



## Vejledning i brug af Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits Version 4, juni 2011.

### 1. Anvendelse

Biofortuna HLA SSPGo Kits er kvalitative DNA-baserede reagenssæt til påvisning af enten HLA-alleler i 'højopløsnings-sæt' eller gruppespecifikke amplifikationer af alleler i 'middelopløsnings-sæt'. Den normale definition af middelopløsning er tilfælde, hvor hovedparten af resultaterne er klart defineret på tocifferniveau; f.eks. DQB1\*02, DQB1\*05 etc. Højopløsning defineres normalt som tilfælde, hvor hovedparten af allelerne findes på fircifferniveauet f.eks. DQB1\*02:01, DQB1\*05:01 etc. Dette er et *in vitro*-diagnostisk produkt, der kun er beregnet til anvendelse af kvalificeret personale.

### 2. Introduktion

HLA-molekyler spiller en vigtig rolle i immunitet og genkendelse af hhv. selv og ikke-selv, og derfor er HLA-genotypebestemmelse og HLA-matchning obligatorisk inden de fleste former for transplantation. Eftersom HLA-antigener begrænser specificiteten af T-cellemediert immunrespons, er HLA-genotypebestemmelse et nyttigt værktøj til diagnosticering af immunsygdomme eller immunrespons på patogener, vaccinationer eller medicinsk behandling. HLA-genotypebestemmelse kan også anvendes til understøttelse af sygdomsdiagnose, hvis visse HLA-alleler har vist sig at være signifikant associeret med sygdomstilstande.

De fleste HLA-gener er yderst polymorfiske, og DNA-genotypebestemmelse er normalt nødvendig for nøjagtig påvisning af HLA-antigener. PCR-genotypebestemmelse med SSP (Sequence-Specific Primers)<sup>1</sup> er en hurtig metode til HLA-genotypebestemmelse og er især egnet i situationer, hvor der er behov for middelopløsning. Biofortuna SSP-sættene har alle fuldstændige tørrede reaktioner, herunder polymerase, så det eneste, brugeren skal gøre inden PCR, er at tilsætte DNA.

Vi forsøger altid at holde sættene opdateret med de nyeste IMGT HLA-justeringer. Reagenssætopdateringer er tilgængelige på [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com).

### 3. Testbeskrivelse

PCR SSP er baseret på princippet om, at det kun er primere, som har fuldstændig matchede 3'-terminaler til en målsekvens, der amplificeres. Forkert matchede primere giver ikke positive amplifikationsprodukter.<sup>2</sup> Et internt kontrolprimerpar, der amplificerer en bevaret region på et husholdningsgen, findes i alle PCR-reaktionsblandinger; det interne kontrolprimerpar er en indikator af PCR-reaktionens integritet. SSP-genotypebestemmelse anvender normalt flere reaktioner, som, når de analyseres sammen, indikerer genotypen. Visualisering af det amplificerede produkt kan opnås ved brug af agarosegelelektroforesesystemer, der separerer DNA-fragmenterne efter størrelse.

#### 4. Indhold i sættet

- 10-40x polypropylen-PCR-bakker eller -strips, som består af mellem 1 og 96 PCR-beholdere (afhængig afsættet). Hver beholder indeholder 10 µl prædispenserede frysetørrede primere, polymerase, dNTP'er\* og buffer. Hver test eller strip er pakket enkeltvist i en foliepakke.
- 1 brugsvejledning.
- Fortolkningstabeller, sikkerhedsdatablad og analysecertifikat kan hentes fra Biofortunas websted [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Kontakt den lokale distributør, hvis det ikke er muligt at hente ovenstående fra webstedet.

\*CleanAmp™-dNTP'er er givet i licens af Trilink Biotechnologies Inc til brug i Biofortuna SSPGo-produkter.

#### 5. Nødvendige reagenser og nødvendigt udstyr

- Egnede pipetter og sterile pipettespidser, f.eks. P10-pipettor med 10-µl-filterspidser.
- DNA-isolationssæt/-udstyr.
- UV-spektrofotometer.
- Polypropylenrør.
- Sterilt vand af molekylær renhed
- PCR-forseglingsark eller -hætter (striphætter leveres til sæt med striphætter).
- Termocykler med 96 brønde og opvarmet låg. De PCR-plader og -rør, der anvendes i Biofortuna-sættene, er blevet valideret til brug sammen med de fleste termocyklere på markedet, herunder MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS og Techne TC-512. Andre modeller kræver muligvis yderligere brugervalidering.
- Gelelektroforesereagenser (agarose, 0,5x TBE, 1000bp DNA-molekylærvægtsmarkør, 10 mg/ml ethidiumbromid).
- Gelelektroforeseudstyr (geltanke, strømforsyning, geldokumentationssystem med UV-transilluminator).

#### 6. Sikkerhed og advarsler

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Test må kun udføres af kvalificeret personale.
- Alle typebestemmelsesresultater skal verificeres af kvalificeret personale og skal bekræftes med en anden typebestemmelsesmetode, hvis de skal danne grundlag for en klinisk beslutning.
- Alle reagenser skal håndteres i henhold til god laboratorieskik.
- Præ- og post-PCR-områder skal holdes adskilt. Overfør ikke nogen form for post-PCR-materialer til præ-PCR-området.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Alle blodprodukter skal behandles som potentielt smittefarlige.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Ethidiumbromid er et potentielt karcinogen. Anvend altid handsker, kittel og beskyttelsesbriller ved brug af ethidiumbromid.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Vær forsigtig ved brug af UV-kilder. Anvend altid handsker, kittel og beskyttelsesbriller. Se aldrig direkte ind i UV-lyskilden.
- Sikkerhedsdatablade findes på [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com).

#### 7. Opbevaring og holdbarhed

Biofortuna SSPGo-sættene skal opbevares ved 4-30 °C. Når PCR-beholderne fjernes fra foliepakken, skal reagenserne rehydreres med DNA inden for 3 timer. Se pakken for oplysninger om udløbsdato. Anvend ikke produkterne efter den påtrykte dato.

Anvend ikke sættene, hvis foliepakken er beskadiget.

Sørg for, at PCR-beholderen forsegles tæt efter tilsætning af DNA, eftersom der ellers kan opstå fordampning under PCR-amplifikation. Vær særlig opmærksom på kanter og hjørner.

## 8. Brugsvejledning

### Krav til DNA-prøver

Hver reaktion i testen er optimeret til at anvende mellem 50 og 100 ng DNA, men det er af afgørende betydning, at hver reaktion rehydreres med nøjagtig 10 µl væske. Derfor kan testen udføres med 10 µl DNA ved 5-10 ng/µl, eller der kan tilsættes en mængde vand først for at tillade tilsætning af DNA ved højere koncentration, f.eks. 9 µl vand efterfulgt af 1 µl DNA ved 50-100 ng/µl. Eftersom heparin kan hæmme PCR, anbefales det, at DNA ikke udtages fra hepariniserede blodprøver. DNA-prøvens  $OD_{260/280}$  bør ligge mellem 1,6 og 2, når den måles ved hjælp af UV-spektrofotometri.

### Præ-PCR-vejledning

- i. Tag en SSPGo-bakke eller -strip ud af en forsegletpakke.
- ii. Notér lotnummer, produktnummer og analyseversion(er).
- iii. Bemærk, at den første reaktion for hvert testlocus altid er rød i forhold til resten af sættet.
- iv. Visse PCR-bakker indeholder en lilla NTC-integralreaktion (uden skabelonkontrol) i den sidste brønd på bakken.
- v. Anvend sterilt udstyr til at afpipettere 10 µl DNA-opløsning i hver reaktion på bakken eller strippen. Se bemærkningen under Krav til DNA-prøver i afsnit 8. Hvis pakken indeholder en lilla NTC-integralreaktion (uden skabelonkontrol), skal der afpipetteres 10 µl prøvefortyndingsopløsning (uden DNA) i den. Se BEMÆRKNING OM NTC (NO TEMPLATE CONTROL) i afsnit 8.
- vi. Sørg for, at DNA'et har kontakt med de tørre reagenser i hver reaktion inden termocykling. Der kan anvendes et kort centrifugeringsstrin for at sikre, at al DNA-opløsning har kontakt med de tørre reagenser.
- vii. Forsegl reagenserne med et forseglingsark eller PCR-rørhætter. Sørg for, at forseglingen er så tæt som mulig for at forhindre fordampning. Vær særlig opmærksom på kanter og hjørner.
- viii. Anbring bakken eller strippene direkte i termocyklaren. Sørg for, at beholderne er sat helt ned i blokken, og at låget er helt komprimeret. I modsat fald kan det forårsage fejl i den enkelte PCR. På nogle modeller af PCR-maskiner kan det være nødvendigt at anvende kompressionsplader eller -blokke for at opnå effektiv komprimering af produktet i blokken.
- ix. Kør PCR-programmet (se PCR-parametre).

**BEMÆRKNING OM RESUSPENSION:** Sørg for, at PCR-blandingerne resuspenderes med DNA-prøven inden for 3 timer, efter at bakken er fjernet fra foliepakken.

**BEMÆRKNING OM NTC (NO TEMPLATE CONTROL):** Visse reagenssæt indeholder en NTC som den sidste reaktion på pladen. Denne reaktion indeholder lilla farvestof for at adskille den fra resten af reaktionerne, og dens tilstedeværelse i et reagenssæt er også angivet i de medfølgende fortolkningstabeller. NTC er beregnet til at påvise PCR-kontaminering eller genomisk DNA-kontaminering fra Biofortuna SSPGo-sæt, som kan forekomme i det vand, der anvendes til at resuspendere DNA'et. Hvis der er PCR-kontaminering, observeres der amplikon(er) i forskellig størrelse. Hvis kontamineringen er genomisk DNA, observeres der en 187bp-amplikon.

**BEMÆRKNING OM PCR-PLADE/-STRIP-HØJDEPROFIL:** Det anbefales, at højdeprofilen på plader og strips er ens, hvis de skal anvendes i samme PCR-maskine. Forskellige højdeprofiler kan forårsage dårlig kontakt med PCR-maskinens opvarmede låg. Dette kan resultere i dårlig eller mislykket PCR-amplifikation.

## PCR-parametre

Følgende PCR-parametre bør anvendes. Sørg for at anvende temperaturstigninger på mindst 1 °C i sekundet, og aktivér det opvarmede låg. Se brugermanualen fra fabrikanten af termocyklere for en fuldstændig vejledning. Termocyklere skal kalibreres i henhold til ASHIs (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) eller EFIs (European Federation of Immunogenetics) retningslinjer for akkreditering.

Denaturer	94 °C	5 minutter		
Denaturer	96 °C	15 sekunder	←	10 cykler
Bind	66 °C	50 sekunder		
Udvid	72 °C	30 sekunder		
Denaturer	96 °C	15 sekunder	←	20 cykler
Bind	64 °C	50 sekunder		
Udvid	72 °C	30 sekunder		
HOLD	15 °C			

## Gelelektroforese

Disse instruktioner gælder for horisontal agarosegelelektroforese: Forbered en 2%-agarosegel i 0,5x TBE-buffer. Når gelen er afkølet til ca. 60 °C, skal der tilsættes ethidiumbromid, så der opnås en endelig koncentration på 0,5 µg/ml. Støb gelen, og isæt mikrotiterformatkammer (f.eks. 12 x 8 brønde med 9 mm afstand). Når gelen er støbt, skal kammene fjernes. Dæk derefter gelen med 0,5x TBE-buffer. Overfør mindst 5 µl og højst 10 µl fra hver bakke- eller stripreaktion til den tilsvarende brønd på gelen. Notér positionen for hver reaktion. En 100 bp-stige kan være nyttig som hjælp til bestemmelse af størrelse. Kør gelen i 20 minutter ved 10V/cm.

Se brugermanualen fra fabrikanten af elektroforesesystemet for specifikke oplysninger om udstyret. Gelfotoet skal fremstilles med et UV-geldokumentationsystem med UV-transilluminator.

## 9. Fortolkning

SSPGo-sæt er designet, så resultaterne kan bestemmes manuelt ved hjælp af de fortolkningstabeller, der findes på [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Kontakt den lokale distributør, hvis det ikke er muligt få adgang til ovenstående websted.

Fastgør gelfotoet på den relevante fortolkningsformular ved at matche sæt- og versionsnumre. Undersøg gelfotoet. Hver reaktion skal indeholde et positivt kontrolbånd. Se fortolkningstabellerne, eftersom dette kan have forskellig størrelse i de enkelte SSPGo-produkter. Interne kontrolbånd kan virke meget svagere, hvis der er allelspecifikke bånd. Hvis der er et allelspecifikt bånd, men ikke et kontrolbånd, skal dette stadig tolkes som et positivt resultat. Ignorer alle bånd under 70bp, eftersom disse er ikke-inkorporerede primere.

Tæl de positive reaktioner. Positive reaktioner indikeres af bånd med den forventede størrelse, som det er angivet i fortolkningstabellerne. Vær opmærksom på, at der kan være mere end én produktstørrelse i en given reaktion – disse er multiplekse reaktioner, som er angivet i fortolkningstabellerne.

Sammenlign de positive reaktioner med fortolkningstabellerne. Et positivt resultat i en reaktion indikerer forekomsten af mindst én af de alleler, der er angivet for det i fortolkningstabellen. Enhver allel kan amplificeres i flere rør – hvis allelen er til stede, bør der være en positiv reaktion i alle de relevante reaktioner.

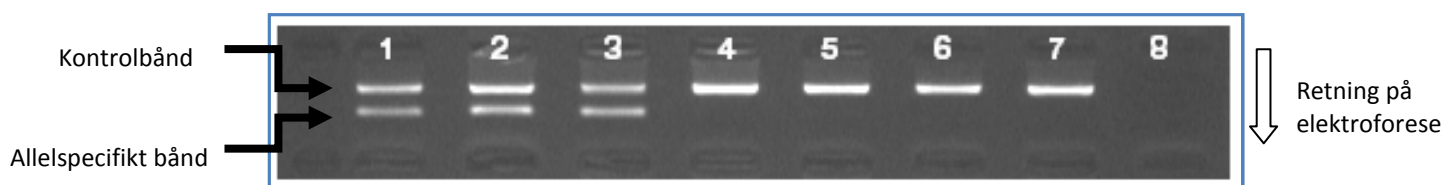


Fig. 1 Eksempler på positive reaktioner, der indikeres ved forekomsten af allelspecifikke bånd og kontrolbånd (reaktion 1-3); negative reaktioner, der indikeres ved forekomsten af kontrolbånd, men ingen allelspecifikke bånd (reaktion 4-7); og en mislykket reaktion, der indikeres ved mangel på bånd (reaktion 8).

**Sørg for, at reagenssætversionen svarer til versionen i fortolkningstabellen.**

## 10. Kvalitetssikring og -kontrol

Hver SSPGo-batch kvalitetskontrolleres, inden produktet forlader Biofortuna. Prøver af hver sætbatch kontrolleres mod et defineret panel af humane DNA-prøver for at sikre korrekt ydeevne. Hver reaktion valideres mod mindst 48 karakteriserede DNA-cellelinjeprøver. Biofortuna anbefaler, at laboratoriet foretager en intern validering af alle nye typebestemmelsesprodukter inden brug sammen med kliniske prøver. Kun uddannet og kvalificeret personale bør foretage diagnostisk typebestemmelse, og resultaterne bør kontrolleres af et andet uddannet medlem af personalet.

## 11. Referencer

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 13-19Nov;324(6093):163-6.

## 12. Symbolforklaring

	Antal test
	Repræsentant i EU
	Se brugsanvisningen
	Fabrikationssted
	In vitro-diagnostik
	Udløbsdato
	Opbevaringstemperatur
	Lotnummer

## 13. Kontaktoplysninger hos fabrikant

Biofortuna Ltd  
 1 Hawkshead Road  
 Croft Business Park  
 Bromborough, CH62 3RJ, UK  
 Tlf.: +44 (0) 151 334 0182  
 E-mail: [info@biofortuna.com](mailto:info@biofortuna.com)  
 Web: [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)



## 14. Oversættelser

Française:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Έλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россию:	Переводы доступны
Slovenskému:	Překlady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

[Web: www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)

## 15. Fejlfindingsguide til SSPGo

Problem	Mulig årsag	Løsning
Ingen amplifikation i nogen reaktion	Der er anvendt en forkert DNA-koncentration	Mål DNA-mængden, og sørg for, at der tilsættes i alt 50-100 ng DNA til en volumen på 10 µl pr. reaktion.
	Der er en forekomst af PCR-hæmmere i DNA-prøven	Undgå hepariniseret blod. Hvis dette ikke er muligt, ekstraheres DNA fra vaskede intakte lymfocytter, så heparin ikke kommer i kontakt med DNA'et.  Der er beskrevet protokoller til fjernelse af heparin fra DNA-prøver ved hjælp af heparinase.  Genekstraher DNA. Se fabrikantens retningslinjer for anvendelse af DNA-ekstraheringssæt.
	Der er en DNA-prøve af dårlig kvalitet	Mål DNA-kvaliteten. A260/A280-ratioen bør være 1,6-2,0 med UV-spektrofotometri.  Sørg for, at DNA'et er helt resuspenderet i opløsningen inden brug.
	Reagenserne er ikke helt resuspenderet	Sørg for, at bundfald er helt rehydreret ved tilsætning af DNA. Centrifuger om nødvendigt pladen.  Sørg for, at der anvendes 10 µl DNA-opløsning pr. reaktion.
	Termocykleren er ikke sat korrekt op	Sørg for, at PCR-programmet er angivet korrekt i henhold til brugsanvisningen.  Sørg for, at termocyklerens opvarmede låg er aktiveret, og lukket tilstrækkeligt.  Se brugermanualen til termocykleren for yderligere oplysninger.
	Elektroforeseproblemer	Sørg for, at der er strøm til elektroforesetanken – kontrollér strømforsyningen, og rens elektroderne.  Kør gelen i 0,5X TBE-buffer.  Sørg for, at der anvendes frisk ethidiumbromid med den koncentration på 0,5 µg/ml. Kontrollér, at der er tilstrækkelig UV-illuminering ved gelfotografering.  Se brugermanualen fra fabrikanten af geltanken og strømforsyningen for yderligere oplysninger.
	Pladerne er ikke forsejlet korrekt.	Utilstrækkeligt forsejlede plader kan forårsage fordampning under PCR. Biofortuna leverer anbefalede forsejlingsark (produkt nr. BF-40-11).  Sørg for, at der er tilstrækkelig forsejling over alle brøndene. Vær især opmærksom på brønde tæt på kanterne af PCR-bakken eller -strippen.
Tilfældige udfald af	Gelfejl	Sørg for, at alle brøndene er sat i gelen i korrekt

Problem	Mulig årsag	Løsning
kontrol- og/eller allelspecifikke amplikoner.		<p>rækkefølge, og at den samme mængde PCR-reaktion er tilsat i hver brønd.</p> <p>Kalibrer pipetterne som beskrevet i fabrikantens brugermanual.</p> <p>Kontrollér, at brøndene er formet korrekt i gelen. Vær forsigtig ved fjernelse af kamme, eftersom der er risiko for at beskadige bunden af brøndene.</p> <p>Sørg for, at aragosen er helt opløst inden støbning af gelen.</p> <p>Sørg for, at gelen ikke kører for langt, eftersom små amplikoner kan falde af enden.</p> <p>Sørg for, at gelen er lang nok til, at båndene kan separeres.</p> <p>Brug frisk ethidiumbromidopløsning.</p>
	Problemer med termocyklere	<p>Fejl, især omkring kanterne på analysen, kan skyldes utilstrækkelig stramning af låget. Dette kan forårsage fordampning og kondens i PCR-reaktionen halvvejs oppe på PCR-beholderen og kan føre til PCR-fejl.</p> <p>Sørg for at følge fabrikantens vejledning ved vedligeholdelse og kalibrering af termocyklere.</p> <p>Kontrollér, at PCR-parametrene er korrekte i henhold til instruktionerne.</p>
	Fordampningsproblemer	<p>Sørg for, at der er tilstrækkelig forsegling over alle brøndene. Vær især opmærksom på brønde tæt på kanterne af PCR-bakken eller -strippene.</p> <p>Sørg for, at det opvarmede låg er aktiveret, og at der er opnået tilstrækkelig komprimering via låget. Biofortuna leverer anbefalede forseglingsark (produkt nr. BF-40-11).</p>
	Sporadiske fejl på grund af DNA-problemer	<p>Der er ingen DNA: Sørg for, at der er DNA i alle brønde.</p> <p>Forkert mængde: Sørg for, at der tilsættes 10 µl DNA-opløsning til hver reaktion.</p> <p>Der er tilsat for meget DNA: Koncentrationer over 200 ng kan forårsage PCR-fejl.</p> <p>Kontaminanter i DNA'et kan forårsage sporadiske eller udbredte fejl ved amplifikation.</p>
Udtværet gelfoto	DNA	<p>Kontrollér DNA-koncentration og -renhed. Hvis der tilsættes for meget DNA til PCR-reaktionerne, kan det resultere i udtværede gelfotos.</p>

Problem	Mulig årsag	Løsning
<b>Svag amplifikation</b>	DNA-koncentrationsproblem	Kontrollér, at DNA-koncentrationen hverken er for høj eller for lav. Gå efter 100 ng DNA pr. reaktion i 10 µl.
	Problemer med termocykleren	Sørg for at følge fabrikantens vejledning ved vedligeholdelse og kalibrering af termocykleren.  Kontrollér, at PCR-parametrene er korrekte i henhold til instruktionerne.
	Gelfejl	Sørg for, at den samme mængde reaktion blev tilsat i hver brønd, mellem 5 µl og 10 µl.  Kalibrer pipetterne som beskrevet i fabrikantens brugermanual.  Brug frisk ethidiumbromidopløsning.
<b>Ikke-specifik amplifikation</b>	DNA-koncentrationsproblem	Kontrollér, at DNA-koncentrationen hverken er for høj eller for lav. Gå efter 50-100 ng DNA pr. reaktion i 10 µl.
	Reaktionerne er isat i forkert rækkefølge	Kontrollér placeringen af PCR og gelspor.  Undgå, at der overføres materiale fra tilstødende brønde ved ikke at overfylde brøndene og ved at sørge for, at gelen har sat sig, inden kammene fjernes.
	Der blev identificeret en ny allel	Der kan være tidligere ikke-sekventerede alleler til stede sammen med et nyt amplifikationsmønster. Hvis der anvendes gamle fortolkningsark, skal der hentes en ny justeringsopdatering fra <a href="http://www.biofortuna.com">www.biofortuna.com</a> . Hvis denne ikke dækker det nye mønster, skal det kontrolleres med et andet Biofortuna-sæt, eller det skal forsøges at identificere sekvensen ved sekvensbaseret typebestemmelse. Kontakt Biofortunas kundeservice for yderligere oplysninger.
<b>Amplifikationsmønsteret kan ikke fortolkes</b>	Forkert fortolkning af et artefakt som et specifikt bånd	Kontrollér de versionspecifikke fortolkningstabeller for korrekt båndstørrelse.  Kontrollér, om alle specifikke amplifikationer har den korrekte størrelse, eller om et artefakt (carry-over, primer-dimer) er blevet misfortolket som en amplifikation.
	Reaktionerne er isat i forkert rækkefølge	Kontrollér placeringen af PCR og gelspor.
	Enkeltstående PCR-fejl	Kontrollér, at alle interne positive kontroller er til stede. Genfortolk uden manglende reaktioner.
	Der mangler små amplikoner	Hvis der udføres for lang elektroforese, kan små amplikoner falde af enden af gelen, løbe forbi ethidiumbromidfronten eller spredes til den foranliggende gelbrønd. Anvend elektroforeseforhold, der er passende til laboratoriets gelsystem.
	Der blev identificeret en ny allel i prøven	Der kan fra tid til anden observeres nye alleler, som kan forårsage et amplifikationsmønster, som ikke svarer til eksisterende alleler. Kontakt venligst det lokale

Problem	Mulig årsag	Løsning
		ordrekontor for nærmere oplysninger.