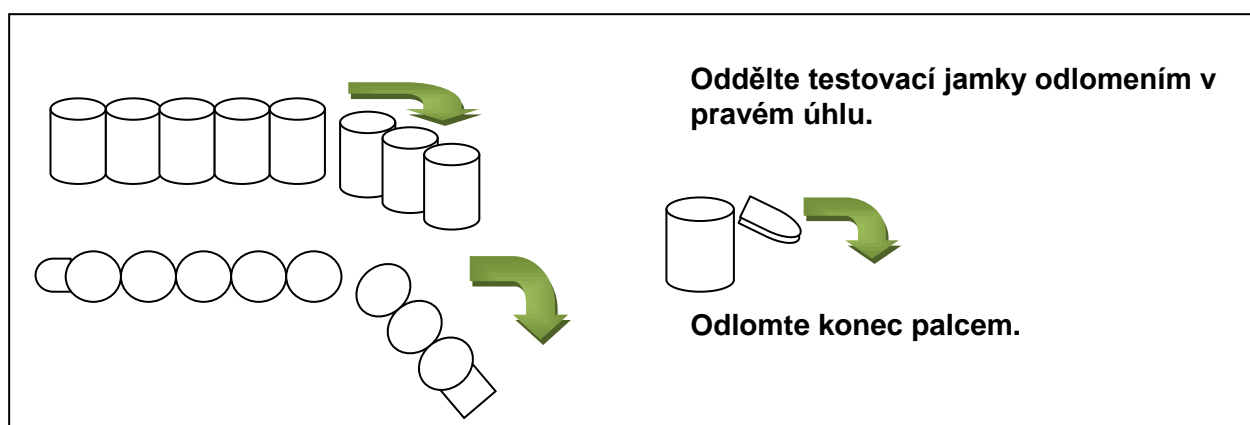
Konjugát musí být vortexován a stočen před každou přípravou roztoku!

Potřebné množství reagensí se bude měnit podle počtu zpracovávaných stripů. Potřebná množství se objeví na obrazovce MR.SPOT[®] po zadání počtu stripů. Naplňte požadovaná množství reagensí do odpovídajících označených zásobníků.

Vložte testovací jamky a PCR destičku do patřičných bloků přístroje MR.SPOT[®].
Pozor na správnou orientaci PCR destičky.

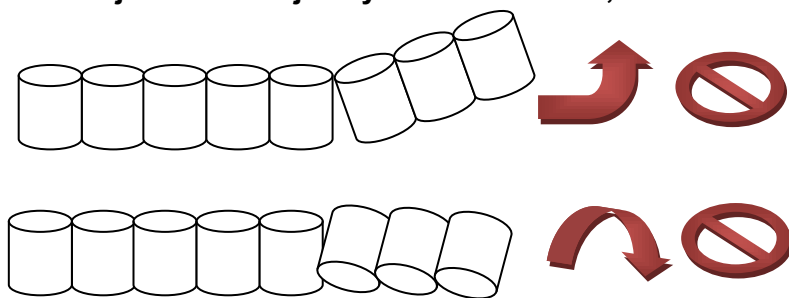
Prosíme, ujistěte se, že není žádná nečistota nebo zbytky plastu v držáku reagenčních jamek, neboť toto by mohlo narušit přenos tepla při hybridizaci.

Pokud potřebujeme do běhu méně než 8 testů, mohou být testovací stripy souprav HISTO SPOT[®], HISTO SPOT[®] 4D, HISTO SPOT[®] Xtend a HISTO SPOT[®] Coeliac Disease rozděleny na jednotlivé jamky podle obrázku 1. Pokud používáte jednotlivé jamky, dbejte na to, aby byly



dobře umístěny v držáku reagenčních jamek a nebyly zkroucené jedna vůči druhé.

Neodlamujte testovací jamky směrem nahoru, nebo dolů.



Pokud požíváte samostatné jamky nebo kombinované stripy, ujistěte se, že jste použili prázdné jamky na doplnění prázdných pozic v používaných sloupcích.

Obrázek 1: oddělení jednotlivých testovacích jamek

5.4.2 Příprava přístroje MR.SPOT®

Zapněte přístroj MR.SPOT®. Objeví se startovací obrazovka. Postupujte podle pokynů na obrazovce. Detaily procesu jsou popsány v uživatelské příručce k přístroji MR.SPOT®.

Poznámka: Přístroj MR.SPOT® i veškeré reagenty by neměly být vystaveny přímému slunečnímu světlu.

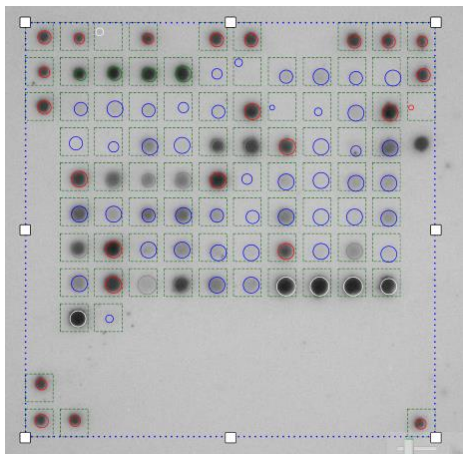
5.4.3 Přenesení výsledků k interpretaci do PC

Přenešte data do PC se softwarem HISTO MATCH pomocí počítačové sítě nebo manuálně pomocí USB (flash) disku tak, jak je to popsáno v manuálu pro HISTO MATCH software.

5.4.4 Interpretace výsledků

Otevřete software HISTO MATCH (pokud ještě není nainstalován, nainstalujte ho z CD dodávaného spolu s přístrojem MR.SPOT®) a interpretujte data tak, jak je popsáno v manuálu k softwaru HISTO MATCH.

Fotografie by měly vypadat tak, jak je vidíte na obrázku 2. Obrázek 3 znázorňuje schematický výsledek a význam jednotlivých prób.



Barevný kroužek ukazuje funkci jednotlivých prób (nahlédněte do návodu k softwaru HISTO MATCH pro přesnější popis).

Obrázek 2: Fotografie výsledků testu pro HLA A

●	●		●		●	●			●	●	●
●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	●
●	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	
	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	○
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	●	○	○	○	○	●	○	○	○	
	○	●	○	●	○	○	●	●	●	●	
	○	○									
	○	○									
●											
●	●										●

●: Poziční próby: Reagují s amplifikačními primery z Mastermixu a ukazují, že byl přidán Mastermix a také všechny reagenty pro SSO test správně. Navíc umožňují softwaru lokalizovat a orientovat obrázek. Jejich uspořádání je specifické ke každé šarži.

●+●: Amplifikační kontrola pro exon 2 a exon 3 je zdvojená. Tyto próby jsou univerzální pro všechny alely daného lokusu a ukazují, že PCR proběhla správně. Jsou také používány jako referenční hladina pro alelicky specifické próby

●: Pozitivní alelicky specifická próba.

○: Negativní alelicky specifická próba.

Obrázek 3: Schématická ilustrace výsledku a funkcí jednotlivých prób.

6. VAROVÁNÍ A PŘEDBĚŽNÁ OPATŘENÍ

Soupravy HISTO SPOT® 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 laboratorní práce.

S biologickým materiálem použitým k extrakci DNA (t.j. krví nebo lidskou tkání) je nutno 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 třeba před likvidací inaktivovat (např. v autoklávu). Stejně tak jednorázové pomůcky by měly být po použití autoklávovány nebo spáleny.

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

Materiál použitý na úklid včetně rukavic je nutno inaktivovat před vyhozením (např. v autoklávu).

Blokovací pufr, hybridizační pufr, zesilující roztok a TBS promývací pufr obsahují ProClin®150 a roztok chloridu hořečnatého obsahuje ProClin®300. Tyto regencie obsahují pouze 0,001% konzervantu, přesto zabraňte kontaktu s kůží a sliznicemi.

Mastermix a konjugát obsahují jako konzervační činidlo azid sodný. Koncentrace v reagentech je < 0,1% azidu sodného a tato koncentrace není považována za nebezpečnou. Přesto se vyhněte kontaktu s kůží a sliznicemi. Azid sodný může reagovat s olovem a mosazí v instalacích odpadů a vytvářet výbušné azidy kovů. Při vylévání roztoků obsahujících azid sodný splachujte tyto do laboratorních odpadů velkým množstvím vody.

Veškerá práce s reagenty by měla být provázena náležitou opatrností. Požívejte ochranu očí, laboratorní pláště a jednorázové rukavice. Vyhněte se kontaktu materiálů s kůží, sliznicemi a okem. Pokud dojde ke kontaktu, oplachujte velkým množstvím vody. Při nedostatečném ošetření může dojít k popáleninám.

Při rozliti reagentů je nejprve naředte vodou a pak utírejte. Substrát nesmí přijít do styku s kovy a oxidačními činidly.

Likvidace vzorků, nepoužitých reagentů a odpadu musí být ve shodě s příslušnými místními nařízeními.

Zabraňte mikrobiální kontaminaci vzorků při odebírání aliquotů ze zásobních lahví. Doporučuje se používat sterilní jednorázové pipety a pitovací špičky. Nepoužívejte reagenty s patrným zákalem nebo mikrobiální kontaminací.

Bezpečnostní listy (Material Safety Data Sheets (MSDS)) jsou k dispozici ke stažení na:

www.bag-healthcare.com

7. SPECIFIKACE VÝKONNOSTNÍCH CHARAKTERISTIK

7.1 Vyhodnocení

Byly provedeny srovnávací studie se všemi HISTO SPOT[®] SSO soupravami s předem otypovanými vzorky DNA. Výsledky byly porovnány s dalšími typizačními metodami (t.j. SSP, sekvenování). Nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi jednotlivými metodami. Pro každou šarži je každá próba verifikována pomocí referenčních DNA vzorků.

7.2 PCR amplifikační reakce

Alely amplifikované každou HISTO SPOT[®] SSO soupravou, použitá HLA nomenklatura a exony, které jsou amplifikovány, jsou popsány v odpovídajících informacích specifických k příslušné šarži. Tyto informace jsou dostupné na CD přiloženém ke každé soupravě.

8. OMEZENÍ METODY

Protože PCR je vysoce citlivá na kvalitu a koncentraci DNA, lze použít pouze vzorky, které mají koncentraci 15 -30 ng/μl a indexy čistoty: poměr extinkcí OD₂₆₀/OD₂₈₀ mezi 1,5 a 2,0 a poměr extinkcí OD₂₆₀/OD₂₃₀ >1,8).

Je třeba věnovat maximální pozornost zabránění kontaminace souprav a dalšího laboratorního materiálu a vybavení amplikony DNA. Pravidelné stěrové testy (např BAG WipeTest, kat. č. REF 7091) a negativní kontroly v každém testu jsou doporučeny.

Hybridizace je velmi citlivá na přesné dodržení teploty. Proto je nezbytné používat soupravy HISTO SPOT[®] SSO pouze v přístroji MR.SPOT[®], aby byly zajištěny správné inkubační teploty a časy.

Veškeré přístroje a nástroje (pipety, cykléry, termobloky, přístroj MR.SPOT[®]) musí být kalibrovány podle pokynů výrobce. Přesnost a teplotní uniformita cyklérů může být zkontrolována pomocí testu BAG CylerCheck (kat. č. REF 7104, 71044).

9. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

Vnitřní kontrola kvality nových šarží HISTO SPOT[®] SSO souprav může být prováděna pomocí kombinace DNA vzorků o známém HLA typu.

Vnitřní pozitivní kontrola je zahrnuta v každé testovací jamce a umožňuje kontrolu správné amplifikace a hybridizace.

Doporučuje se provádění negativních kontrol k průkazu možné kontaminace. Použijte PCR reakci bez DNA a následnou hybridizaci jako negativní kontrolu.

10. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

projev	možná závada/y	možné/á řešení
přístroj nefunguje nebo funguje špatně	mnohé	konzultujte manuál k přístroji MR.SPOT®
chybové hlášení při přenosu dat	chyba při přenosu dat	manuálně přeneste data na USB flash disku
žádné výsledky	chyba v zasíťování při analýze obrazu	provedte manuální zasíťování
v jamkách nejsou žádné tečky	chyba v PCR, nebyl přidán Master mix	zopakujte celý test a zkontrolujte PCR produkt na gelu
pouze kontrolní tečky jsou pozitivní	chyba v amplifikaci, nebyla přidána DNA	zopakujte celý test a zkontrolujte PCR produkt na gelu
falešně pozitivní próby	příliš mnoho DNA nebo příliš vysoká koncentrace konjugátu (nebyl stočen před použitím)	zkontrolujte koncentraci DNA, stočte konjugát
výpadek jednoho exonu	koncentrace DNA příliš vysoká, DNA degradovaná	zkontrolujte koncentraci DNA, dejte DNA na gel
žádné výsledky nebo nerozlišitelné výsledky v důsledku slabého signálu	chyba v ředění konjugátu, špatná amplifikace, chyba přístroje	zopakujte test, zkontrolujte teplotu hybridizace v přístroji







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

Proclin® je ochranná známka společnosti Rohm and Haas.

BCIP® je ochranná známka společnosti Sigma Aldrich Co.

Veriti™ je ochranná známka společnosti Applied Biosystems.

12. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH

	Pouze pro IN VITRO použití
	Teplota skladování / Omezení teploty
LOT	Číslo šarže
	Spotřebujte do
REF	Katalogové číslo
	Viz návod k použití
eIFU	Elektronický návod k použití
	Dostatečné pro N testů
	Výrobce
HLA TYPING	Zamýšlené užití: HLA typizace
Mastermix A	Mastermix pro amplifikaci HLA-A lokusu
Mastermix B	Mastermix pro amplifikaci HLA-B lokusu
Mastermix C	Mastermix pro amplifikaci HLA-C lokusu
Mastermix DRB1	Mastermix pro amplifikaci HLA-DRB1 lokusu
Mastermix DQB1	Mastermix pro amplifikaci HLA-DQB1 lokusu,
Mastermix DQ	Mastermix pro amplifikaci HLA-DQB1 a HLA-DQA1 lokusů
Mastermix DPB1	Mastermix pro amplifikaci HLA-DPB1 lokusu
Mastermix DP	Mastermix pro amplifikaci HLA-DPB1 a DPA lokusu
Mastermix DRB3/4/5	Mastermix pro amplifikaci HLA-DPB3/4/5 lokusů
Mastermix Coeliac	Mastermix pro amplifikaci HLA-DPB3/4/5 lokusů
Testwells A	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-A lokusu
Testwells A Xtend	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-A lokusu
Testwells B	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-B lokusu
Testwells B Extend	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-B lokusu
Testwells C	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-C lokusu
Testwells DRB1	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DRB1 lokusu
Testwells DRB1 Xtend	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DRB1 lokusu
Testwells DQB1	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DQB1 lokusu
Testwells DQ	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DQB1 a HLA-DQA1 lokusů
Testwells DPB1	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DPB1 lokusu
Testwells DP	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DPB1 a DPA1 lokusu

Testwells DRB3/4/5	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DRB3/4/5 lokusů
Testwells Coeliac	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci HLA-DRB3/4/5 lokusů
Combistrip	Testovací jamky s navázanými próbami k typizaci více HLA lokusů
PCR Primers	PCR stripy s usušenými primery pro amplifikaci více HLA lokusů
PCR Caps	Víčka na PCR stripy
PCR Buffer	PCR pufr
MgCl ₂	Roztok chloridu hořečnatého
BLOCKBUF	Blokovací pufr
HYBBUF	Hybridizační pufr
STRGWASH	Zesilující roztok
TBSWASH	TRIS pufrovaný fyziologický roztok
SUBS	Substrát
CONJ	Streptavidin alkalická fosfatáza-konjugát
HISTO SPOT [®] INFORMATION CD	CD, obsahuje Návod k použití, šaržově specifický soubor, hit tabulku a informaci o próbách

13. LITERATURE

Mack S.J. et al., Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue, Tissue Antigens 81/4, 183-257 (2013)

Megiorni and Pizzuti, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing Journal of Biomedical Science 19:88 (2012)

Návody k použití v jiných jazycích můžete nalézt na: <http://www.bag-healthcare.com/>
<http://service.bag-healthcare.com/>, nebo telefoním čísle +49 (0)6404-925-125