

SV

Bruksanvisning:

FastQ B*27

Testkit för bestämning av HLA-B*27 på molekylär genetisk grund

Elektroniska bruksanvisningar finns på www.bag-diagnostics.com

IVD**REF 728208 FastQ B*27****CE**

Innehåll

1. AVSEDD ANVÄNDNING.....	2
2. PRODUKTBEKRIVNING	2
3. TESTPRINCIPIP.....	2
4. MATERIAL.....	2
4.1 FastQ B*27-kitets innehåll.....	2
4.2 Övriga nödvändiga reagenser och utrustning.....	2
4.3 Godkända cyklers och reaktionsrör.....	3
4.4 Rekommendationer för icke-validerade cyklers och reaktionsrör	3
5. FÖRVARING OCH STABILITET	3
6. TESTPROCEDUR	4
6.1 Säkerhetsvillkor och särskilda anmärkningar	4
6.2 DNA-isolering.....	4
6.3 Amplifiering.....	4
6.4 Tolkning av resultat.....	6
7. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER.....	7
8. SPECIFIKA PRESTANDAEGENSKAPER	8
9. METODENS BEGRÄNSNINGAR.....	8
10. INTERN KVALITETSKONTROLL	9
11. FELSÖKNING.....	9
12. VARUMÄRKEN SOM ANVÄNDS I DETTA DOKUMENT/DENNA PRODUKT	9
13. FÖRKLARING AV SYMBOLER SOM ANVÄNDS PÅ ETIKETTERNA	10
14. LITTERATUR.....	10

Version: 5/2021/Utgiven: 2021-02**Ändringarna från version 4/2020 är gulmarkerade.**

1. AVSEDD ANVÄNDNING

FastQ-produkten är avsedd för genetisk testning på människor av markörer som är associerade med sjukdomar eller farmakogenetiska reaktioner. För FastQ B*27-testkitet innebär detta testning av förekomst av HLA-B*27-alleler som är associerade med vissa autoimmuna sjukdomar (se Produktbeskrivning).

2. PRODUKTBESKRIVNING

FastQ B*27-kitet används för molekylärgenetisk identifiering av HLA-B*27-alleler. Proteinet HLA-B27 är en variant av humant leukocytantigen-B (HLA-B). HLA-B27 är associerat med olika autoimmuna sjukdomar (Bechterews sjukdom eller ankyloserande spondylit, Reiters syndrom, reaktiv artrit) och används därför som en del av det diagnostiska förfarandet (1, 2). Ett positivt HLA-B*27-resultat är associerat med en mycket hög sjukdomsrisk. I misstänkta fall av Mb Bechterew utgör en HLA-B*27-diagnos ett viktigt bidrag till patientens behandling. Omkring 3 % till 6 % av de personer som bär HLA-B*27-genen utvecklar ankyloserande spondylit, och mer än 90 % av alla patienter med seronegativ artrit är bärare av denna gen.

FastQ B*27-kitet identifierar alla vanliga HLA-B*27-undertyper. Dessutom skiljer den mellan de sjukdomsassocierade allelerna och subtyperna HLA-B*27:06 och HLA-B*27:09, vilka inte är associerade med ankyloserande spondylit (3).

3. TESTPRINCIPIP

Testet utförs med genomiskt DNA som startmaterial. DNA-provet amplifieras i en PCR med sekvensspecifika primers (SSP). Primrarna utvecklades för selektiv amplifiering av specifika sekvenser i exonerna 2 och 3 i HLA-B*27-genen, vilka endast identifierar B*27-undertyper. Amplikonerna detekteras också med genlokusspecifika fluorescerande färgmärkta hydrolyspröber (TaqMan[®]-prober), vilket ökar testets diagnostiska sensitivitet och specificitet jämfört med en konventionell SSP.

Vid förekomst av amplikoner hydrolyseras problemen av Taq-polymeraset, och en fluorescenssignal genereras som ökar proportionellt mot mängden av PCR-produkten. Fluorescenssignalerna mäts av den optiska detekteringsenheten för RT-PCR-Cycler.

Testet utförs i en enda PCR-reaktion som detekterar den inre positiva kontrollen (human HBB-gen), sjukdomsassocierade undertyper och icke sjukdomsassocierade undertyper med olika fluorescerande färger.

4. MATERIAL

4.1 FastQ B*27-kitets innehåll

- **260 µl Q Primermix B27**, färdigt att använda, innehåller primers och prober
- **260 µl Q Plex Mix**, färdigt att använda, innehåller dNTP:er, Taq-polymeras, reaktionsbuffert
- **Bruksanvisning**

4.2 Övriga nödvändiga reagenser och utrustning

- Reagenser för DNA-isolering (validerade DNA-isoleringssatser, se 6.2)
- Realtids-PCR-Cycler (validerad cykler, se 4.3)

- RT-PCR-reaktionsrör med lock eller folie (godkända produkter, se 4.3)
- Dest. vatten
- Kolvpipetter (0,5–1000 µl) och spetsar
- Färgkompenseringsats för LightCycler® 480 II (tillhandahålls av BAG Diagnostics)

4.3 Godkända cyklers och reaktionsrör

Cykler	RT-PCR-reaktionsrör	RT-PCR-stängningssystem
CFX96™ Real-Time PCR Detection System Comp. Bio-Rad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate 96 white wells, black frame Art.nr 4ti-1201 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences	4titude Crystal Strips, Art.nr 4ti-0755 Optiskt klar självhäftande film, artikelnr 4ti-0560 Comp. 4titude/Brooks Life Sciences

Anmärkning: Om andra realtidscyklers, reaktionsrör och stängningssystem används måste de valideras av användaren.

4.4 Rekommendationer för icke-validerade cyklers och reaktionsrör

För de cyklers som nämns nedan har inledande tester utförts men ingen fullständig validering. Tabellen innehåller de rekommenderade specifikationerna.

Cykler	RT-PCR-reaktionsrör	RT-PCR-stängningssystem
LightCycler® 480 System, Comp. Roche	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, vit, artikelnr 04729692001, Comp. Roche	LightCycler® 480 Sealing Foil, artikelnr 04729757001 Comp. Roche
MIC (Magnetic Induction Cycler) Comp. Bio Molecular Systems	Rör och lock: MIC-TUBES nr 68MIC-60653 Exklusiv distributör (D/A): Comp. Biozyme	
Rotor-Gene Q Comp. Qiagen	Striprör och lock, 0,1 ml, Kat-nr/ID: 981103 eller 981106, Comp. Qiagen	
Lightcycler 2.0 Comp. Roche	ej tillämpligt	

5. FÖRVARING OCH STABILITET

Kiten **transporteras kylpackat**. Efter mottagandet ska alla reagenser förvaras i temperaturövervakade enheter vid ≤ -20 °C. Utgångsdatumet anges på etiketten för varje reagens. Det utgångsdatum som anges på den yttre etiketten avser det reagens som har den kortaste stabiliteten i kitet. Testet av frysnings- och upptiningscykeln har visat att upp till **12** cykler för Plex Mix och upp till 15 cykler för Q Primermix B27 inte har några skadliga effekter på kitets kvalitet. Det finns ännu inga data för fler cykler. Därför rekommenderar vi att reagenserna alikvoterar om det behövs.

6. TESTPROCEDUR

6.1 Säkerhetsvillkor och särskilda anmärkningar

Molekylärgenetiska tekniker är särskilt känsliga och bör utföras av välutbildad personal med erfarenhet av dessa tekniker. Resultaten av dessa tester får inte användas som enda grund för kliniska beslut.

Särskilda säkerhetsvillkor måste iakttas för att undvika kontaminering och därmed falska reaktioner:

- ◆ Använd handskar under arbetet (puderfria, om möjligt).
- ◆ Använd nya spetsar vid varje pipetteringssteg (med integrerat filter).
- ◆ Använd om möjligt separata arbetsområden för föramplifiering (DNA-isolering och PCR-förberedelse) och efteramplifiering (detektion).
- ◆ Använd enheter och annat material endast på deras respektive platser och byt inte plats på dem.

6.2 DNA-isolering

Provmaterialet för isolering av genomiskt DNA måste sändas i lämpliga blodinsamlingssystem. För testet krävs EDTA eller citratblod. Förekomst av heparin kan hämma PCR, och därför är blodinsamlingssystem med heparin inte lämpliga (4) och får inte användas.

Vi rekommenderar användning av CE IVD-certifierade kit för DNA-isolering.

Godkända DNA-isoleringssatser:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (columns)
- Chemagic™ 360 (chemagic DNA Blood Kit, beads)

Om laboratoriets etablerade standardmetod används för gDNA-isolering och detta inte är en av de validerade satserna ovan, måste den valideras av användaren.

En DNA-koncentration på 10–20 ng/μl krävs för att utföra FastQ B*27-testet.

DNA:t måste ha följande renhetsindex:

- $OD_{260}/OD_{280} = > 1,5$ och $< 2,0$
Högre värden är en indikator för kontaminering med RNA, lägre värden för kontaminering med proteiner.
- $OD_{260}/OD_{230} = > 1.8$
Lägre värden indikerar en kontaminering med salt, kolhydrater eller organiska lösningsmedel.

6.3 Amplifiering

Reaktionsrör som rekommenderas av realtidscyklerns tillverkare eller de material som rekommenderas i kapitel 4.3 bör användas.

För varje prov ska följande reagenser pipetteras i ett reaktionsrör:

- 2 μl** Q Primermix
- 2 μl** Plex Mix
- 1 μl** Prov-DNA (10–20 ng/μl)
- 5 μl** Dest. vatten

Reaktionsvolymen för varje RT-PCR-test är 10 µl.

Rekommenderade undantag

Rotor-Gene Q Cyclers

Om Rotor-Gene Q-cyklern används måste en högre reaktionsvolym användas. Reaktionsvolymen måste ställas in på 20 µl i cyklerns inställningar.

Det finns tre möjligheter för PCR-proceduren:

- Använd den dubbla mängden av de volymer som anges ovan, vilket resulterar i en reaktionsvolym på 20 µl.
- Tillsätt ytterligare 5 µl destillerat vatten (15 µl totalt).
- Fyll på PCR-blandningen med 5 µl mineralolja (totalt 15 µl).

Lightcycler 2.0

Om Roche LC 2.0 Cyclers används är det nödvändigt att använda en referensfärg (ROX) för att instrumentet ska kunna identifiera reaktionsrören (kapilläerna).

Den slutliga koncentrationen i reaktionsvolymen på 10 µl måste vara 120 nM. Vi rekommenderar att volymen med destillerat vatten (5 µl) ersätts med respektive förspädning av ROX (240 nM).

Om en förblandning av Q Primermix, Plex Mix och destillerat vatten bereds för mer än ett prov, bered en rimlig ytterligare mängd för pipetteringsförluster.

Om en **negativ kontroll (NTC)** ska utföras, preparera en PCR-reaktion med destillerat vatten istället för DNA.

Förslut reaktionsrören och centrifugera snabbt ned vätskan. Kontrollera att det inte finns några bubblor i brunnarna. Om bubblor observeras, knacka försiktigt på bänken så att bubblorna försvinner. Starta PCR-programmet med följande parametrar:

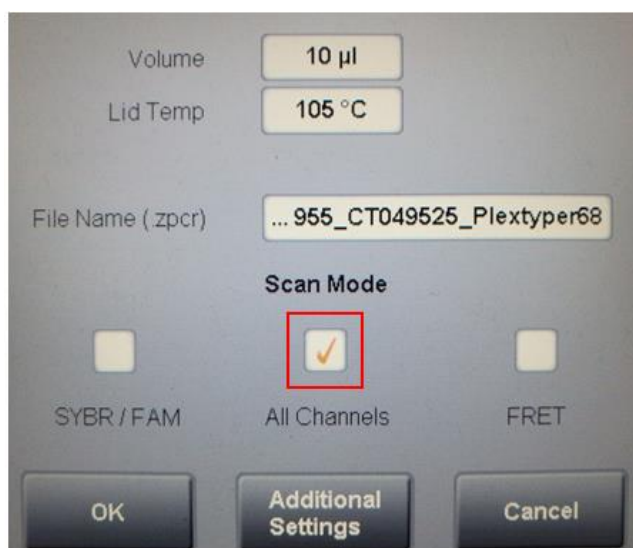
Steg	Tid [s]	Temperatur [°C]	Ramphastighet [°C/s]	Plattavläsning	Cykler
Initial aktivering	120	96	2,5	-	1
Denaturering	5	98	2,5	-	13
Annealing + förlängning	25	68	2,2	-	
Denaturering	5	98	2,5	-	37
Annealing + förlängning	25	68	-*	ja	

* använd standard ramphastigheten för CFX96™ Real-Time PCR Detection System

Följande realltidscyklers har validerats för **FastQ B*27**-kitet:

Biorad: CFX96™ Real-Time PCR Detection System: använd standardinställningarna

OBS! Innan programmet startas använd korrekt "Scan Mode": All channels (Alla kanaler). Om felaktig "Scan Mode" används kan inte testen tolkas och måste göras om. Temperaturen för locket måste vara inställt på 105 °C.



Rekommendation för testade men ej validerade cyklermaskiner:

- Om systemet LightCycler® 480 II används måste en "färgkompensering" utföras (tillhandahålls av BAG Diagnostics).
- Om Rotor-Gene Q-cyklern används måste reaktionsvolymen ställas in på 20 µl i cyklerns inställningar. Funktionen "Use noise slop correction" kan användas för dataanalys.

6.4 Tolkning av resultat

Alla tester med humant gDNA måste visa en fluorescenssignal i den gröna kanalen (FAM) med den interna kontrollen. Prover som är HLA B*27-positiva visar en positiv signal i kanalen för CAL Fluor Orange 560. Den röda kanalen (CAL Fluor RED 610) ger positiva signaler med de oberoende detekterade allelerna B*27:06 och B*27:09.

Fluorofor	Vanlig	Väldokumenterad	Sällsynt
CAL Fluor Orange 560 (B*27-positiv)	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

CAL Fluor Red 610 (B*27:06-, *27:09-positiv)	B*27:06:01:01	B*27:09	B*27:06:01:02, *27:41, *27:91, *27:106, *27:136, *27:154, *27:192, *27:208 / B*15:129, B*15:395 / B*18:02:01, B*18:179
---	---------------	---------	--

(IMGT Database 3.38.0).

Amplifieringssignalerna för de negativa kontrollerna (B*27-negativa) bör ligga utanför de definierade Cq-värdena för båda kanalerna. En negativ kontroll med dest. vatten ska inte visa någon fluorescerande signal under hela RT-PCR-körningen och representerar en kontamineringskontroll. Fluorescenssignaler inom de definierade Cq-värdena med den negativa kontrollen med dest. vatten indikerar kontaminering. Fluorescenssignaler utanför de definierade Cq-värdena kan uppstå på grund av den mycket känsliga testmetoden vid felaktig pipettering. Om detta inträffar bör testet upprepas.

Följande signaler bedöms som positiva:

	Fluorofor	Cq-värde	Våglängd i nm
Intern positiv kontroll	FAM	≤ 20	Excitering: 495 Emission: 520
B*27-positiv	CAL Fluor Orange 560 (HEX)	≤ 25	Excitering: 538 Emission: 559
B*27:06-positiv B*27:09-positiv	CAL Fluor Red 610 (RED)	≤ 20	Excitering: 590 Emission: 610

OBS! Om "Auto Calculated Baseline Threshold" används för tolkning med CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System kan små utslag i fluorescenssignalerna betraktas som positiva signaler av mjukvaran och en Cq ges. Kontrollera kurvornas s-form och justera den färgspecifika tröskeln under tolkning.

7. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FastQ B*27-kitet är avsett för in vitro-diagnostiskt bruk och bör endast användas av utbildad och behörig personal. Allt arbete ska utföras enligt god laboratoriepraxis.

Biologiskt material som används för utvinning av DNA, t.ex. blod, bör hanteras som potentiellt smittat. Vid hantering av biologiskt material rekommenderas lämpliga säkerhetsåtgärder (pipettera inte med munnen; använd engångshandskar vid hantering av biologiskt material och utförande av testet; desinficera händerna när testet är klart).

Biologiskt material bör inaktiveras före kassering (t.ex. i en autoklav). Engångsartiklar ska autoklaveras eller brännas efter användning.

Spill av potentiellt smittat material bör omedelbart avlägsnas med pappershanddukar och de förorenade områdena svabbas med ett lämpligt standarddesinfektionsmedel eller 70-procentig alkohol.

Material som använts för att rengöra spill, inklusive handskar, ska inaktiveras (t.ex. i en autoklav) innan det kasseras.


Kassering av alla prover, oanvända reagenser och avfall bör ske i enlighet med landets statliga och lokala föreskrifter.

Mikrobiell kontaminering av reagenser under alikvotering bör undvikas. Vi rekommenderar användning av sterila envägspipetter och -spetsar. Reagenser som ser grumliga ut eller uppvisar tecken på mikrobiell kontaminering får inte användas.

Ett informationsblad om materialsäkerhet respektive en deklaration om materialsäkerhetsdatablad (MSDS) finns att ladda ner på www.bag-diagnostics.com.

8. SPECIFIKA PRESTANDAEGENSKAPER

Kombinationen av primers och prober säkerställer en tillförlitlig identifiering av de B*27-alleler som anges i kapitel 6.4. Noggrannheten och reproducerbarheten hos testkitets specificitet verifieras för varje batch med i förväg typade referensprover.


För FastQ B*27-kitets prestandastudier utfördes totalt 95 i förväg typade DNA-prover. Resultaten från studien jämfördes med de resultat som  erhöles med andra certifierade typningsreagenser (bland annat serologi, SSO, SSP) och/eller ekvensering. Inga avvikelser i detektering av B*27-funktionen har observerats (100 % överensstämmelse).

DNA-prover	Intern studie totalt	Procentuell överensstämmelse [%]
B27-negativ	84	100
B27-positiv	11	100
Totalt	95	100

Sammanfattning av de interna undersökningsresultaten med procentuell överensstämmelse med referenstypning och detektering av B*27

9. METODENS BEGRÄNSNINGAR

På grund av RT-PCR-metodens höga känslighet för korskontaminering bör särskild noggrannhet iakttas vid DNA-isolering. Valideringstester under prestandautvärderingsstudien av FastQ B*27-kitet har visat att en variation av den mängd DNA som används för amplifiering mellan 2 ng och 50 ng inte har någon betydande inverkan på detekteringen av B*27-alleler.

Extrem försiktighet bör iakttas för att förhindra kontaminering av kitets reagenser och andra laboriematerial och utrustning med amplikoner eller DNA. Regelbundna torkningstester (t.ex. BAG Wipe Test,  7091) och negativa kontroller med destillerat vatten med varje prov rekommenderas starkt.

I den negativa kontrollen med destillerat vatten får det inte finnas någon fluorescerande signal (Cq > N.A.). Vid signalutveckling i den negativa kontrollen (FAM-kanal) måste PCR-arbetsplatsen dekontamineras och reagenserna bytas ut vid behov.

Alla instrument (t.ex. pipetter, realtidscyklar) måste kalibreras enligt tillverkarens instruktioner.

10. INTERN KVALITETSKONTROLL

Intern kvalitetskontroll av nya batcher av FastQ B*27-kitet kan utföras med hjälp av en kombination av DNA-prover med känd HLA-typ. En intern positiv kontroll för framgångsrik amplifiering ingår i Q Primermix. Negativa kontroller för att upptäcka eventuell kontaminering rekommenderas. Använd en PCR-reaktion utan DNA (NTC) för detta ändamål.






11. FELSÖKNING

Symptom	Möjlig orsak	Möjlig lösning
Dålig eller ingen signal	Förekomst av en hämmare.	Använd färska reagenser.
	Inget gDNA i reaktionen.	Upprepa testet. Var noga med korrekt pipettering.
	Felaktiga amplifieringsparametrar.	Kontrollera PCR-program och ramphastighet.
	Kontaminerat eller skadat DNA.	Kontrollera DNA-koncentration och -kvalitet. Kontrollera DNA på en gel. Upprepa DNA-isolering.
	Fluorescerande prober eller primers skadade.	Använd färsk Q Primermix. Undvik ljusexponering och återkommande upptining och nedfrysning. Följ förvaringsreglerna!
	Bubblor i PCR-reaktionen, kvarvarande vätska på rörets innervägg.	Noggrann pipettering. Centrifugera ner PCR-plattan.
	Inkompatibla eller lågkvalitativa RT-PCR-plastmaterial.	Använd kompatibla och högkvalitativa plastmaterial (se kapitel 4.3).
	Felaktig signalberäkning på grund av onormala amplifieringssignaler under de inledande cyklerna i körningen.	Tillämpning av korrigerande åtgärder i programvaran (t.ex. funktionen "apply fluorescence drift correction" från Bio-Rad eller exkludering av de första fem cyklerna från analysen).
	Avdunstning av reagens på grund av felaktig förslutning av PCR-rören.	Se till att PCR-rören är ordentligt förslutna. Var noga med tätningsfoliens kanter.
Signal i den negativa kontrollen	Kontaminering med DNA i den negativa kontrollen	Upprepa den negativa kontrollen. Dekontaminera arbetsplatsen.

12. VARUMÄRKEN SOM ANVÄNDS I DETTA DOKUMENT/DENNA PRODUKT

TaqMan® är ett varumärke som tillhör Roche Molecular Systems Inc.

13. FÖRKLARING AV SYMBOLER SOM ANVÄNDS PÅ ETIKETTERNA

	Räcker till n tester
	Förvaringstemperatur/nedre temperaturgräns
	Använd före
	Läs bruksanvisningen
	Tillverkare
CONT	Innehåll, innehåller
GENOTYPING	Avsedd användning: Typning av mänskliga genetiska markörer som associeras med sjukdomar eller farmakogenetiska reaktioner
IFU	Bruksanvisning
IVD	För in vitro-diagnostiskt bruk
LOT	Batchkod
Q PRIMERMIX B27	Primermix för typning av HLA-B*27 med FastQ B*27-kitet
PLEX MIX	MasterMix för RT-PCR
REF	Katalognummer

14. LITTERATUR

1. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet i:904-907
2. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706
3. Khan, MA et al., 2007. Autoimmunity Reviews 6: 183-189
4. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

För bruksanvisningar på andra språk, se

<http://www.bag-diagnostics.com> eller kontakta oss direkt på info@bag-diagnostics.com eller telefon +49 (0)6404-925-125