

CZ**Návod k použití****FastQ B*27 direct**

Souprava k průkazu HLA-B*27 na molekulárně genetickém základě.

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

IVD**REF 728201 FastQ B*27 direct****CE****Obsah**

| | |
|--|---|
| 1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ | 2 |
| 2. POPIS VÝROBKU | 2 |
| 3. PRINCIP TESTU..... | 2 |
| 4. MATERIÁL..... | 2 |
| 4.1 Obsah soupravy FastQ B*27 direkt..... | 2 |
| 4.2 Doplnkové reagenty a přístroje nutné k provedení testu..... | 3 |
| 4.3 Validované cykly a reakční zkumavky..... | 3 |
| 5. SKLADOVÁNÍ A STABILITA..... | 3 |
| 6. PRŮBĚH TESTU | 4 |
| 6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky | 4 |
| 6.2 Příprava vzorku..... | 4 |
| 6.3 Amplifikace | 4 |
| 6.4 Interpretace výsledků..... | 5 |
| 6.5 Specificita soupravy | 6 |
| 7. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ | 6 |
| 8. SPECIFIKACE VÝKONNOSTNÍCH CHARAKTERISTIK..... | 7 |
| 9. OMEZENÍ METODY | 7 |
| 10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY | 8 |
| 11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ..... | 8 |
| 12. OCHRANNÉ ZNÁMKY POUŽITÉ V TOMTO DOKUMENTU A NA VÝROBCÍCH:..... | 9 |
| 13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH..... | 9 |
| 14. LITERATURA | 9 |

Změny oproti verzi 1/2019 jsou zvýrazněny žlutě.

Verze: 2/2020 / Publikováno: 2020-04

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

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

2. POPIS VÝROBKU

Souprava **FastQ B*27 direct** 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-B*27 je asociována s velmi vysokým rizikem onemocnění. U jedinců suspektních na Bechtěrevovu chorobu přispívá průkaz HLA-B*27 významně ke stanovení léčby pacienta. U 3% až 6% populace nesoucí gen HLA-B*27 se vyvine ankylozující spondylitida a více než 90% všech pacientů se séronegativní artritidou jsou nosiči tohoto genu. Souprava **FastQ B*27 direct** zahrnuje všechny běžné subtypy HLA-B*27. **Test může být provádět přímo z krve či buffy coatu bez izolace DNA.**

3. PRINCIP TESTU

Test využívá EDTA plnou krev nebo buffy coat jako základní materiál. DNA, která je uvolněna z lymfocytů, je namnožena v PCR se sekvenčně - specifickými primery (SSP). Primery byly specificky vyvinuty pro selektivní amplifikace exonu 2 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 specificitu reakce oproti klasické SSP.

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

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

4. MATERIÁL

4.1 Obsah soupravy FastQ B*27 direkt

- **260 µl Q Primermix B27-d**, připraven k použití, obsahuje primery a próby
- **600 µl Q Mastermix**, připraven k použití, obsahuje dNTP, Taq polymerázu, reakční pufr
- **130 µl Blood Booster**, připraven k použití, zabalen odděleně mimo soupravu*, **nezamrazujte!**
- **Návod k použití**

***) Při objednání soupravy FastQ B*27 direct dostanete automaticky i Blood Booster, REF 728209.**

4.2 Doplnkové reagensie a přístroje nutné k provedení testu

- Real -Time PCR cyklér (Biorad CFX96™ a odpovídající reakční zkumavky)
- Destilovaná voda
- Pipety (0,5 – 1000 µl) a špičky

4.3 Validované cykléry a reakční zkumavky

| Cyklér | RT-PCR reakční zkumavky | RT-PCR uzávěry |
|--|---|---|
| CFX96™ Real-Time PCR Detection System Comp. Bio-Rad | FrameStar® Break-A-Way PCR Plate 96 white wells, black frame Product No. 4ti-1201 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences | Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences qPCR Seal (Optically clear adhesive film) Product No. 4ti-0560 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences |

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

5. SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Q Primermix B27-d a Q Mastermix jsou dodávány při ≤ -20 °C. Po přijetí je nutno skladovat tyto reagensie při ≤ -20 °C v zařízeních s kontrolovanou teplotou. Blood Booster je dodáván při pokojové teplotě a musí být skladován po přijetí při 2...8°C – **Nezamrazujte Blood Booster!** Datum expirace je vyznačeno na etiketě každé reagensie. Datum expirace vyznačené na vnějším obalu soupravy odpovídá datu expirace té reagensie ze soupravy, která má dobu expirace nejkratší. Test opakovaného zamražení - rozmražení neukázal žádný vliv na kvalitu Q Primermix B27-d a Q Mastermix až do patnácti opakování.

6. PRŮBĚH TESTU

6.1 Bezpečnostní a speciální poznámky

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

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

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

6.2 Příprava vzorku

Jako materiál lze využít plnou EDTA krev, nebo buffy coat. Vzorek je třeba **dobře promíchat** a naředit následujícím způsobem:

→ ředění 1:50: **5 µl** plná krev / buffy coat + **245 µl** destilované vody.

6.3 Amplifikace

Je žádoucí používat reakční zkumavky doporučené výrobcem cykléru.

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

- 2 µl** Q Primermix B27-d
- 5 µl** Q Mastermix
- 1 µl** Blood Booster
- 1 µl** vzorek (naředěný 1:50 v destilované vodě)
- 1 µl** destilovaná voda.

Vzorky je nutno před vložením do cykléru důkladně promíchat!

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

Pokud připravujete premix z Q Primermix B27-d, Q Mastermix, Blood Booster a destilované vody pro více vzorků, nezapomeňte přidat rozumné množství navíc kvůli ztrátám při pipetování.

Pokud je požadováno zařadit do testování i negativní kontrolu, připravte PCR reakci s vodou místo se vzorkem 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.

Spustíte PCR program s následujícími parametry:

| Krok | Čas [s] | Teplota [°C] | Ramp rate [°C/s] | Odečítání desky | Počet cyklů |
|------------------------|---------|--------------|------------------|-----------------|-------------|
| Počáteční inicializace | 120 | 96 | 2,5 | - | 1 |
| Denaturace | 5 | 98 | 2,5 | - | 18 |
| Annealing + Extenze | 25 | 64 | 2,2 | - | |
| Denaturace | 5 | 98 | 2,5 | - | 42 |
| Annealing + Extenze | 25 | 64 | - | ano | |

6.4 Interpretace výsledků

Všechny testy, ve kterých je přítomna humánní genomická DNA (gDNA), musí vykazovat fluorescenční signál v zeleném kanálu (FAM) s vnitřní kontrolou. Vzorky pozitivní pro HLA B*27 musí navíc vykazovat pozitivní signál v oranžovém kanálu CAL Fluor Orange 560.

Amplifikační signál negativní kontroly (známý B*27 negativní vzorek) hodnoty C_q musí být mimo definovanou oblast pro kanál CAL Fluor Orange 560. Negativní kontrola (NTC) s destilovanou vodou by neměla vykazovat žádný fluorescenční signál v průběhu celé RT-PCR a slouží jako kontaminační kontrola. Fluorescenční signál v rozsahu definovaných C_q hodnot v negativní kontrole s destilovanou vodou je důkazem kontaminace. Fluorescenční signál mimo rozsah hodnot C_q může být způsoben díky vysoké citlivosti metody nesprávným pipetováním. V těchto případech by měl být test zopakován. Následně je třeba provést detailní analýzu chyby a případně dekontaminovat pracoviště a vyměnit reagenty.

Tyto signály jsou považovány za pozitivní:

| Specifita | Fluorofor | Hodnota C _q | Vlnová délka v nm |
|-------------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|
| B*27 pozitivní | CAL Fluor Orange 560 | < 30 | Excitace: 538 Emise: 559 |
| Vnitřní amplifikační kontrola (IAC) | FAM | < 20 | Excitace: 495 Emise: 520 |

Hodnota C_q definuje poslední hodnotu C_q, kdy je pozitivní reakce (fluorescence překročí práh) očekávána pro daný barevný kanál. Prah je automaticky stanoven softwarem CFX a měl by být použit jako základní práh.

Doporučuje zkontrolovat důvěryhodnost výsledků podle tvaru amplifikačních křivek a opakovat sporné testy. Pokud máte dotazy ohledně přizpůsobení prahu, nebo hraničních hodnot C_q kontaktujte prosím technickou podporu BAG Diagnostics na telefonním čísle +49 (0)6404 925125, nebo email: info@bag-diagnostics.com.

6.5 Specificita soupravy

Touto soupravou jsou rozpoznávány následující alely:

| Fluorofor | Hojné / Common* | Dobře dokumentované / Well documented* | Vzácné / Rare* |
|---|--|---|--|
| CAL Fluor Orange 560 (B*27 pozitivní) | B*27:02:01:01, *27:03, *27:04:01, *27:05:02:01, *27:06:01:01, *27:07:01, *27:08, | B*27:01, *27:05:03, *27:09, *27:10, *27:12, *27:14, *27:15, *27:17, *27:19:01:01, *27:20, *27:24, *27:27 | B*27:02:01:02-*27:02:01:05, *27:04:02- *27:04:06, *27:05:02:02- *27:05:02:20, *27:05:04-*27:05:46, *27:06:01:02, *27:07:02-*27:07:06, *27:11, *27:13,, *27:19:01:02, *27:21, *27:25, *27:26, *27:28, *27:30-*27:74, *27:76, *27:79- *27:84, *27:86-*27:91, *27:93 -*27:118, *27:120-*27:128, *27:130-*27:152, *27:154-*27:156, *27:158-*27:188, *27:190-*27:203, *27:205-*27:221 / B*44:97 |

podle IMGT databáze 3.38.0

* Hojné a dobře dokumentované alely podle CWD 2.0.0 katalogu (3)

7. VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

Soupravy **FastQ B*27 direkt** 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 testu (t.j. krví) je nutné zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Při manipulaci s biologickým materiálem doporučujeme odpovídající opatření (nepipetujte ústy, noste jednorázové rukavice při manipulaci se vzorkem i při provádění testu, dezinfikujte si ruce po provedení testu).

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

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

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

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

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

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

8. SPECIFIKACE VÝKONNOSTNÍCH CHARAKTERISTIK

Kombinace primerů a prób zaručuje přesnou identifikaci alel B*27 specifikovaných v kapitole 6.5. Přesnost a reprodukovatelnost testu je verifikována pro každou novou šarži pomocí referenčních vzorků se známým HLA typem.

Pro evaluační studii soupravy **FastQ B*27 direct** bylo použito 120 předem otypovaných vzorků, aby se ověřila specifita a senzitivita **Q Primermix B27-d v kombinaci s Q Mastermix**. Výsledky studie byly porovnány s výsledky dosaženými pomocí s dalších CE certifikovaných typizačních souprav (jako je SSP, SSO a sérologie) a/nebo sekvenováním. Nebyly pozorovány žádné diskrepance v detekci B*27 mezi různými typy testů (100% shoda).

| DNA vzorky | Interní a externí studie celkem | Procento shody [%] |
|---------------|---------------------------------|--------------------|
| B27 negativní | 101 | 100 |
| B27 pozitivní | 19 | 100 |
| Celkem | 120 | 100 |

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

Navíc byl na šesti pre-otypovaných vzorcích prokázán stabilizační efekt roztoku Blood Booster, a to zvláště u vzorků z čerstvé krve. Nebyly pozorovány žádné neshody ohledně určení HLA-B*27 a výrazně se snížila variance hodnoty Cq.

9. OMEZENÍ METODY

Protože RT-PCR je metoda vysoce citlivá na kontaminaci, je třeba dbát velké opatrnosti při extrakci DNA. Validační testy provedené v rámci evaluační studie soupravy **FastQ B*27direct** ukázaly, že míra ředění vzorků v rozmezí 1:100 až 1:25 nemá žádný zásadní vliv na průkaz alel B*27. Je nutno opravdu důkladně vzorky promíchat, aby byl dostatek buněk s jádrem přístupných pro PCR reakci. Pokud není promíchání dostatečné může dojít k falešně negativní reakci v barevném kanálu specifickém pro B*27.

Je třeba věnovat maximální pozornost zabránění kontaminace souprav a dalšího laboratorního materiálu a vybavení amplikony, DNA nebo krevními vzorky. 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 (Cq > N.A.). Pokud se signál při negativní kontrole (kanál FAM) objeví, je nutno dekontaminovat pracovní prostor pro PCR a v případě potřeby vyměnit reagenty.

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

10. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

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

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

11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ







| Projev | Možná příčina | Možné/á řešení |
|---|--|---|
| Špatný nebo žádný signál | Přítomnost inhibitoru. | Použijte čisté reagensie. |
| | V reakci není žádná gDNA. | Zopakujte test. Dbejte na správné pipetování. |
| | Špatné parametry amplifikace. | Zkontrolujte program PCR a ramp rate. |
| | Fluorescenční próby nebo primery jsou degradovány. | Použijte čerstvý Q primermix. Zabraňte osvětlení a častému zamrazování a rozmrazování. Zkontrolujte podmínky skladování! |
| | Bublínky v PCR reakčních zkumavkách / zbytky roztoku na vnitřních stěnách zkumavky. | Pečlivě pipetujte. Stočte PCR desku. |
| | Nekompatibilní nebo nekvalitní RT-PCR spotřební plast. | Použijte kompatibilní a vysoce kvalitní spotřební plast (viz kapitola 4.3). |
| | Špatný výpočet signálu z důvodu abnormálního signálu v počátečních cyklech běhu testu. | Použijte v softwaru opravný výpočet (např. "apply fluorescence drift correction" – funkce v systémech Bio-Rad, nebo vynechte prvních pět cyklů z analýzy. |
| Vypaření reagensů díky nesprávnému uzavření reagenčních zkumavek. | Ujistěte se, že zkumavky jsou správně uzavřeny. Zkontrolujte, zda těsní přelepovací fólie na krajích. | |
| Signál v negativní kontrole | DNA nebo krevní kontaminace v negativní kontrole | Zopakujte negativní kontrolu. Dekontaminujte pracovní prostor. |

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

TaqMan® je ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems Inc.

® Cal Fluor & Quasar Dyes jsou registrované obchodní značky společnosti LGC Biosearch Technologies

13. VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ NA ETIKETÁCH

| | |
|---|---|
|  | Dostatečné pro N testů |
|  | Teplota skladování / Spodní hranice teploty |
|  | Teplota skladování / Omezení teploty |
|  | Spotřebujte do |
|  | Viz návod k použití |
|  | Výrobce |
| BLOOD BOOST | Bood Booster, reagentie pro soupravy RT-PCR testovací soupravy pro detekce přímo z plné krve či z buffy coatu. |
| CONT | Obsah, obsahuje |
| GENOTYPING | Zamýšlené užití: Typizace lidských genetických markerů, které jsou asociovány s chorobami nebo farmakogenetickými reakcemi. |
| IFU | Návod k použití |
| IVD | Pouze pro in vitro použití |
| LOT | Číslo šarže |
| Q MASTERMIX | Mastermix pro RT-PCR soupravy pro detekci přímo z plné krve nebo buffy coatu |
| Q PRIMERMIX B27-d | Primermix pro typizaci HLA-B*27 pomocí soupravy FastQ B*27direct |
| REF | Katalogové číslo |

14. LITERATURA

1. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet i:904-907
2. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706
3. Mack et al., 2003, Tissue Antigens 81: 194-203

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