



Bruksanvisning for Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits Versjon 4. juni 2011.

1. Bruksområde

Biofortuna SSPGo HLA Typing Kits er kvalitative DNA-baserte kit som brukes til å bestemme HLA-alleler i kit med høy oppløsning eller gruppespesifikk amplifikasjon av alleler i kit med oppløsning på middels nivå. Med oppløsning på middels nivå skal de fleste resultatene ifølge den vanlige definisjonen være klart definert på tosiffernivå, f.eks. DQB1*02, DQB1*05 osv. Med høy oppløsning skal de fleste alleler være på firesiffernivå, f.eks. DQB1*02:01, DQB1*05:01 osv. Dette er produkt for *in vitro*-diagnostikk som kun skal brukes av opplært personell.

2. Innledning

HLA-molekyler spiller en nøkkelrolle i immunsystemet og i gjenkjennelsen av eget og fremmed. Dermed er HLA-genotyping og HLA-matching obligatorisk før de fleste former for transplantasjon. Siden HLA-antigener begrenser spesifisiteten til T-celleformidlede immunresponser, er HLA-genotyping et nyttig undersøkelsesverktøy ved alle immunsykdommer og ved all immunrespons mot patogener, vaksiner eller medisinsk behandling. HLA-genotyping kan også brukes som et hjelpemiddel ved sykdomsdiagnoser der visse HLA-alleler har vært vist seg å være signifikant forbundet med den aktuelle tilstanden.

De fleste HLA-gener er sterkt polymorfe, og generelt kreves DNA-genotyping for nøyaktig bestemmelse av HLA-antigener. PCR-genotyping med sekvensspesifikke primere (SSP)¹ er en rask metode for HLA-genotyping, og den er særlig egnet i situasjoner der det kreves oppløsning på middels nivå. Alle Biofortuna SSP-kit leveres med tørkede reaksjoner, inkludert polymerase, så alt brukeren må gjøre før PCR, er å tilsette DNA.

Alt gjøres for å holde kitene oppdatert med nye sekvenser fra IMGT/HLA-databasen. Kitoppdateringer kan fås fra www.biofortuna.com.

3. Analysebeskrivelse

PCR SSP er basert på prinsippet om at bare primere med 3'-terminaler som er fullstendig tilpasset målsekvensen, lar seg amplifisere. Mistilpassede primere gir ikke positive amplifikasjonsprodukter.² Et primerpar til intern kontroll, som amplifiserer et konservert område av et husholdningsgen, er inkludert i hver PCR-reaksjonsblanding; primerparet til internkontroll er en indikator på PCR-reaksjonens vellykkethet. SSP-genotyping bruker generelt flere reaksjoner som når de blir analysert sammen, indikerer genotypen. Visualisering av de amplifiserte produktene kan oppnås ved hjelp av systemer for agarosegelelektroforese, som skiller DNA-fragmentene etter størrelse.

4. Innholdet i kitet

- 10–40 x PCR-plater eller strips av polypropylen som består av mellom 1 og 96 PCR-kyvetter (avhengig av kitet). Hver kyvette inneholder 10 µl forhåndsdispenserte frysetørrede primere, polymerase, dNTP-er* og buffer. Hver analyse eller strips er pakket for seg i en foliepose.
- 1 x bruksanvisning.
- Tolkningstabeller, sikkerhetsdatablad og analysesertifikat kan lastes ned fra Biofortunas nettsted www.biofortuna.com. Hvis du ikke klarer å laste ned fra nettsiden, ber vi deg om å kontakte din lokale distributør.

*CleanAmp™ dNTP-er er lisensiert fra Trilink Biotechnologies Inc til bruk i Biofortuna SSPGo-produkter.

5. Reagenser og utstyr som ikke følger med

- Egnede pipetter og sterile spisser, f.eks. P1-pipette med 10 µl-filterspisser
- DNA-isolasjonskit/-utstyr
- UV-spektralfotometer
- Polypropylenrør
- Sterilt vann av molekylærbiologisk kvalitet
- PCR-forseglingfilm eller -stripslokk (Stripslokk følger med kit med strips.)
- 96-brønns termosykler med oppvarmet lokk. PCR-plater og rør til Biofortuna-kit er godkjent til bruk med de fleste av termosyklusene på markedet, bl.a. MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS og Techne TC-512. Ulike modeller kan kreve ytterligere validering av brukeren.
- Gelelektroforese reagenser (agarose, 0,5 x TBE, 1000 bp DNA molekylærvektmarkør, 10 mg/ml etidiumbromid)
- Gelelektroforeseutstyr (gelkar, strømforsyning, geldokumentasjonssystem med UV-transilluminator)

6. Sikkerhet og advarsler

- Til bruk ved *in vitro*-diagnostikk
- Analysene skal bare utføres av personell med riktig opplæring.
- Alle typebestemmelsesresultater skal kontrolleres av kvalifisert personell, og hvis de skal brukes til en klinisk beslutning, skal de bekreftes ved bruk av en annen typebestemmelsesmetode.
- Håndter alle reagenser i samsvar med god laboratoriepraksis.
- Hold pre- og post-PCR-områder adskilt. Ikke ta med post-PCR-materiale tilbake til pre-PCR-området.
- **Biologisk fare:** Behandle alle blodprodukter som potensielt smittefarlige.
- **Biologisk fare:** Etidiumbromid er et potensielt karsinogen. Hvis det brukes, må brukeren ha på hansker, laboratoriefrakk og vernebriller.
- **Biologisk fare:** Vær forsiktig ved bruk av UV-kilder – ha alltid på hansker, laboratoriefrakk og vernebriller. Se aldri direkte på UV-lyskilden.
- Sikkerhetsdatablader kan fås fra www.biofortuna.com.

7. Oppbevaring og stabilitet

Biofortuna SSPGo-kit skal oppbevares ved 4–30 °C. Når PCR-kyvettene er tatt ut av folieposene, skal reagensene rehydreres med DNA innen 3 timer. Utløpsdatoen er angitt på emballasjen. Ikke bruk produkter som har gått ut på dato.

Ikke bruk kitet hvis folieposen er revet opp eller det er hull i den.

Sørg for at PCR-kyvettene blir tett forseglet når DNA-et har blitt tilsatt, siden det ellers kan oppstå fordampning under PCR-amplifikasjonen. Vær spesielt nøye med kanter og hjørner.

8. Instruksjoner for bruk

Krav til DNA-prøver

Hver reaksjon i analysen er optimalisert for bruk av mellom 50–100 ng DNA, men det er avgjørende at hver reagens blir rehydrert med nøyaktig 10 µl væske. Derfor kan analysen utføres med 10 µl DNA med en konsentrasjon på 5–10 ng/µl, eller det kan benyttes DNA med høyere konsentrasjon ved først å tilsette vann. Det kan f.eks. tilsettes 9 ul vann og så 1 ul DNA med en konsentrasjon på 50–100 ng/µl. Siden heparin kan hemme PCR, anbefales det at det ikke blir ekstrahert DNA fra hepariniserte blodprøver. $OD_{260/280}$ i DNA-prøven bør ligge mellom 1,6 og 2 målt med UV-spektrofotometri.

Pre-PCR-instruksjoner

- i. Ta ut en SSPGo-plate eller en SSPGo-strips fra en forseglet pose.
- ii. Noter lotnummeret, produktnummeret og analyseversjonen(e).
- iii. Legg merke til at den første reaksjonen av hvert testlokus alltid er rød i forhold til resten av kitet.
- iv. Noen PCR-plater har en lilla integrert "ikke-templatkontroll"-reaksjon i den siste brønnen i platen.
- v. Pipetter 10 µl DNA-løsning inn i hver reaksjon i platen eller stripsen ved hjelp av sterilt utstyr. Se merknaden i kapittel 8 om krav til DNA-prøven. Hvis platen har en lilla integrert "ikke-templatkontroll", pipetteres 10 µl prøvefortynningsmiddel (uten DNA) til den. Se merknaden om ikke-templatkontroll i kapittel 8.
- vi. Sørg for at DNA-et får kontakt med de tørre reagensene i hver reaksjon før termisk sykling. En kort sentrifugering kan brukes til å sørge for at hele DNA-løsningen har fått kontakt med de tørre reagensene.
- vii. Forsegl reaksjonene med en forseglingsfilm eller et stripslokk. Sørg for at forseglingen er så tett som mulig slik at det ikke oppstår fordampning. Vær spesielt nøye med kanter og hjørner.
- viii. Plasser plate eller strips rett i termosyklere. Se til at kyvettene er satt helt inn i blokken, og at lokket er presset helt ned. Manglende overholdelse av dette kan føre til individuell ikke-amplifikasjon. På enkelte PCR-maskinmodeller kan det være nødvendig å bruke kompresjonsputer eller blokker for å få effektiv kompresjon av produktet i blokken.
- ix. Kjør PCR-programmet (se PCR-parametrene).

MERKNAD OM RESUSPENSJON: Se til at PCR-blandingene blir resuspendert med DNA-prøven innen 3 timer fra brettet blir tatt ut av folieposen.

MERKNAD OM IKKE-TEMPLATKONTROLL: Noen kit omfatter en ikke-templatkontroll (No Template Control, NTC) som en siste reaksjon på platen. Denne reaksjonen inneholder et lilla fargestoff så den ikke skal forveksles med de andre reaksjonene; dens tilstedeværelse i kitet er også angitt på tolkningstabellene som følger med. NTC-en er utformet slik at den påviser PCR-kontaminering eller genomisk DNA-kontaminering fra Biofortuna SSPGo-kitet som kan finnes i vannet som er brukt til resuspensjon av DNA-et. Hvis det er PCR-kontaminering til stede, vil det bli observert amplikoner av variabel størrelse. Hvis kontamineringen er genomisk DNA, vil det observeres et 187 bp-amplikon.

MERKNAD OM PCR-PLATENES/-STRIPSENE HØYDEPROFIL: Det anbefales at platenes og stripsenes høydeprofil er den samme når de plasseres i den samme PCR-maskinen. Ulike høydeprofiler kan forårsake dårlig kontakt med PCR-maskinens oppvarmede lokk. Det kan resultere i dårlig eller mislykket PCR-amplifikasjon.

PCR-parametre

Følgende PCR-parametre skal brukes: Se til at stigetiden (ramp speed) er minst 1 °C per sekund og aktiver det oppvarmede lokket. Fullstendig bruksanvisning finnes i termosyklusproduzentens brukerhåndbok. Termosyklere skal kalibreres i samsvar med akkrediteringsreglene fra American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) eller European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturering	94 °C	5 minutes		
Denaturering	96 °C	15 sekunder	←	10 sykluser
Annealing	66 °C	50 sekunder		
Elongering	72 °C	30 sekunder		
Denaturering	96 °C	15 sekunder	←	20 sykluser
Annealing	64 °C	50 sekunder		
Elongering	72 °C	30 sekunder		
HOLD	15 °C			

Gelelektroforese

Disse instruksjonene gjelder bare horisontal agarosegelelektroforese: Forbered en 2 % agarosegel i 0,5 x TBE-buffer. Når gelen er avkjølt til ca. 60 °C, tilsettes etidiumbromid til en endelig konsentrasjon på 0,5 µg/ml. Støp gelen og sett inn mikroplatekammer (f.eks. 12 x 8 brønner med 9 mm mellomrom). Når gelen har stivnet, fjernes kammene, og gelen dekkes med 0,5 x TBE-buffer. Overfør minimum 5 µl og maksimum 10 µl fra hver brett- eller stripsreaksjon til den tilsvarende brønningen på gelen, og noter hvor hver reaksjon befinner seg. En 1000 bp-ladder kan være til hjelp når størrelsen skal bestemmes. Kjør gelen ved 10 V/cm i 20 min.

Se bruksanvisningen fra produsenten av elektroforesesystemet for spesifikke opplysninger om utstyret. Gelene fotograferes med et UV-geldokumentasjonssystem med UV-transilluminator.

9. Tolkning

SSPGo-kitet er utformet slik at resultatene kan bestemmes manuelt med tolkningstabeller fra www.biofortuna.com. Hvis du har problemer med å komme inn på nettsiden, ber vi deg om å kontakte din lokale distributør.

Fest gelbildet til det tilsvarende tolkningsskjemaet. Sørg for at kit- og versjonsnummer stemmer overens. Undersøk gelbildet. Hver reaksjon skal inneholde et positivt kontrollbånd. Se tolkningstabellene, siden det kan ha ulik størrelse i ulike SSPGo-produkter. Interne kontrollbånd kan se mye svakere ut når det er allelspesifikke bånd til stede. Ved fravær av kontrollbånd skal resultatet likevel regnes som positivt dersom det er et allelspesifikt bånd til stede. Se bort fra bånd på mindre enn 70 bp, siden det er uinkorporerte primere.

Bestem de positive reaksjonene. Positive reaksjoner indikeres av bånd av den størrelsen som er angitt på tolkningstabellene. Vær klar over at det kan være mer enn én produktstørrelse i en gitt reaksjon – dette er multiplekserte reaksjoner, og de er angitt på tolkningstabellene.

Sammenlign positive reaksjoner med tolkningstabellene. Et positivt resultat i en reaksjon indikerer tilstedeværelse av minst ett av allelene listet opp mot det på tolkningstabellen. Ethvert allel kan amplifiseres i flere rør – hvis allelet er til stede, skal det være en positiv reaksjon i alle de relevante reaksjonene.

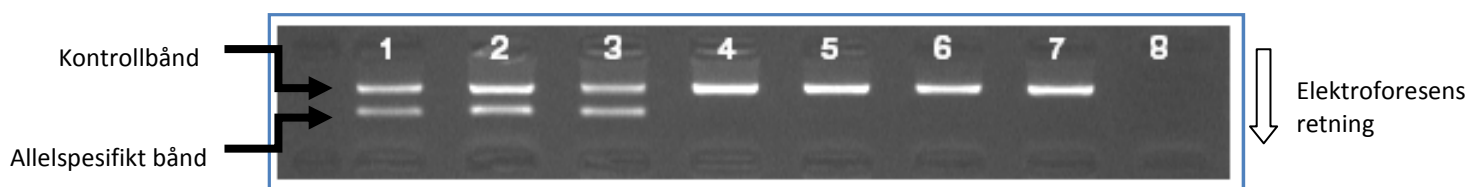


Fig. 1 Eksempler på positive reaksjoner, indikert av tilstedeværelse av allelspesifikke bånd og kontrollbånd (reaksjonene 1–3); negative reaksjoner, indikert av tilstedeværelse av kontrollbånd, men fravær av allelspesifikke bånd (reaksjonene 4–7); og en mislykket reaksjon, indikert av fravær av bånd (reaksjon 8).

Kontroller at versjonen av kitet stemmer overens med versjonen på tolkningstabellen.

10. Kvalitetssikring og -kontroll

Alle SSPGo-batcher kvalitetskontrolleres før de forlater Biofortuna. Prøver av hver kitbatch blir kontrollert mot et definert panel av prøver med humant DNA for å sikre korrekt ytelse. Hver reaksjon er validert mot minst 48 godt karakteriserte cellelinje-DNA-prøver. Biofortuna anbefaler alle laboratorier å validere eventuelle nye typebestemmelsesprodukter internt før bruk på kliniske prøver. Bare fullt opplært og kvalifisert personell kan utføre diagnostisk typebestemmelse, og resultatene skal kryssjekkes av en annen opplært medarbeider.

11. Referanser

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

12. Symbolforklaring

▽	Antall analyser
EC REP	Autorisert representant
📖	Se bruksanvisningen
🏭	Produksjonssted
IVD	In vitro-diagnostikk
🕒	Utløpsdato
4°C ↕ 30°C	Oppbevaringstemperatur
LOT	Lotnummer

13. Produsentens kontaktopplysninger

Biofortuna Ltd
 1 Hawkshead Road
 Croft Business Park
 Bromborough, CH62 3RJ, UK
 T: + 44 (0) 151 334 0182
 E: info@biofortuna.com
 W: www.biofortuna.com



14. Oversettelser

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

www.biofortuna.com

15. SSPGo-feilsøking

Problem	Sannsynlig årsak	Løsning
Ingen amplifikasjon i noen reaksjon	Uriktig konsentrasjon av DNA brukt	Mål mengden DNA og se til at hver reaksjon tilsettes totalt 50–100 ng DNA i 10 µl væske.
	PCR-inhibitorer til stede i DNA-prøven	Unngå heparinisert blod, eller, hvis det ikke kan unngås, ekstraher DNA fra vaskede intakte lymfocytter slik at det ikke kommer heparin i kontakt med DNA-et. Protokoller der heparinase brukes til å fjerne heparin fra DNA-prøver, har vært beskrevet. Reekstraher DNA. Se produsentens retningslinjer for bruk av DNA-ekstraksjonskit.
	DNA-prøve av dårlig kvalitet brukt	Mål DNA-kvaliteten. Forholdet A260/A280 skal være 1,6–2,0 målt med UV-spektrofotometri. Se til at DNA-et er fullstendig resuspendert i løsningen før det brukes.
	Ufullstendig resuspenderte reagenser	Se til at pelletene er fullstendig rehydrert når DNA-et tilsettes. Sentrifuger om nødvendig platen kort. Sørg for at det brukes 10 µl DNA-løsning per reaksjon.
	Termosyklere er ikke riktig satt opp	Se til at PCR-programmet har blitt lagt inn i samsvar med bruksanvisningen. Se til at termosyklere oppvarmede lokk er aktivert og tilstrekkelig strammet. Bruksanvisningen til termosyklere gir ytterligere veiledning.
	Elektroforeseproblemer	Se til at elektroforesetanken er koblet til strøm. Kontroller strømforsyningsenheten og rengjør elektrodene. Kjør gelen i 0,5 x TBE-buffer. Sørg for at det brukes fersk etidiumbromid med en konsentrasjon på 0,5 µg/ml. Kontroller at det er nok UV-belysning ved gelfotograferingen. Geltank- og strømforsyningsprodusentens bruksanvisning gir ytterligere veiledning.

	Uriktig forsegling av plater	<p>Hvis platene er utilstrekkelig forseglet, kan det føre til fordampning under PCR-en. Biofortuna leverer anbefalt forseglingsfilm (produktnummer BF-40-11).</p> <p>Se til at det er nok forsegling over alle brønnene. Vær spesielt nøye med de brønnene som ligger nær kantene av PCR-platen eller -stripsen.</p>
Tilfeldig utfall av kontrollamplikoner og/eller allelspesifikke amplikoner	Gelfeil	<p>Se til at alle brønnene har blitt satt på gelen i riktig rekkefølge, og at det ble tilsatt samme mengde PCR-reaksjon hver gang.</p> <p>Kalibrer pipettene som beskrevet i produsentens bruksanvisning.</p> <p>Kontroller at brønnene er ordentlig formet i gelen. Vær forsiktig ved fjerning av kammer, for det er mulig å rive opp bunnen på brønnene.</p> <p>Se til at agarosen er helt løst opp før gelen støpes.</p> <p>Se til at gelen ikke kjøres for lenge, siden små amplikoner kan løpe av enden.</p> <p>Se til at gelen har blitt kjørt lenge nok til at båndene har kunnet skille seg.</p> <p>Bruk fersk etidiumbromidløsning.</p>
	Problemer med termosykleren	<p>Ikke-amplifikasjon, særlig rundt kanten av analysen, kan skyldes at lokket ikke er satt tett nok på. Det kan føre til fordampning og kondensering av PCR-reaksjonen halvveis oppe i PCR-kyvetten og ikke-amplifikasjon.</p> <p>Se til at du følger produsentens retningslinjer for vedlikehold og kalibrering av termosykleren.</p> <p>Kontroller at PCR-parametrene er i samsvar med det som er angitt i bruksanvisningen.</p>
	Fordampningsproblemer	<p>Se til at det er nok forsegling over alle brønnene. Vær spesielt nøye med de brønnene som ligger nær kantene av PCR-platen eller -stripsen.</p> <p>Se til at det oppvarmede lokket er aktivert, og at kompresjonen via lokket er tilstrekkelig. Biofortuna leverer anbefalt forseglingsfilm (produktnummer BF-40-11).</p>

	Sporadisk ikke-amplifikasjon pga. DNA-problemer	Ikke noe DNA til stede: Se til at det er DNA i alle brønnene. Feil volum: Sørg for at det tilsettes 10 µl DNA-løsning i hver reaksjon. For mye DNA tilsatt: Konsentrasjon over 200 ng kan føre til mislykket PCR. Kontaminering i DNA-et kan føre til sporadisk eller omfattende ikke-amplifikasjon.
Utflytende gelbilde	DNA	Kontroller DNA-ets konsentrasjon og renhet. Hvis PCR-reaksjonene tilsettes for mye DNA, kan gelbildene bli utflytende.
Svak amplifikasjon	Problem med DNA-konsentrasjonen	Kontroller at DNA-konsentrasjonen verken er for høy eller for lav. Ta sikte på 100 ng DNA per reaksjon, i 10 µl.
	Problemer med termosykleren	Se til at du følger produsentens retningslinjer for vedlikehold og kalibrering av termosykleren. Kontroller at PCR-parametrene er i samsvar med det som er angitt i bruksanvisningen.
	Gelfeil	Se til at hver brønn har blitt tilsatt den samme mengden reaksjon, mellom 5 og 10 µl. Kalibrer pipettene som beskrevet i produsentens bruksanvisning. Bruk fersk etidiumbromidløsning.
Ikke-spesifikk amplifikasjon	Problem med DNA-konsentrasjonen	Kontroller at DNA-konsentrasjonen verken er for høy eller for lav. Ta sikte på 50–100 ng DNA per reaksjon, i 10 µl.
	Reaksjonene lastet i feil rekkefølge	Kontroller innretningen av PCR- og gelbrønner Forhindre fysisk overflyt fra tilliggende brønner i elektroforesen. Unngå å overfylle og sørg for at gelen har stivnet før kammene fjernes.

	Nytt allel identifisert	Et nytt amplifikasjonsmønster kan skyldes tidligere usekvenserte alleler. Hvis du bruker gamle tolkningsark, kan du laste ned en nyere sekvensoppdatering fra www.biofortuna.com . Hvis den nye oppdateringen ikke omfatter det nye mønsteret, bør du kontrollere med et annet Biofortuna-kit eller prøve å identifisere sekvensen ved hjelp av sekvensbasert typebestemmelse. Ta alternativt kontakt med Biofortunas kundeservice for ytterligere hjelp og råd.
Amplifikasjonsmønstret kan ikke tolkes	Uriktig tolkning av artefakter som et spesifikt bånd	Undersøk de versjonsspesifikke tolkningstabellene for å finne riktig båndstørrelse. Undersøk om alle spesifikke amplifikasjoner er av riktig størrelse, eller om en artefakt (brønn-til-brønn-kontaminasjon, primer-dimer) har blitt mistolket som en amplifikasjon.
	Reaksjonene lastet i feil rekkefølge	Kontroller hvordan PCR og gelbrønnene er rettet inn.
	Individuell ikke-amplifikasjon	Kontroller at alle interne positive kontroller er til stede. Tolk på nytt uten manglende reaksjoner.
	Små amplikoner mangler	Små amplikoner har blitt elektroforert for langt og har løpt av enden av gelen eller forbi etidiumbromidfronten eller har blitt spredt ved at de har gått inn i den forrige brønnen. Bruk elektroforeseforhold som passer ditt gelsystem.
	Nytt allel identifisert i prøven	Av og til blir det oppdaget alleler som kan gi opphav til amplifikasjonsmønstre som ikke svarer til et eksisterende allel (eksisterende alleler). Kontakt din lokale distributør.