

EN

Istruzioni per l'uso

HISTOTYPE Rainbow

Kit di test per la determinazione degli alleli HLA su base genetica molecolare

IVD

CE 0123

RIF 728220

Contenuti

1. USO PREVISTO	2
2. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO.....	2
3. PRINCIPIO DEL TEST.....	2
4. MATERIALE	3
4.1 Contenuto del kit Rainbow	3
4.2 Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari	3
4.3 Ciclatore per PCR in tempo reale convalidato	3
5. CONSERVAZIONE E STABILITÀ	4
6. PROCEDURA DEL TEST	4
6.1 Precauzioni e note speciali.....	4
6.2 Isolamento del DNA	4
6.3 Amplificazione.....	5
6.4 Valutazione e interpretazione dei risultati.....	7
7. AVVERTENZE E ISTRUZIONI PER LO SMALTIMENTO	8
8. KITSPECIFICHE	9
9. LIMITI DEL METODO	9
10. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO	10
11. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	11
12. NOMI COMMERCIALI UTILIZZATI	11
13. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE	12
14. Letteratura	12

Versione: 01/2020 / Edizione:



BAG Diagnostics GmbH
Amtsgerichtsstr. 1-5 Tel. +49 (0) 6404 / 925-100 www.bag-diagnostics.com
35423 Lich / Germany Fax +49 (0) 6404 / 925-450 info@bag-diagnostics.com

Ordering:
Tel. +49 (0) 6404 / 925-450
Fax +49 (0) 6404 / 925-460
order@bag-diagnostics.com

Customer Service:
Tel. +49 (0) 6404 / 925-125
Fax +49 (0) 6404 / 925-421
service@bag-diagnostics.com

1. USO PREVISTO

L'uso previsto del kit HISTO TYPE Rainbow è l'identificazione degli alleli HLA di classe I e II. HISTO TYPE Rainbow è un test diagnostico in vitro per la tipizzazione dei tessuti basato su una base genetica molecolare (vedere la descrizione del prodotto).

2. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

I kit HISTO TYPE Rainbow sono utilizzati per la determinazione genetica molecolare degli alleli HLA di Classe I e II in 11 loci: HLA-A, B, C, DRB1 / 3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1 e DPB1. I kit sono progettati per rilevare generalmente tutti gli alleli negli 11 loci; se non vengono rilevati alleli rari, gli alleli sono elencati nei documenti di informazioni specifiche del kit (KSI). Il kit fornisce risultati di tipizzazione da bassi a medi degli alleli comuni e ben documentati basati sul catalogo CWD 2.0.0 (1). I risultati diagnostici confermati degli alleli HLA sono un prerequisito per un trapianto di organi di successo.

3. PRINCIPIO DEL TEST

Il test viene eseguito con DNA genomico come materiale di partenza. Il DNA viene amplificato in una PCR in tempo reale con primer sequenza-specifici (SSP). I primer sono stati sviluppati appositamente per l'amplificazione selettiva di segmenti di specifici alleli HLA o gruppi di alleli. Gli ampliconi vengono rilevati utilizzando sonde di idrolisi marcate con colorante a fluorescenza specifica per sequenza (sonde TaqMan®), che aumentano la sensibilità e la specificità del test rispetto al classico SSP.

Se sono presenti ampliconi, le sonde vengono idrolizzate dalla Taq polimerasi e viene generato un segnale di fluorescenza per consentire il rilevamento dell'amplicone. Cinque diversi intervalli di lunghezze d'onda dei segnali di fluorescenza vengono misurati dall'unità di rilevamento ottico del ciclatore per PCR in tempo reale. La presenza di una reazione positiva è determinata principalmente dal punto C_q, che è il punto in cui il segnale di fluorescenza aumenta oltre la soglia di base. Affinché l'amplificazione sia valida, l'amplificazione deve anche raggiungere una certa soglia di fluorescenza al termine del processo PCR. Questo serve a prevenire reazioni false positive.

Ciascuna reazione PCR contiene anche un controllo di amplificazione interno (gene dell'ormone umano della crescita (HGH)) che viene rilevato in uno specifico canale fluorescente.

Per distinguere reazioni positive da amplificazioni negative o irrilevanti si calcola il rapporto tra C_q della reazione specifica e C_q dell'amplificazione interna. Le soglie per questi rapporti C_q (C_qR) variano da reazione a reazione e quindi il software PlexTyper è necessario per l'analisi dei dati di amplificazione.

4. MATERIALE

4.1 Contenuto del kit Rainbow

- **10x 230 µl Plex Mix**, pronto all'uso, contiene dNTP, Taq Polymerase, tampone di reazione.
- **10 piatti HISTO TYPE Rainbow** per la tipizzazione HLA. Le miscele di reazione pre-pipettate ed essiccate contengono primer e sonde specifici per HLA, nonché primer e sonde di controllo specifici per HGH (oligomix).
- **10x sigillo qPCR**

4.2 Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari

- Reagenti per l'isolamento del DNA (kit di estrazione convalidati vedere 6.2)
- Ciclatore per PCR in tempo reale (ciclatore convalidato vedere 4.3)
- Pipette variabili (0,5 - 1000 µl) e puntali per pipette
- Spatola per applicazione per qPCR Seal
- Acqua priva di DNAsi di grado molecolare.
- Centrifuga (ad es. PlateFuge - MicroCentrifuge von Benchmark Scientific)

4.3 Ciclatore per PCR in tempo reale convalidato

Ciclatore per PCR in tempo reale
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-

Vengono utilizzati i seguenti fluorofori.

Fluoroforo	Lunghezza d'onda in nm
FAM	Eccitazione: 495 Emissione: 520
CAL Fluor® Orange 560	Eccitazione: 538 Emissione: 559
CAL Fluor® Red 610	Eccitazione: 590 Emissione: 610
Quasar® 670	Eccitazione: 647 Emissione: 670
Quasar® 705	Eccitazione: 690 Emissione: 705

5. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I kit vengono spediti su blue ice. Tutti i reagenti devono essere conservati a ≤ -20 ° C in dispositivi a temperatura controllata. La data di scadenza è indicata sull'etichetta di ogni reagente. La data di scadenza indicata sull'etichetta esterna si riferisce al reagente con la stabilità più breve contenuto nel kit. Il test del ciclo di congelamento-scongelo ha dimostrato che fino a 6 cicli per il Plex Mix non ha effetti negativi sulla qualità del kit.

6. PROCEDURA DEL TEST

6.1 Precauzioni e note speciali

Le tecniche di genetica molecolare sono metodi estremamente sensibili e devono essere eseguite solo da personale qualificato con esperienza nelle tecniche di genetica molecolare.

Devono essere osservate precauzioni speciali per evitare contaminazioni e quindi false reazioni:

- ◆ Indossare guanti adatti (preferibilmente senza polvere) durante il lavoro.
- ◆ Utilizzare punte con inserto filtro o timbro integrato.
- ◆ Lavorare in due diverse aree per la pre-amplificazione (isolamento del DNA, preparazione delle reazioni) e la post-amplificazione (rilevamento); utilizzare due stanze separate se possibile.
- ◆ Utilizzare dispositivi e altri materiali solo nei rispettivi luoghi di lavoro e non scambiarli.

6.2 Isolamento del DNA

L'esemplare il materiale per l'isolamento del DNA genomico deve essere inviato in appropriati sistemi di raccolta. Per materiale genomico da sangue intero utilizzare solo anticoagulanti EDTA o citrato. In presenza di eparina può potenzialmente inibire la reazione PCR (2), pertanto tali sistemi di raccolta non sono adatti e non devono essere utilizzati. Si consiglia di utilizzare kit certificati IVD per l'isolamento del DNA.

Kit convalidati per l'estrazione del DNA:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (colonne)
- Isolamento automatizzato del DNA con QIAcube

Se il metodo standard stabilito in laboratorio deve essere applicato per l'isolamento del gDNA senza utilizzare uno dei kit di test specificati, deve essere convalidato dall'utente.

Il test HISTO TYPE Rainbow richiede 10-20 ng di DNA per pozzetto.

Gli indici di purezza devono essere nel seguente intervallo:

- $OD_{260} / OD_{280} =$ > 1,5 e <2,0
Valori più alti sono un indicatore della presenza di RNA, valori più bassi indicano contaminazione da proteine.
- $OD_{260} / OD_{230} =$ > 1,8
Valori inferiori indicano contaminazione con carboidrati, sali o solventi organici.

6.3 Amplificazione

Si prepara una premiscela composta da Plex Mix, acqua e DNA per l'amplificazione che viene successivamente dispensata nei pozzetti 1-95. Nel pozzetto 96 è presente il controllo negativo (no template control = NTC) che dovrebbe contenere solo acqua e Plex Mix. Per altre concentrazioni di DNA la premiscela deve essere modificata di conseguenza (vedi sotto).

- Il volume di reazione per ogni preparazione PCR è 10 µl.
- Per un singolo pozzetto, i seguenti reagenti devono essere pipettati in una provetta di reazione:

2 µl Plex Mix
1 µl Campione di DNA
7 µl Acqua di grado molecolare

Deve essere eseguito un controllo negativo (NTC). Preparare quindi una reazione PCR con acqua di grado molecolare invece che con DNA.

2 µl Plex Mix
8 µl Acqua di grado molecolare

Concentrazione di DNA 10-20 ng / µl

- Aggiungere 805 µl di acqua di grado molecolare alla fiala con 230 µl di Plex Mix e miscelare (vortex brevemente 1-3 sec).
- Dopo la miscelazione, pipettare 10 µl della miscela nel pozzetto NTC (pozzetto 96; posizione H12 - vedere anche Figura 1 e 2).
- Quindi pipettare 115 µl di DNA nella fiala con la rimanente miscela di acqua e miscela Plex e mescolare (agitare brevemente 1 - 3 sec).
- Distribuire 10 µl della soluzione DNA / Plex Mix / acqua in ciascuno dei pozzetti 1-95 della piastra HISTO TYPE Rainbow (notare le figure 1 e 2). Il pozzetto NTC (pozzetto 96; posizione H12) non deve essere riempito con la miscela di DNA poiché ciò renderà positivo l'NTC e potrebbe invalidare il test!

DNA con altre concentrazioni

- Aggiungere 8 µl di acqua di grado molecolare e 2 µl di Plex Mix all'NTC (pozzetto H12). Il pozzetto NTC (pozzetto 96; posizione H12) non deve essere riempito con la miscela di DNA!
- Pipettare il DNA e l'acqua di grado molecolare nella miscela Plex da 228 µl rimanenti secondo la tabella seguente e miscelare (agitare brevemente 1-3 sec).

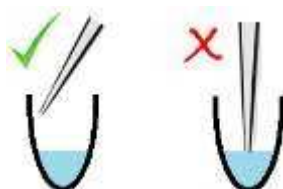
A seconda della concentrazione di DNA, pipettare i volumi applicabili nella tabella sottostante nella miscela Plex da 228 μl rimanenti nella fiala dopo aver impostato l'NTC:

Concentrazione del DNA [ng / μl]	Acqua di grado molecolare [μl]	Volume del DNA [μl]
2	342	570
5	684	228
50	889	23
80	898	14
100	901	11
150	904	8
200	906	6
250	907	5
300	908	4
500	910	2

- Distribuire 10 μl della soluzione di acqua miscelata DNA-Plex in ciascuno dei pozzetti 1-95 della piastra HISTO TYPE Rainbow.

Notare che: Quando si pipetta nei pozzetti per PCR è importante che la punta della pipetta non entri in contatto con la miscela essiccata (colorata in blu) sul fondo del pozzetto. Si consiglia di pipettare a lato del pozzetto per consentire ai 10 μl di mescolarsi per gravità con la miscela essiccata (vedi Figura 1).

Figura 1



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	NTC

Figura 2: HISTO TYPE Piatto arcobaleno. Nei pozzetti da A1 a G12 sono presenti le miscele specifiche essiccate (blucolorato). Nel pozzetto H12 è presente l'NTC essiccato (anch'esso blu).

- Sigillare la piastra PCR con il sigillo qPCR in dotazione e centrifugare brevemente il liquido. Assicurarsi che la piastra sia completamente sigillata, in particolare sul bordo della piastra. Il sigillo deve essere privo di bolle per impedire l'evaporazione durante la PCR. Assicurarsi che il liquido sia entrato in contatto con la miscela essiccata e che non vi siano bolle o vuoti d'aria nei pozzetti di reazione. Se compaiono bolle, picchiettare delicatamente le provette sul banco da laboratorio per rimuoverle, o preferibilmente centrifugare brevemente (10 sec).

Programma PCR

Seguendo la guida per l'utente del produttore del ciclatore per PCR in tempo reale, configurare una corsa PCR con le impostazioni descritte di seguito e utilizzando la modalità di scansione: TUTTI I CANALI

Quindi eseguire la reazione PCR utilizzando i seguenti parametri:

Passo	Tempo [s]	Temperatura [° C]	Velocità di rampa [° C / s]	Letture targa	Cicli
Attivazione iniziale	120	96	2,5	-	1
Denaturazione	5	98	2,5	-	13
Ricottura + Estensione	25	68	2,2	-	
Denaturazione	5	98	2,5	-	37
Ricottura + Estensione	25	68	-	sì	

Il seguente dispositivo in tempo reale è convalidato per l'uso:

Bio-Rad: CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System

Nota Con il sistema di rilevamento PCR in tempo reale CFX96 Touch™ è necessario utilizzare una velocità di riscaldamento modificata del dispositivo (velocità di rampa). Questi sono elencati nella tabella del programma PCR sopra (colonna "Velocità di rampa").

6.4 Valutazione e interpretazione dei risultati

Per la valutazione e l'interpretazione dei dati è obbligatorio utilizzare il software PlexTyper (disponibile gratuitamente presso BAG Diagnostics) insieme ai file dati specifici del kit. I file del kit necessari per la valutazione sono disponibili dal server di download di BAG Diagnostics (www.service.bag-diagnostics.com).

Annotare il numero di lotto del kit. I file del kit di interpretazione sono specifici per prodotto e lotto. L'uso di file di kit errati potrebbe causare una genotipizzazione errata. Per l'interpretazione dei risultati, i dati grezzi devono essere trasferiti dal termociclatore a un computer che esegue il software PlexTyper (ad es. Con un drive USB adatto).

Seguire le istruzioni per l'uso di PlexTyper per l'interpretazione dei dati.

È possibile, ma non essenziale, eseguire un'ampia revisione dei dati sul software del termociclatore. Ad esempio, un'amplificazione valida deve mostrare segnali di fluorescenza adeguati per il controllo dell'amplificazione interna nel canale FAM.

Come controllo della contaminazione viene utilizzato un controllo negativo (NTC). Se DNA o amplicone contaminante vengono aggiunti inavvertitamente alla reazione NTC, si verificherà un segnale positivo. Se il Cq è inferiore a 36 verrà rilevato come possibile contaminazione dal software PlexTyper e verrà generato un messaggio di avviso. I segnali di amplificazione superiori a Cq 36 nell'NTC sono considerati artefatti della PCR e vengono ignorati. Se si sospetta una contaminazione da PCR, si consiglia di seguire le linee guida locali per la decontaminazione e di sostituire i reagenti.

I dati grezzi raccolti dal software specifico del ciclatore verranno importati nel software PlexTyper. In base ai valori Cq, RFU (unità di fluorescenza relativa), punteggi di qualità e progressione della curva, il software PlexTyper determina il pattern HLA genetico molecolare dei campioni utilizzati (vedere le istruzioni per l'uso di PlexTyper per i dettagli).

7. AVVERTENZE E ISTRUZIONI PER LO SMALTIMENTO

HISTO TYPE Rainbow è progettato per uso diagnostico in vitro. Il kit deve essere utilizzato solo da personale qualificato e appositamente addestrato. Tutto il lavoro deve essere eseguito in conformità con la buona pratica di laboratorio.

Tutti i materiali di origine biologica utilizzati nel test per ottenere il DNA (es. Sangue) devono essere considerati potenzialmente infettivi. Pertanto, si raccomandano precauzioni di sicurezza appropriate quando si maneggiano materiali biologici come richiesto dagli standard di buona pratica di laboratorio.

I materiali biologici devono essere inattivati prima dello smaltimento (ad esempio mediante sterilizzazione in autoclave). I materiali monouso devono essere sterilizzati in autoclave o inceneriti dopo l'uso.

Il materiale potenzialmente infettivo versato deve essere rimosso immediatamente con un tovagliolo di carta assorbente e l'area contaminata deve essere disinfettata con un disinfettante appropriato o con etanolo al 70%. Il materiale utilizzato per rimuovere le fuoriuscite deve essere inattivato prima dello smaltimento (ad es. In autoclave).

Lo smaltimento di tutti i campioni, dei reagenti inutilizzati e dei rifiuti deve essere conforme alla legislazione del rispettivo paese e alle autorità locali.

Evitare la contaminazione microbica dei reagenti durante l'assunzione di aliquote. Si raccomanda l'uso di pipette monouso sterili e puntali per pipette. Non utilizzare reagenti che sembrano torbidi o che mostrano segni di contaminazione microbica.

Una scheda di dati di sicurezza dei materiali (MSDS), rispettivamente una dichiarazione sulle schede di dati di sicurezza dei materiali, è disponibile per il download all'indirizzo www.bag-diagnostics.com.

8. KITSPECIFICHE

La combinazione di primer e sonde consente la determinazione degli alleli umani HLA di classe I e II in base a dati specifici del lotto (risoluzione da bassa a media, rilevamento di tutti gli alleli ad eccezione dei singoli alleli rari). Viene verificata l'accuratezza e la riproducibilità della reattività del kit di test ogni lotto con campioni di controllo con alleli HLA noti. Il kit determina gli HLA-Loci A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1 e DPB1.

8.1 PERFORMANCE SPECIFICACARATTERISTICHE

Un certo numero di campioni di DNA pre-tipizzati per tutti o alcuni dei loci HLA analizzati è stato testato con il kit HISTO TYPE Rainbow per mostrare la corretta reattività. C'era una concordanza del 100% dei risultati con le pre-tipizzazioni.

Locus	N. di campioni con risultato precedente per il locus	Concorde	% Concordanza
UN	177	177	100%
B	177	177	100%
C	177	177	100%
DRB1	174	174	100%
DRB3	165	165	100%
DRB4	165	165	100%
DRB5	165	165	100%
DQA1	161	161	100%
DQB1	171	171	100%
DPA1	117	117	100%
DPB1	141	141	100%

I test di convalida hanno dimostrato che la variazione della quantità di DNA da 1 ng a 50 ng per reazione non ha alcun effetto significativo sulla rilevazione specifica degli alleli HLA.

9. LIMITI DEL METODO

Durante l'isolamento del DNA, è necessario prestare particolare attenzione al fatto che il metodo RT-PCR reagisce in modo molto sensibile alle contaminazioni crociate. È necessario prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti del kit e di altri materiali di laboratorio con ampliconi o DNA.

La performance di un controllo negativo senza DNA nel pozzetto H12 è fortemente raccomandata. Nessun segnale di fluorescenza inferiore a 36 Cq deve essere rilevato nell'NTC (H12) con acqua di grado molecolare. In caso di sviluppo del segnale nel controllo negativo, potrebbe essere necessario decontaminare il posto di lavoro del laboratorio PCR dal DNA e, se necessario, sostituire i reagenti.

Tutti i dispositivi (ad es. Pipette, ciclatori in tempo reale) devono essere calibrati secondo le specifiche del produttore.

10. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

I controlli di qualità interni per i nuovi lotti possono essere eseguiti con una combinazione di campioni di DNA con tipo HLA noto. Un controllo interno per verificare il successo dell'amplificazione è incluso negli oligomix essiccati.

Si consiglia di eseguire controlli negativi (pozzetto H12) per rilevare possibili contaminazioni. A tal fine, preparare un test senza DNA (NTC), vedere il capitolo 6.3. Amplificazione.

11. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per la risoluzione dei problemi di interpretazione, consultare le istruzioni per l'uso del software PlexTyper.






Sintomo	Possibile motivo	Potenziale soluzione
Segnali FAM deboli o assenti su tutta la piastra	Presenza di un inibitore nel DNA.	Prova un'estrazione o un campione diverso.
	DNA insufficiente nella reazione.	Ripeti il test con la quantità corretta di DNA.
	Parametri di amplificazione errati.	Verificare il programma PCR.
	DNA contaminato o degradato.	Controllare la concentrazione / qualità del DNA. Controlla il DNA su un gel. Ripeti l'isolamento del DNA.
	Sonde o primer fluorescenti degradati.	Evitare l'esposizione alla luce e frequenti scongelamenti e congelamenti. Rispettare le condizioni di conservazione.
Segnale FAM scarso o assente nei singoli pozzetti	Bolle nel liquido di reazione / residuo sulla parete interna della provetta.	Pipettaggio accurato. Spin down piastra PCR.
	Errore dell'utente.	Assicurarsi che tutti i pozzetti ricevano il volume richiesto di reagenti.
	Evaporazione dei reagenti dovuta a chiusura errata delle provette PCR.	Assicurarsi che le provette per PCR siano chiuse correttamente. Attenzione con pellicole adesive nell'area del bordo.
Segnale nel controllo	Contaminazione con DNA o amplicon nel controllo negativo.	Ripeti il test. Decontaminare il posto di lavoro.
		Rivedere dopo l'importazione in

12. NOMI COMMERCIALI UTILIZZATI

TaqMan® è un nome commerciale di Roche Molecular Systems Inc.

® Cal Fluor e Quasar Dyes sono marchi registrati di LGC Biosearch Technologies

13. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE

	Sufficiente per n test
	Temperatura di conservazione / limite inferiore di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Produttore
	Utilizzare per
CONT	Contenuto, contiene
eIFU	Istruzioni per l'uso elettroniche
DIGITAZIONE HLA	Destinazione d'uso: tipizzazione HLA
IVD	Per uso diagnostico in vitro
LOT	Codice lotto
PCRFOIL	Foglio per PCR
PCRPLATE	Piastre per PCR
PLEX MIX	Plex Mix: Mastermix, contiene dNTP, Taq polimerasi, tampone di reazione
REACTIONMIX	Miscele di reazione
RIF	Numero di catalogo
RTU	Pronto all'uso

14. Letteratura

1. Cano, P. et al, 2007. Human Immunology 68, 392–417
2. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9: 166

Per ulteriori informazioni consultare il nostro sito web www.bag-diagnostics.com oppure contattaci direttamente ainfo@bag-diagnostics.com