

SV

Bruksanvisning:

FastQ B*27 direct

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

Elektroniska bruksanvisningar finns på www.bag-diagnostics.com

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

Innehåll

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

Ändringarna från version 1/2019 är gulmarkerade.

Version: 2/2020 / Utgiven: 2020-04

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 direct-testkitet innebär detta bestämning av förekomst av HLA-B*27-alleler som är associerade med vissa autoimmuna sjukdomar (se Produktbeskrivning).

2. PRODUKTBESKRIVNING

FastQ B*27 direct-kitet används för molekylärgenetisk identifiering av HLA-B*27-alleler. Proteinet HLA-B27 är en variant av humant leukocytantigen-B (HLA-B). HLA-B27-proteinet 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 direct-kitet** identifierar alla vanliga HLA-B*27-undertyper. **Testet kan utföras utan DNA-isolering direkt från blod eller buffy-coat.**

3. TESTPRINCIP

Testet utförs med EDTA-helblod eller buffy-coat som utgångsmaterial. Det DNA som frigörs från lymfocyterna amplifieras i en PCR med sekvensspecifika primers (SSP). Primrarna är särskilt framtagna för selektiv amplifiering av exon 2 i HLA-B*27-genen, som endast identifierar B*27-undertyperna. Amplikonerna detekteras också med genlokusspecifika fluorescerande färgmärkta hydrolysprober (TaqMan[®]-prober), vilket ökar testets diagnostiska sensitivitet och specificitet jämfört med en konventionell SSP.

Vid förekomst av amplikoner hydrolyseras proberna 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 interna positiva kontrollen (human HBB-gen) och icke sjukdomsassocierade undertyper med olika fluorescerande färger.

4. MATERIAL

4.1 FastQ B*27 direct-kitets innehåll

- 260 µl Q Primermix B27-d, färdigt att använda, innehåller primers och prober
- 600 µl Q Mastermix, färdigt att använda, innehåller dNTP:er, Taq-polymeras, reaktionsbuffert
- 130 µl Blood Booster, färdigt att använda, förpackat separat*, får inte frysas!
- Bruksanvisning

*) Vid beställning av ett FastQ B*27 direct-kit medföljer även Blood Booster, **REF** 728209.

4.2 Övriga nödvändiga reagenser och utrustning

- Real-Time PCR-Cycler (Biorad CFX96™ och matchande reaktionsrör)
- Dest. vatten
- Kolvpipetter (0,5–1000 µl) och spetsar

4.3 Godkända cyklers och reaktionsrör

Cyklar	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 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences	Crystal Strips, Art.nr 4ti-0755 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences qPCRSeal (Optiskt klar självhäftande film) Art.nr 4ti-0560 Comp. 4titude / Brooks Life Sciences

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

5. FÖRVARING OCH STABILITET

Q Primermix B27-d och Q MasterMix transporteras vid ≤ -20 °C. Efter mottagandet ska dessa reagenser förvaras i temperaturövervakade enheter vid ≤ -20 °C. Blood Booster levereras vid rumstemperatur och förvaras efter mottagandet vid 2–8 °C – **Blood Booster ska inte frysas.**

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 frysning- och upptiningscykeln har visat att upp till 15 cykler inte har några skadliga effekter på kvaliteten hos Q Primermix B27-d och Q MasterMix.

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 (pudrefria, 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 Provberedning

EDTA-helblod eller buffy-coat måste användas som provmaterial. Proverna **måste blandas noggrant** och spädas enligt följande:

→ Spädning 1:50: **5 µl** helblod/buffy-coat + **245 µl** A.dest.

6.3 Amplifiering

Reaktionsrör som rekommenderas av realtidscyklerns tillverkare bör användas.

För varje prov ska följande reagenser pipetteras i ett reaktionsrör:

2 µl Q Primermix B27-d
5 µl Q Mastermix
1 µl Blood Booster
1 µl Provmaterial (spätt 1:50 i A.dest)
1 µl Dest. vatten

Proverna måste blandas ordentligt innan testet startas!

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

Om en förblandning av Q Primermix B27-d, Q Mastermix, Blood Booster 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 provmaterial.

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]	Plåtavläsning	Cyklar
Initial aktivering	120	96	2,5	-	1
Denaturering	5	98	2,5	-	18
Annealing + förlängning	25	64	2,2	-	
Denaturering	5	98	2,5	-	42
Annealing + förlängning	25	64	-	ja	

6.4 Tolkning av resultat

Alla tester med fritt 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.

Amplifieringssignalerna för de negativa kontrollerna (kända B*27-negativa prover) bör ligga utanför de definierade Cq-värdena för CAL Fluor Orange 560-kanalen. En negativ kontroll (NTC) 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. Dessutom rekommenderas en detaljerad analys. Vid behov måste PCR-arbetsplatsen dekontamineras och reagenserna bytas ut.

Följande signaler bedöms som positiva:

Specificitet	Fluorofor	Cq-värde	Våglängd (nm)
B*27	CAL Fluor Orange 560	< 30	Excitering: 538 / Emission: 559
Intern amplifieringskontroll (IAC)	FAM	< 20	Excitering: 495 / Emission: 520

Cq-nivån definierar det senaste Cq-talet när en positiv reaktion (fluorescens stiger över tröskelvärdet) förväntas i respektive kanal. Det tröskelvärde som automatiskt ställs in av CFX-programvaran ska användas som baslinjetröskel.

Vi rekommenderar en kontroll av om reaktionerna är rimliga med amplifieringskurvorna och upprepad testning av resultat som kan ifrågasättas. Vid frågor om anpassning av tröskelvärdena eller Cq-gränsvärdena, kontakta teknisk support hos BAG Diagnostics (telefon: +49 (0)6404 925125, e-post: info@bag-diagnostics.com).

6.5 Kitets specificitet

Följande alleler identifieras av kitet:

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

IMGT Database 3.38.0

* Vanlig och väldokumenterad allel från CWD 2.0.0-katalogen (3)

7. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

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

Biologiskt material som används för provet, 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 % 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.baq-diagnostics.com.

8. SPECIFIKA PRESTANDAEGENSKAPER

Kombinationen av primers och prober säkerställer en tillförlitlig identifiering av de B*27-alleler som anges i kapitel 6.5. Noggrannheten och reproducerbarheten hos testsatsens specificitet verifieras för varje batch med i förväg typade referensprover.

För utvärderingsstudier av **FastQ B*27 direct**-kitets effektivitet med totalt 120 i förväg typade blodprover utfördes för att definiera den diagnostiska sensitiviteten och specificiteten hos **Q Primermix B27-d i kombination med Q Mastermix**. Resultaten från studierna jämfördes med de resultat som erhöles med andra CE certifierade typningsreagenser (bland annat serologi, SSO, SSP) och/eller sekvensering. Inga avvikelser i detekteringen av B*27-funktionen har observerats (100 % överensstämmelse).

Blodprover	Intern och extern studie totalt	Procentuell överensstämmelse [%]
B27-negativ	101	100
B27-positiv	19	100
Totalt	120	100

Tabell: Sammanfattning av de interna och externa undersökningsresultaten för Q Primermix B27-d med procentuell överensstämmelse med referenstypning och detektering av B*27

Dessutom har den stabiliserande effekten av Blood Booster, särskilt på färsk blodprov, visats med sex i förväg typade blodprov. Inga avvikelser observerades för HLA-B*27-funktionen och variansen i Cq-värdena kunde minskas avsevärt.

9. METODENS BEGRÄNSNINGAR

På grund av RT-PCR-metodens höga känslighet för korskontaminering bör särskild noggrannhet iaktas vid provets beredning. Valideringstester under prestandautvärderingsstudien av **FastQ B*27 direct**-kitet har visat att en provspädning på mellan 1:100 och 1:25 inte har någon betydande inverkan på detekteringen av B*27-allelerna. Det bör kontrolleras att provmaterialet blandas grundligt för att säkerställa att det finns tillräckligt med celler med kärnor för PCR-reaktionen. Om detta inte görs kan det förekomma falska negativa resultat i den B*27-specifika färgkanalen. Extrem försiktighet bör iaktas för att förhindra kontaminering av kitets reagenser och andra laboriematerial och utrustning med amplikoner, DNA eller blodprover. Regelbundna torkningstester (t.ex. BAG Wipe Test, [REF](#) 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 (grön kanal/FAM) måste PCR-arbetsplatsen dekontamineras och reagensen bytas ut vid behov.

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

10. INTERN KVALITETSKONTROLL

Intern kvalitetskontroll av nya batcher av **FastQ B*27 direct**-kitet kan utföras med hjälp av en kombination av 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 provmaterial (NTC) för detta ändamål.

11. FELSÖKNING







Symptom	Möjlig orsak	Möjlig lösning
Dålig eller ingen signal	Förekomst av en hämmare	Använd färsk reagenser
	Inget gDNA i reaktionen	Upprepa testet Var noga med korrekt pipettering och spädning av blodproven
	Felaktiga amplifieringsparametrar	Kontrollera PCR-program och ramphastighet
	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
	Inkompatibel eller lågkvalitativ RT-PCR-plastutrustning	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.

® Cal Fluor & Quasar Dyes är registrerade varumärken som används av företaget LGC Biosearch Technologies

13. FÖRKLARING AV SYMBOLER SOM ANVÄNDS PÅ ETIKETTERNA

	Räcker till n tester
	Förvaringstemperatur/nedre temperaturgräns
	Förvaringstemperatur/ temperaturgräns
	Använd före
	Läs bruksanvisningen
	Tillverkare
BLOOD BOOST	Bood Booster, reagens för RT-PCR-satser för detektering direkt från helblod eller buffy-coat
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 MASTERMIX	Mastermix för RT-PCR-satserna för detektering direkt från helblod eller buffy-coat
Q PRIMERMIX B27-d	Primermix för typning av HLA-B*27 med FastQ B*27 direct -satsen
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. Mack et al., 2003, Tissue Antigens 81: 194-203

För bruksanvisningar på andra språk, se <http://www.baq-diagnostics.com> eller kontakta oss direkt på info@baq-diagnostics.com eller telefon +49 (0)6404-925-125