

**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](http://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 reagentie 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<sup>®</sup> 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 cyklu.

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 reagensie a přístroje nutné k provedení testu

- Reagensie 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 chladicími vložkami. Po přijetí je nutno skladovat veškeré reagenty při  $\leq -20$  °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 <sup>#</sup>

<sup>#</sup> 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](http://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 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
<b>Celkem</b>	<b>126</b>	<b>95</b>	<b>31</b>	<b>100</b>

Tabulka: Shrnutí interních a externích studií ukazující procento shody průkazu 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
<b>Špatný, nebo žádný signál</b>	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 reagensií díky nesprávnému uzavření reagenčních zkumavek.	Ujistěte se, že zkumavky jsou správně uzavřeny. Buďte opatrní na krajích přelepovací fólie.
<b>Signál v negativní kontrole</b>	DNA kontaminace negativní kontroly	Zopakujte negativní kontrolu. Dekontaminujte pracovní prostor.

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

TaqMan<sup>®</sup> 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
<b>HLA TYPING</b>	Zamýšlené užití: HLA typizace
<b>IFU</b>	Návod k použití
<b>IVD</b>	Pouze pro IN VITRO použití
<b>LOT</b>	Číslo šarže
<b>Q Primermix   B27</b>	Primermix pro typizaci HLA-B*27 pomocí soupravy HISTO TYPE B*27 Q
<b>Q Mastermix</b>	Mastermix pro soupravu HISTO TYPE B*27 Q
<b>REF</b>	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