

DE

# Gebrauchsinformation

## HISTO SPOT<sup>®</sup> SSO Kits

Testkits zur Typisierung von HLA Allelen auf molekulargenetischer Basis

Elektronische Gebrauchsinformation siehe [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

IVD

<b>REF</b> 726010: HISTO SPOT <sup>®</sup> A 4D	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726011: HISTO SPOT <sup>®</sup> A Xtend	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726020: HISTO SPOT <sup>®</sup> B 4D	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726021: HISTO SPOT <sup>®</sup> B Xtend	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726030: HISTO SPOT <sup>®</sup> C 4D	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726040: HISTO SPOT <sup>®</sup> DRB1 4D	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726041: HISTO SPOT <sup>®</sup> DRB1 Xtend	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726045: HISTO SPOT <sup>®</sup> DRB3/4/5	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726050: HISTO SPOT <sup>®</sup> DQB1 4D	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726051: HISTO SPOT <sup>®</sup> DQB1 4D / DQA1	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726060: HISTO SPOT <sup>®</sup> DPB1 (96 tests)	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726061: HISTO SPOT <sup>®</sup> DPB1 (24 tests)	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726062: HISTO SPOT <sup>®</sup> DPA1 / DPB1 (96 tests)	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726063: HISTO SPOT <sup>®</sup> DPA1 / DPB1 (24 tests)	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726070: HISTO SPOT <sup>®</sup> On-Call Typing Kit	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726071: HISTO SPOT <sup>®</sup> Coeliac Disease	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726098: HISTO SPOT <sup>®</sup> Reagent Kit	<b>CE</b>

**Version: 15/2018 / Stand: 2018-12** Änderungen gegenüber Version 14/2017 sind gelb markiert.

**Inhalt**

1. PRODUKTBESCHREIBUNG .....	3
2. TESTPRINZIP .....	4
3. MATERIAL .....	5
3.1 Inhalt der HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend und HISTO SPOT® Coeliac Disease Kits .....	5
3.2 Inhalt des HISTO SPOT® On-Call Typing Kits .....	5
3.3 Inhalt des HISTO SPOT® Reagent Kits .....	5
3.4 Definition von Lots und Batches .....	5
3.5 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte .....	6
4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	6
5. TESTDURCHFÜHRUNG .....	6
5.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise .....	6
5.2 DNA Isolation .....	7
5.3 Amplifikation .....	7
5.3.1 HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend und HISTO SPOT® Coeliac Disease Kits .....	7
5.3.2 HISTO SPOT® On-Call Typing Kit .....	8
5.3.3 PCR Programm .....	8
5.4 Automatisierter Hybridisierungs-Assay auf dem MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor .....	9
5.4.1 Reagenzienvorbereitung .....	9
5.4.2 Start des MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor .....	10
5.4.3 Transfer der Ergebnisse zu einem PC für die Interpretation .....	10
5.4.4 Interpretation der Ergebnisse .....	10
6. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE .....	11
7. LEISTUNGSMERKMALE .....	12
7.1 Leistungsbewertung .....	12
7.2 PCR Amplifikation .....	12
8. GRENZEN DER METHODE .....	12
9. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE .....	12
10. PROBLEMBEHANDLUNG .....	13
11. VERWENDETE MARKENNAMEN .....	13
12. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN .....	13
13. LITERATUR .....	15

## 1. PRODUKTBESCHREIBUNG

Das HISTO SPOT® System ist ein In-vitro-Diagnostikum zur molekulargenetischen Typisierung von HLA Allelen und liefert Ergebnisse mit einer mittleren Auflösung bis höheren Auflösung der Allele aus dem CWD 2.0.0 Katalog (Mack et al., 2013). Es besteht aus den genortspezifischen HISTO SPOT® Typisierungskits, dem HISTO SPOT® Reagent Kit, dem MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor und der HISTO MATCH Interpretations-Software.

Die HISTO SPOT® Typisierungskits enthalten alle für die PCR Reaktion benötigten Komponenten, und die Testgefäße mit den gebundenen sequenz-spezifischen Oligonukleotidsonden für den Nachweis der PCR-Produkte. Der HISTO SPOT® Reagent Kit enthält die Reagenzien für die Hybridisierung und die Detektion der PCR Produkte und kann in Kombination mit allen HISTO SPOT® Typisierungskits verwendet werden. Der MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor wurde speziell für die automatische Hybridisierung und Detektion entwickelt. Es können zwischen 1 und 96 Tests gleichzeitig bearbeitet werden. Die HISTO MATCH Software wird für die Interpretation der Ergebnisse benötigt.

Es sind unterschiedliche Kits für verschiedene Anwendungen und Grade der Auflösung verfügbar:

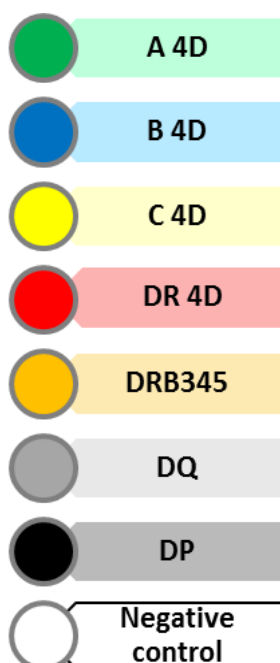
### HISTO SPOT® Kits / HISTO SPOT® 4D Kits

Die HISTO SPOT® Kits sind so konzipiert, dass die Ergebnisse mindestens auf Allelgruppen-Ebene (d.h. das erste Feld der Nomenklatur) eindeutig sind. Verschiedene Allelkombinationen mit gleichem Reaktionsmuster, die die Allelgruppen überschreiten, werden als uneindeutig eingestuft.

HISTO SPOT® 4D Typisierungskits liefern bei Verwendung eines Filters für häufige Allele (Kategorie C aus dem CWD 2.0.0 Katalog) in der Regel eindeutige Ergebnisse auf Allelebene (2 Felder).

### HISTO SPOT® On-Call Typing Kit

Der HISTO SPOT® On-Call Typing Kit kombiniert alle für eine Organtransplantation relevanten Genorte. Dieser Kit soll den Arbeitsablauf - insbesondere im Nachtdienst - so weit wie möglich vereinfachen. Die Amplifikationsprimer sind in PCR Streifen vorgetropft und getrocknet, und die SSO Tests sind in einem Plastikhalter kombiniert (Abb 1). In der HISTO MATCH Software gibt es einen vereinfachten Ablauf und eine kombinierte Interpretation der Ergebnisse.



**Abbildung 1: Konfiguration des HISTO SPOT® On-Call Typing Kits**  
Die Negativkontrolle enthält Primer und Sonden für HLA-A, -B und – DRB1.

### **HISTO SPOT® Xtend Kits**

Die HISTO SPOT® Xtend Kits enthalten zusätzliche Testgefäße, die in Kombination mit den HISTO SPOT® 4D Kits eine höhere Auflösung liefern, die auch gut dokumentierte (WD) Allele aus dem CWD 2.0.0. Katalog mit einschließt. Sie können generell verwendet werden um ein **höher** auflösendes Ergebnis unter Verwendung des CWD Filters in HISTO MATCH zu erzielen, oder um Ambiguitäten für einzelne Proben aufzulösen.

### **HISTO SPOT® Coeliac Disease Kit (Zöliakie)**

Coeliac Disease (Zöliakie) ist eine Autoimmunreaktion, die durch Gluten hervorgerufen wird. Gluten ist ein Bestandteil von verschiedenen Getreiden. Wenn die Krankheit nicht frühzeitig diagnostiziert wird, führt sie zu einer chronischer Entzündung und zur Zerstörung des Dünndarms. Zöliakie ist streng assoziiert mit dem HLA-DQA1\*05 – DQB1\*02 und HLA-DQA1\*03 – DQB1\*0302 Haplotyp. Der HISTO SPOT® Coeliac Disease Kit erkennt die assoziierten HLA Allele und die Interpretation in der HISTO MATCH Software gibt eine Risikoeinschätzung (basierend auf Megiorni und Pizzuti, 2012).

## **2. TESTPRINZIP**

Der Test umfasst vier grundlegende Schritte:

- DNA Isolation
- PCR Amplifikation
- Hybridisierung und Detektion
- Daten-Interpretation

Die DNA Isolation aus der klinischen Probe wird mit der im Labor etablierten Methode oder mit kommerziellen Kits durchgeführt. Anschließend wird die DNA in einer genortspezifischen PCR mit den im Kit enthaltenen Reagenzien (Mastermix, MgCl<sub>2</sub> bzw. PCR-Streifen mit Primern, PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub>-Lösung) amplifiziert. Die Spezifität der Amplifikation wird durch biotinylierte Primer sichergestellt, die speziell entwickelt wurden, um nur den gewünschten HLA-Genort zu amplifizieren. Nach der PCR Amplifikation wird die PCR Platte bzw. die PCR-Streifen mit dem biotin-markierten Amplikon in den **MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0** Prozessor überführt. **MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0** pipettiert Hybridisierungspuffer in jedes PCR-Gefäß und überträgt das Amplikon zusammen mit dem Hybridisierungspuffer in die Testgefäße mit einem Array gebundener sequenz-spezifischer Oligonukleotid (SSO) Sonden. Die Sonden sind entweder einzelne Oligonukleotidsonden oder Kombinationen aus zwei oder mehr einzelnen Sonden, die in einem Spot gebunden sind (Mosaik-Sonden). Mosaik-Sonden wurden entwickelt, um die Bestimmung von cis-lokalisierten Polymorphismen zu optimieren.

Die biotin-markierten Amplikons binden an die Sonden, die eine komplementäre Sequenz enthalten, und können mit einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Um eine unspezifische Bindung der Amplikons an den Gefäßboden zu verhindern, werden die Testgefäße vor der Zugabe der Amplikons mit Blockingpuffer blockiert.

In einem stringenten Waschschrift wird ungebundenes Amplikon vollständig entfernt. Dann erfolgt die Zugabe eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugats, welches sich an das gebundene biotin-markierte Amplikon anlagert. Nach weiteren Waschschriften wird BCIP/NBT Substrat zugegeben, welches von der Streptavidin Alkalischen Phosphatase in ein dunkelblaues Präzipitat umgewandelt wird.

Die so gebildeten Farbpunkte werden im **MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0** Prozessor fotografiert und das Bild wird in die HISTO MATCH Software importiert. Das Bild-Analyseprogramm der Software bestimmt die Intensität jeden Punkts und vergleicht sie mit der Intensität des Hintergrunds. Aus diesen Daten werden die positiven und negativen Reaktionen berechnet. Das Allel-Zuordnungsprogramm der HISTO MATCH Software bestimmt anschließend den HLA-Typ anhand spezifischer Hybridisierungsmuster.

### 3. MATERIAL

#### 3.1 Inhalt der HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend und HISTO SPOT® Coeliac Disease Kits

- Einzel verpackte **Teststreifen**, jeder Streifen enthält 8 Tests, enthalten fixierte sequenz-spezifische Oligonukleotid Sonden.
- **Mastermix**, gebrauchsfertig, enthält biotinylierte Primer für den jeweiligen Genort, dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer, 0,05% Natriumazid
- **Magnesiumchlorid**, 6 mM, gebrauchsfertig
- Gebrauchsinformation, lotspezifische Auswertedateien, Reaktionsdiagramm und Sondeninformationen auf einer CD

#### 3.2 Inhalt des HISTO SPOT® On-Call Typing Kits

- Einzel verpackte Kombistreifen mit **Testgefäßen** für die HLA Typisierung (in einem Plastikhalter). Die Testgefäße enthalten fixierte sequenz-spezifische Oligonukleotid Sonden.
- **PCR Streifen** mit getrockneten Primern für die genortspezifische Amplifikation der zu typisierenden Genorte. Die Anordnung der Primer entspricht den HLA Genorten in den Kombistreifen.
- **PCR Streifendeckel**
- **PCR Puffer**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer, 0,05% Natriumazid
- **Magnesiumchlorid**, 6 mM, gebrauchsfertig
- Gebrauchsinformation, lotspezifische Auswertedateien, Reaktionsdiagramm und Sondeninformationen auf einer CD

#### 3.3 Inhalt des HISTO SPOT® Reagent Kits

Die Reagenzien in einem Kit sind ausreichend für 96 Typisierungen. Jeder Kit enthält:

- **Blockingpuffer**, gebrauchsfertig, enthält 0,001% Proclin® 150
- **Hybridisierungspuffer**, gebrauchsfertig, enthält 0,001% Farbstoff, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 0,001% Proclin® 150
- **Stringente Waschlösung**, gebrauchsfertig, enthält 0,001% Farbstoff, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 0,001% Proclin® 150
- **TBS Waschlösung** (Tris Buffered Saline), gebrauchsfertig, enthält 20 mM Tris, 0,003% Farbstoffe, 0,001% Proclin® 150
- **BCIP® / NBT Substrat**, gebrauchsfertig, (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat / Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)
- **Konjugat**, Streptavidin Alkalische Phosphatase, Konzentrat, enthält < 0,1% Natriumazid (Verdünnung: 1:1666 in Blockingpuffer)

#### 3.4 Definition von Lots und Batches

In jedem Kit befindet sich eine CD mit dem Batch File, der in der Datenbank der HISTO MATCH Auswertesoftware gespeichert werden muss (siehe: Gebrauchsinformation für HISTO MATCH). Für jeden Kit gibt es Lots und Batches:

- **Kit**: z.B. **HISTO SPOT® A**, definiert den getesteten Genort
- **Lot**: z.B. **A084**, **A085**, definiert die Anordnung und die Spezifität der Sonden in einem Kit. Jedes Lot kann viele verschiedene Batches umfassen.
- **Batch**: z.B. **A085-1**, **A085-2**, **A085-3**, definiert wie die Sonden im Vergleich zur Kontrollsonde reagieren (Schwellenwerte) und hat ein definiertes Herstellungs- und Verfallsdatum. Einzelne Sonden können in einigen Batches derselben Lot ausgeschaltet sein. Diese Information befindet sich auf der mitgelieferten lot-spezifischen CD (Hit Tables – Excel Datei).

### 3.5 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- MR.SPOT® Prozessor, [REF] 726100 oder MR.SPOT® 2.0 Prozessor, [REF] 726110
- HISTO MATCH Software, [REF] 726102
- Pipettenspitzen für den MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor, 1000 µl [REF] 726099 und 200 µl [REF] 726097
- Reagenzien zur DNA Isolation (keine Aussalzungsmethode)
- PCR Platten mit Rand und passende Deckel oder PCR-Folie (z.B. FrameStar® Break-A-Way PCR Plate [REF] 726220, HISTO SPOT® PCR Caps [REF] 726090, HISTO SPOT® PCR Foils [REF] 726089)
- Thermocycler
- Deionisiertes Wasser
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen

## 4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Die Kits werden ungekühlt versandt. Nach Erhalt müssen alle Reagenzien und Bestandteile der Kits bei 2...8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der jeweiligen Reagenzien angegeben und gilt für die ungeöffneten Verpackungen. Das auf dem Außenetikett angegebene Verfallsdatum bezieht sich auf den Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Die Typisierungskits müssen in der Zusammensetzung verwendet werden in der sie geliefert werden (d. h. Mastermix/ Magnesiumchloridlösung von einer Charge dürfen nicht mit einer anderen verwendet werden). Es wird empfohlen, die Kitkomponenten zusammen in der Originalverpackung zu lagern.

Einzelne Teststreifenpackungen aus den HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend und HISTO SPOT® Coeliac Disease Kits können geöffnet werden und die benötigte Anzahl Tests kann vom Teststreifen abgebrochen werden. Die unbenutzten Gefäße zurück in den Aluminiumbeutel legen und innerhalb von 30 Tagen verbrauchen. Es wird empfohlen, das Datum der Öffnung auf den Aluminiumbeuteln zu notieren. Die anderen Reagenzien sollten nach dem Öffnen innerhalb von drei Monaten verbraucht werden. Die Konjugat-Verdünnung muss für jeden Lauf frisch angesetzt werden.

## 5. TESTDURCHFÜHRUNG

### 5.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken und in Histokompatibilitätstestungen durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Tests dürfen nicht als alleinige Grundlage für klinische Entscheidungen verwendet werden.

Transplantationsrichtlinien und die Standards der European Federation of Immunogenetics (EFI) müssen berücksichtigt werden, um das Risiko falscher Typisierungen, insbesondere bei Diskrepanzen zwischen serologischen und molekulargenetischen Methoden, zu minimieren.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- ◆ prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- ◆ bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Hybridisierung, Detektion); möglichst zwei getrennte Räume nutzen
- ◆ Amplifikate sollten nicht zurück in den Prä-PCR Bereich gebracht werden.
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen.

## 5.2 DNA Isolation

Es wird empfohlen, bei der DNA-Isolation **CE** IvD zugelassene Extraktionskits zu verwenden. Sollte die bereits im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden, ist diese vom Kunden zu validieren. Nach Möglichkeit keine Aussalzungsmethode verwenden.

### Validierte DNA Extraktionsmethoden:

- Qiagen Säulen

### Erfolgreich in der Praxis angewendete Methoden:

- EZ-1 / Geno M6 (Qiagen Beads)
- Promega Maxwell 16
- QuatroProbe (BeeRobotics)

Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen. Es wird daher der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen. Für die HLA-Typisierung mit dem HISTO SPOT® SSO-System wird eine DNA-Konzentration von 15-30 ng/µl benötigt.

Die Reinheitsindices sollten sich im folgenden Bereich befinden:

- Extinktionsverhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$ :  $>1.5$  und  $<2.0$   
Höhere Werte deuten auf das Vorhandensein von RNA hin, niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen.
- Extinktionsverhältnis  $OD_{260}/OD_{230}$ :  $>1,8$   
Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln hin.

## 5.3 Amplifikation

### 5.3.1 HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend und HISTO SPOT® Coeliac Disease Kits

Es sollten PCR Platten mit Rand verwendet werden, da die Platten im MR.SPOT® Prozessor mit einer Klammer festgehalten werden, die auf dem Rand aufsetzt. Die **FrameStar® Break-A-Way PCR Plate** wurde für diese Anwendung validiert. PCR Gefäße anderer Hersteller müssen vom Anwender validiert werden. Für jede Probe werden die folgenden Reagenzien in ein PCR-Gefäß pipettiert:

- 10 µl** Mastermix
- 5 µl**  $MgCl_2$
- 5 µl** Proben DNA (15-30 ng/µl)

Das Reaktionsvolumen für jede Amplifikation beträgt 20 µl.

<u>Premix für mehrere Proben:</u>	Anzahl Proben +2	x	<b>10 µl</b> Mastermix	}	15 µl Premix pro Probe
	Anzahl Proben +2	x	<b>5 µl</b> $MgCl_2$		

**Hinweis:** Es ist wichtig, dass die Konzentration der DNA zwischen 15 und 30 ng/µl liegt. Höhere Konzentrationen können zu falsch-positiven Reaktionen der Sonden führen; niedrigere Konzentrationen zu Amplifikationsausfällen.

Wenn eine **Negativkontrolle** mitgeführt werden soll, eine PCR Reaktion mit destilliertem Wasser anstatt der Proben-DNA ansetzen.

Die PCR Gefäße mit Deckeln oder PCR Folie verschließen und die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugieren. Dann die PCR Gefäße in den Thermocycler stellen und unter den in Kapitel 5.3.3 genannten Bedingungen amplifizieren.

### 5.3.2 HISTO SPOT® On-Call Typing Kit

Für jeden Kombitest einen PCR Streifen mit vorgetropften Amplifikationsprimern **PCR Primers** aus dem Kühlschrank nehmen.

Für jede Probe einen Prämix aus folgenden Bestandteilen erstellen:

- 80 µl** PCR Puffer
- 40 µl** MgCl<sub>2</sub>
- 40 µl** Proben-DNA (15-30 ng/µl)

Jeweils 20 µl des Prämixes zu den vorgetrockneten Primern pipettieren und die Primer mit dem Prämix resuspendieren.

**Hinweis:** Es ist wichtig, dass die Konzentration der DNA zwischen 15 und 30 ng/µl liegt. Höhere Konzentrationen können zu falsch-positiven Reaktionen der Sonden führen; niedrigere Konzentrationen zu Amplifikationsausfällen.

Für die **Negativkontrolle** im Testgefäß 8 des **HISTO SPOT® On-Call Typing Kits** eine PCR Reaktion mit destilliertem Wasser anstatt der Proben-DNA ansetzen:

- 10 µl** PCR Puffer
- 5 µl** MgCl<sub>2</sub>
- 5 µl** H<sub>2</sub>O

Die PCR Streifen mit den mitgelieferten Deckeln verschließen, kurz abzentrifugieren, in den Thermocycler stellen und unter den in Kapitel 5.3.3 genannten Bedingungen amplifizieren.

### 5.3.3 PCR Programm

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	2 Min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	15 Sek	96°C	10 Zyklen
Annealing + Extension	60 Sek	65°C	
Denaturierung	10 Sek	96°C	20 Zyklen
Annealing	50 Sek	61°C	
Extension	30 Sek	72°C	
Hold	∞	22°C	

Die Bedingungen sind für alle Thermocycler dieselben, die benötigte Zeit für diesen Schritt kann jedoch in Abhängigkeit von der Heizrate des verwendeten Thermocyclers variieren.

Die folgenden Thermocycler Modelle wurden für HISTO SPOT® SSO validiert:

Applied Biosystems: PE 9600, PE 9700 (Heizrate wie PE 9600 verwenden), Veriti™

Biorad: PTC 100 / PTC 200, Mycycler

Eppendorf: Mastercycler EP Gradient S

Wenn andere Thermocycler verwendet werden, müssen diese vom Anwender validiert werden. Es wird generell empfohlen eine Heizrate von 1-2°C / Sekunde zu verwenden.

Nach der Amplifikation können die Proben sofort getestet oder bis zu 5 Tage bei 2...8°C gelagert werden. Die Amplikons nicht einfrieren. Es ist nicht notwendig, eine Amplifikationskontrolle auf einem Gel durchzuführen Diese ist auch nicht immer aussagekräftig, da die Ergebnisse nach der Hybridisierung gut sein können, auch wenn nur eine sehr schwache Bande im Gel erkennbar war. Wenn dennoch ein Gel gemacht werden soll, sollten nicht mehr als 2-3 µl des Amplikons dafür eingesetzt werden. Die Größe der Amplikate ist auf der Informations-CD angegeben, die jedem Kit beiliegt (Hit Table in Excel-Format: zweite Tabelle „Notes“).



## 5.4 Automatisierter Hybridisierungs-Assay auf dem MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor

### 5.4.1 Reagenzienvorbereitung

HISTO SPOT® Reagenzien und HISTO SPOT® Testgefäße aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur bringen.

Im Hybridisierungspuffer und in der stringenten Waschlösung können sich Salzkristalle bilden. Wenn dies der Fall ist, die komplette Lösung (kein Aliquot) auf 30°C erwärmen, um die Salzkristalle aufzulösen.

Das Konjugat 1:1666 in Blockingpuffer verdünnen. Die Konjugatverdünnung muss für jeden Lauf frisch angesetzt werden.

### Das Konjugat muss vor jedem Verdünnungsschritt gemixt und abzentrifugiert werden !

Die erforderlichen Mengen an Reagenzien variieren entsprechend der Anzahl getesteter Streifen. MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 zeigt die benötigten Volumina für die Reagenzien auf dem Bildschirm des Touchscreens an. Die angegebenen Volumina der benötigten Reagenzien in die entsprechend beschrifteten Vorratsgefäße füllen.

Die Testgefäße und die PCR Platte in die dafür vorgesehenen Blöcke des MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessors stellen. Dabei auf die richtige Ausrichtung der PCR Platte achten!

Bitte stellen Sie sicher, dass sich kein Schmutz oder Plastikteilchen im Reaktionsplattenhalter befinden, da diese die Temperaturübertragung während der Hybridisierung stören können.

Die Teststreifen aus den HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend und HISTO SPOT® Coeliac Disease Kits können entsprechend Abbildung 1 in einzelne Testgefäße geteilt werden, wenn weniger als 8 Tests benötigt werden. Bei der Verwendung von geteilten Streifen muss darauf geachtet werden, dass die Streifen gut im Reaktionsplattenhalter stehen und nicht gegeneinander verkantet sind.

Es muss sichergestellt sein, dass bei Verwendung von einzelnen Testgefäßen oder Kombistreifen Dummy-Gefäße in leeren Positionen eingefügt wurden (Anzahl der Testgefäße = Vielfache von vier)!

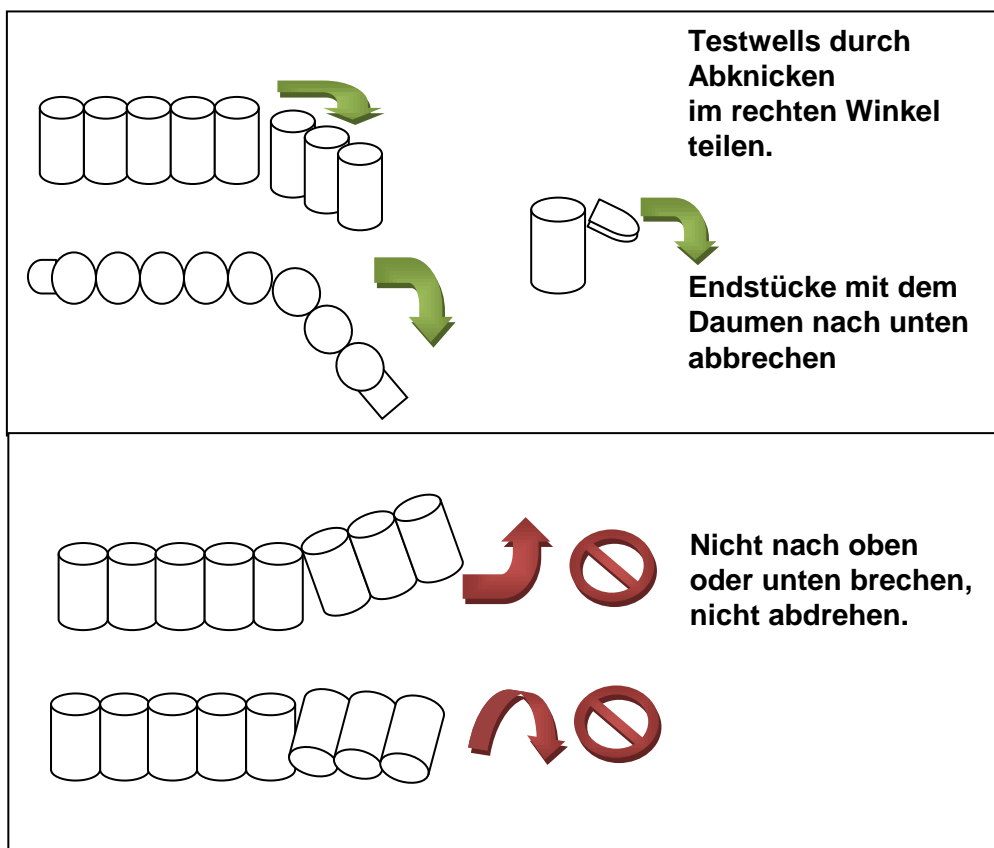


Abb. 1:  
Teststreifen teilen

**5.4.2 Start des MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor**

Den MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor anschalten. Daraufhin erscheint der Start-Bildschirm. Den Anweisungen auf dem Bildschirm folgen. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich im Benutzerhandbuch für den MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor.

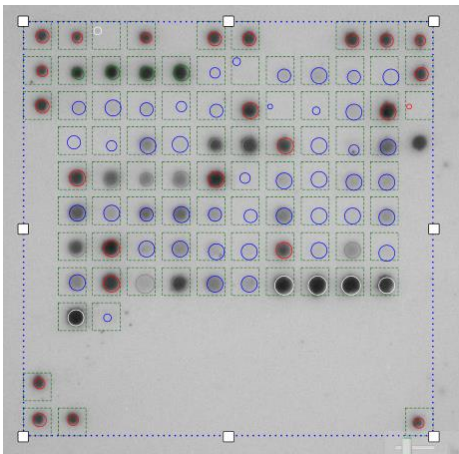
**Hinweis:** Der MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor und die Reagenzien sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.

**5.4.3 Transfer der Ergebnisse zu einem PC für die Interpretation**

Die Daten werden wie im Handbuch für die HISTO MATCH Software beschrieben entweder über ein Netzwerk oder mit Hilfe eines USB sticks in die Auswertesoftware transferiert.

**5.4.4 Interpretation der Ergebnisse**

Die HISTO MATCH Software öffnen und die Daten wie im Handbuch für die HISTO MATCH Software beschrieben auswerten. Die Installations-CD für die HISTO MATCH Software wird mit dem MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor geliefert. Die Bilder sollten aussehen wie in Abb. 2 dargestellt. Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Ergebnisse und die Funktion der verschiedenen Sonden.



Die Farbe der Kreise um die Sonden zeigt ihre Funktion an (siehe Gebrauchsinformation für die HISTO MATCH Software für weitere Informationen).

**Abb. 2: Foto eines Ergebnisses für HLA A**

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

●: Positionssonden: Diese Sonden reagieren mit den Amplifikationsprimern im Mastermix und zeigen an, dass Mastermix zugegeben wurde und dass alle Reagenzien im SSO Assay korrekt zugegeben wurden. Darüber hinaus erlauben sie der Software, die Bilder zu lokalisieren. Das Muster ist spezifisch für die Batch.

●+●: Amplifikationskontrollen für Exon 2 und Exon 3 als Duplikat. Diese Sonden sind universell für alle Allele des jeweiligen Genorts und zeigen an, dass die PCR erfolgreich war. Sie dienen außerdem als Referenz für die allelspezifischen Sonden.

●: Positive allelspezifische Sonde

○: Negative allelspezifische Sonde

**Abb. 3: Schematische Illustration der Ergebnisse und Funktion der Sonden**

## 6. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

HISTO SPOT® ist für den Gebrauch als In vitro Diagnostikum konzipiert und sollte nur von speziell ausgebildetem, qualifiziertem Personal verwendet werden. Alle Arbeiten sollten unter Berücksichtigung der guten Laborpraxis durchgeführt werden.

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut, sonstige Körperflüssigkeiten) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen.

Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Der Blockingpuffer, der Hybridisierungspuffer, die stringente Waschlösung und die TBS Waschlösung enthalten ProClin® 150, die Magnesiumchlorid Lösung enthält ProClin® 300. Die Reagenzien enthalten nur 0,001% des Konservierungsmittels. Trotzdem ist es ratsam, den Kontakt mit Haut und Schleimhäuten zu vermeiden.

Mastermix und Konjugat enthalten das Konservierungsmittel Natriumazid. Die Reagenzien enthalten < 0,1% Natriumazid. Diese Konzentration wird nicht als schädlich eingestuft. Trotzdem den Kontakt mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Natriumazid kann mit Blei und Kupferrohren reagieren und explosive Metallsalze bilden. Daher sollte bei der Entsorgung im Ausguss mit viel Wasser nachgespült werden.

Bei allen Arbeiten mit den Reagenzien sollten geeignete Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Beim Umgang mit den Reagenzien sollte Augenschutz, ein Laborkittel und Schutzhandschuhe getragen werden. Kontakt dieser Materialien mit der Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Berührung sofort mit viel Wasser waschen. Bei Nichtbehandlung können Verbrennungen auftreten.

Wenn Reagenzien verschüttet werden, vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen. Das Substrat nicht mit Metallen und oxidierenden Stoffen in Berührung bringen.

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots sollte vermieden werden. Der Gebrauch von sterilen Einmalpipetten und Pipettenspitzen wird empfohlen. Keine Reagenzien mit Trübung oder Anzeichen für mikrobielle Kontamination verwenden.

**Eine Erläuterung zu Sicherheitsdatenblättern (SDS)** kann unter [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com) heruntergeladen werden.

## 7. LEISTUNGSMERKMALE

### 7.1 Leistungsbewertung

Für alle HISTO SPOT® Kits wurden Leistungsstudien mit vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen einer anderen Typisierungsmethode (z.B. SSP, Sequenzierung) verglichen. Dabei sind keine Diskrepanzen aufgetreten. Für jedes Lot wurde die Spezifität der einzelnen Sonden mit Referenzproben überprüft.

### 7.2 PCR Amplifikation

Die mit dem jeweiligen HISTO SPOT® Kit amplifizierten Allele, die amplifizierten Exons und die zugrundeliegende HLA Nomenklatur-Version sind in den lotspezifischen Informationen auf der den Kits beiliegenden CD angegeben.

## 8. GRENZEN DER METHODE

Da die PCR Methode sehr anfällig auf Schwankungen der DNA Menge und Qualität reagiert, dürfen nur DNA Proben verwendet werden, die eine Konzentration zwischen 15 und 30 ng/µl haben und deren Reinheitsindices entsprechen ( $OD_{260}/OD_{280}$ : zwischen 1.5 und 2.0 /  $OD_{260}/OD_{230}$ : >1,8).

Es sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons oder DNA zu vermeiden. Die regelmäßige Durchführung von Wischtest (z.B. BAG Wischtest, [REF] 7091) und die Mitführung einer Negativkontrolle mit jedem Testlauf werden empfohlen.

Der Hybridisierungsschritt ist ein sehr temperatursensitiver Prozess. Daher dürfen die HISTO SPOT® Kits nur in Kombination mit dem MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor eingesetzt werden, um die Einhaltung der korrekten Temperaturen und Inkubationszeiten sicherzustellen.

Alle Geräte (z.B. Pipetten, Thermocycler, Heizblöcke, MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor) müssen entsprechen der Herstellervorgaben kalibriert werden. Die Genauigkeit und die Temperaturuniformität der Thermocycler können mit dem BAG CYCLER CHECK ([REF] 7104, 71044) überprüft werden.

## 9. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots der HISTO SPOT® SSO Kits können mit einer Kombination von DNA Proben mit bekannten HLA Typ durchgeführt werden.

Interne Positivkontrollen zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation und Hybridisierung sind in jedem Testgefäß enthalten.

Die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird eine PCR Reaktion ohne DNA angesetzt und im anschließenden Hybridisierungsassay als Negativkontrolle eingesetzt.

**10. PROBLEMBEHANDLUNG**

<b>Fehler</b>	<b>Mögliches Problem</b>	<b>Potentielle Lösung</b>
Fehlfunktion des MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessors	verschiedene	Siehe Manual für MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessor.
Fehlermeldung beim Datentransfer	Fehler beim Datentransfer	Daten manuell über einen USB Speicher übertragen.
Kein Ergebnis	Fehler bei automatischer Lokalisation der Spots im Bild	Manuelle Lokalisation der Spots durchführen .
Keine Punkte im Testgefäß	Kein Mastermix in der PCR	Test wiederholen und PCR Produkt in einem Gel überprüfen.
Nur die Kontrollsonden sind positiv	Keine DNA in der PCR oder Ausfall der Amplifikation	Test wiederholen und PCR Produkt in einem Gel überprüfen.
Falsch-positive Sonden	Zu viel DNA eingesetzt oder Konjugatkonzentration zu hoch (nicht zentrifugiert).	DNA Konzentration überprüfen, Konjugat vor dem Gebrauch abzentrifugieren.
Exonausfälle	DNA Konzentration zu hoch oder DNA fragmentiert	DNA Konzentration überprüfen, DNA auf einem Gel laufen lassen.
Kein Ergebnis / widersprüchliches Ergebnis aufgrund schwacher Signale	Fehler bei der Konjugat-Verdünnung oder schlechte Amplifikation / Fehlfunktion des MR.SPOT®/MR.SPOT® 2.0 Prozessors	Test wiederholen. Hybridisierungstemperatur am Gerät überprüfen.

**11. VERWENDETE MARKENNAMEN**






Proclin® ist ein Markenname der Firma Rohm und Haas.





BCIP® ist ein Markenname der Firma Sigma Aldrich Co.

Veriti™ ist ein Markenname der Firma Applied Biosystems.

FrameStar® fällt unter eines oder mehrere der folgenden US Patente oder deren Entsprechungen für andere Länder, die Eigentum der Eppendorf AG sind: US Patent Nos. 7, 347, 977 und 6, 340, 589. FrameStar® ist ein Markenname der Firma 4titude® Ltd.

**12. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN**

	In-vitro-Diagnostikum
	Lagertemperatur / Temperaturbegrenzung
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
	Bestell-Nr.

	Gebrauchsinformation beachten
	Elektronische Gebrauchsinformation
	Ausreichend für n Tests
	Hersteller
<b>HLA TYPING</b>	Zweckbestimmung: HLA-Typisierung
<b>Mastermix   A</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-A Genorts
<b>Mastermix   B</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-B Genorts
<b>Mastermix   C</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-C Genorts
<b>Mastermix   DRB1</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-DRB1 Genorts
<b>Mastermix   DQB1</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-DQB1 Genorts
<b>Mastermix   DQ</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-DQB1 und -DQA1 Genorts
<b>Mastermix   DPB1</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-DPB1 Genorts
<b>Mastermix   DP</b>	Mastermix zur Amplifikation des HLA-DPB1 und -DPA1 Genorts
<b>Mastermix   DRB3/4/5</b>	Mastermix zur Amplifikation der Genorte HLA-DRB3/4/5
<b>Mastermix   Coeliac</b>	Mastermix zur Amplifikation der Genorte HLA-DQB1 und DQA1
<b>Testwells   A</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-A
<b>Testwells   A Xtend</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-A
<b>Testwells   B</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-B
<b>Testwells   B Xtend</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-B
<b>Testwells   C</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-C
<b>Testwells   DRB1</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-DRB1
<b>Testwells   DRB1 Xtend</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-DRB1
<b>Testwells   DQB1</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-DQB1
<b>Testwells   DQ</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-DQB1 und DQA1
<b>Testwells   DPB1</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-DPB1
<b>Testwells   DP</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-DPB1 und DQA1
<b>Testwells   DRB3/4/5</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von HLA-DRB3/4/5
<b>Testwells   Coeliac</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung der Allele
<b>Combistrip</b>	Testgefäße mit gebundenen Sonden zur Typisierung von mehreren HLA-Genorten
<b>PCR Primers</b>	PCR Streifen mit getrockneten Primern zur Amplifikation von mehreren HLA-Genorten
<b>PCR Caps</b>	PCR Deckel

PCR Buffer	PCR Puffer
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid-Lösung
BLOCKBUF	Blockingpuffer
HYBBUF	Hybridisierungspuffer
STRGWASH	Stringente Waschlösung
TBSWASH	TBS Waschlösung (Tris buffered saline)
SUBS	BCIP® / NBT Substrat
CONJ	Konjugat, Streptavidin Alkalische Phosphatase
HISTO SPOT® INFORMATION CD	CD, enthält Gebrauchsinformationen, lotspezifische Auswertedateien, Reaktionsdiagramm und Sondeninformationen

### 13. LITERATUR

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)

**Instructions for use in other languages see <http://www.bag-healthcare.com>  
<http://service.bag-healthcare.com> or phone +49 (0)6404-925-125**