Gebrauchsanweisung für Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01

Version 2

September 2011

CE IVD CE

1. Verwendungszweck

Der Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test dient zur Überprüfung von Laborbereichen und -ausrüstung hinsichtlich PCR-Amplifikatkontaminationen, die durch Biofortuna SSPGo Produkte entstehen können.

2. Einführung

Die PCR ist ein sensitives Verfahren, das anfällig für Kontaminationen mit DNA-Amplifikaten aus einer vorherigen PCR ist. Eine Kontamination kann in nachfolgenden PCRs zu einer falsch-positiven Amplifikation führen, was wiederum eine fehlerhafte Genotypisierung zur Folge haben kann. Sowohl Reagenzien und Proben als auch Laborausrüstung wie Pipetten können mit PCR-Amplifikaten kontaminiert werden. Reagenzien und Laborausrüstung sollten regelmäßig auf Anzeichen für eine Kontamination überprüft werden.

3. Erläuterung des Tests

Jeder SSPGo HLA Wipe Test enthält einen Streifen mit 8 PCR-Vertiefungen mit gefriergetrocknetem PCR-Puffer, Polymerase und Primern, spezifisch für das HLA-DRA-Gen, und bildet ein 187-bp-Amplifikat aus genomischer Human-DNA. Da alle Biofortuna Kits ein DRA-Amplifikat als interne Kontrolle verwenden, weist jede Kontamination durch Verwendung von Biofortuna SSPGo Kits eine Amplifikation des DRA-Gens auf und wird von den Wischtest-Primern nachgewiesen.

Mit jedem Streifen mit 8 Vertiefungen werden bis zu drei Wischtest-Zonen auf Kontaminationen getestet. Jeder Streifen verfügt über integrierte positive und negative Kontroll-Reaktionen sowie über Inhibitionskontroll-Reaktionen für jede Wischtest-Zone. Um eine Zone auf Kontamination zu testen, wird diese zunächst mit einem Tupfer abgewischt, der anschließend in Wasser eingeweicht wird. Dieses Wasser wird als Template im Wischtest und in Form einer 50:50-Mischung mit genomischer DNA als PCR-Inhibitionstest verwendet.

Es wird empfohlen, regelmäßig auf Kontamination zu testen. Zu den typischen zu prüfenden Zonen gehören der DNA-Vorbereitungsbereich, der PCR-Vorbereitungsbereich und der Postamplifikationsbereich. Zu den typischen zu prüfenden Gegenständen gehören Arbeitsflächen, Pipetten, Zentrifugen, Kühl- und Gefrierschrankgriffe, Türgriffe und Regale. Zu den typischen zu prüfenden Lösungen gehören DNA-Vorbereitungspuffer und DNA-Verdünnungsmittel. Mehrzweck-Reagenzien wie z. B. PCR-Puffer und *Taq*-Polymerase sind zwar besonders anfällig für Kontamination, jedoch sind Biofortuna Kits hiervon nicht betroffen, da es sich bei Biofortuna Produkten um komplette Produkte handelt, denen lediglich DNA zugegeben werden muss.

4. Inhalt des Kits

- 12 Streifen mit 8 PCR-Vertiefungen, jeweils mit 10 µl vorpipettierten gefriergetrockneten Primern, Polymerase, dNTPs* und Puffer. Mit den in Folie verpackten Streifen werden jeweils drei Zonen auf Kontamination getestet. Das Schema eines Streifens mit 8 Reaktionen ist nachfolgend dargestellt.

Reaktion	Farbstoff	Verwendung
1	Rot	Positive Kontrolle: DNA
2	Violett	Negative Kontrolle: zum Befeuchten des Tupfers verwendetes Wasser
3	Blau	Zone 1 Inhibitionstest: 50 % DNA, 50 % Wischwasser
4	Violett	Zone 1 Wischtest
5	Blau	Zone 2 Inhibitionstest: 50 % DNA, 50 % Wischwasser
6	Violett	Zone 2 Wischtest
7	Blau	Zone 3 Inhibitionstest: 50 % DNA, 50 % Wischwasser
8	Violett	Zone 3 Wischtest

- 36 sterile Tupfer
- 12 x 8 PCR-Verschlüsse
- 1 Gebrauchsanweisung
- 1 Analysenzertifikat
- Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets, MSDS) können von der Biofortuna Internetseite www.biofortuna.com heruntergeladen werden. Sollte das Herunterladen nicht möglich sein, wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen Kundendienst.

*CleanAmp™ dNTPs stehen unter der Lizenz von Trilink Biotechnologies Inc zur Verwendung in Biofortuna SSPGo Produkten.

5. Nicht mitgelieferte Reagenzien und Laborausstattung

- Geeignete Pipetten und sterile Pipettenspitzen, z. B. P10-Pipette mit 10-µl-Filterspitzen
- Genomische Human-DNA in einer Konzentration von 5 - 10 ng/µl zur Verwendung als positive Kontrolle
- DNA-Isolierungskit/-materialien
- UV-Spektralphotometer
- 2-ml-Polypropylen-Röhrchen
- Steriles Wasser (Molecular Grade)
- 96-Well-Thermocycler mit beheiztem Deckel. Die in Biofortuna Kits verwendeten PCR-Platten und Röhrchen wurden für die Verwendung mit den meisten im Handel erhältlichen Thermocyclern validiert, einschließlich MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS und Techne TC-512 Thermocyclern. Für andere Modelle ist unter Umständen eine weitere Validierung durch den Benutzer erforderlich.
- Gelelektrophorese-Reagenzien (Agarose, 0,5x TBE, DNA-Molekulargewichtsmarker (1.000 bp), 10 mg/ml Ethidiumbromid)
- Gelelektrophorese-Ausrüstung (Geltanks, Netzanschluss, Geldokumentations-System mit UV-Transilluminator)

6. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- Die Tests sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden.
- Alle Reagenzien gemäß den Richtlinien der guten Laborpraxis handhaben.
- Den Prä-PCR-Bereich vom Post-PCR-Bereich trennen. Keine Materialien vom Post-PCR-Bereich zurück in den Prä-PCR-Bereich bringen.
- **Biogefährdung:** Alle Blutprodukte als potentiell infektiös behandeln.
- **Biogefährdung:** Ethidiumbromid ist potentiell karzinogen. Bei der Verwendung stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen.
- **Biogefährdung:** Vorsicht beim Umgang mit UV-Quellen - stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Nie direkt in das UV-Licht schauen.
- Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets) finden Sie unter www.biofortuna.com.

7. Lagerung und Haltbarkeit

Biofortuna SSPGo Kits können bei 4 - 30 °C gelagert werden. Sobald PCR-Gefäße aus den Folienbeuteln entnommen wurden, sollten die Reagenzien innerhalb von 3 Stunden mit Probe rehydratisiert werden. Das Verfallsdatum entnehmen Sie bitte der Verpackung. Die Produkte nicht über das aufgedruckte Datum hinaus verwenden.

Die Kits nicht verwenden, wenn der Folienbeutel gerissen ist oder Löcher aufweist.

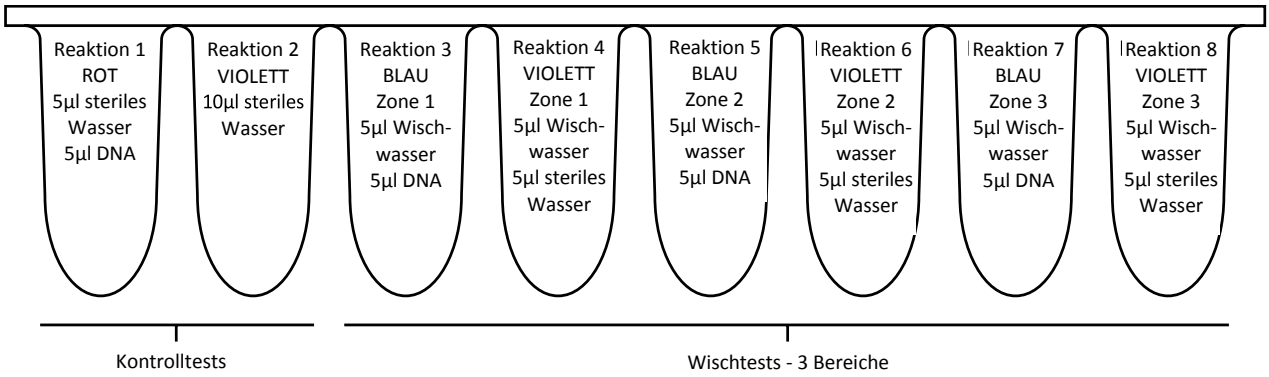
Sicherstellen, dass die PCR-Gefäße nach Zugabe von DNA dicht verschlossen sind, da andernfalls während der PCR-Amplifikation Verdunstung auftreten kann. Dabei insbesondere auf die Ränder und Ecken achten.

8. Anweisungen zur Verwendung

Hinweis:
Da PCR-Pipetten eine häufige Ursache für eine Kontamination darstellen, ist zu empfehlen, die Pipettenspitze und, wenn möglich, das Innere des Kolbens abzutupfen. Darüber hinaus wird empfohlen, alle Kontaminationstests mit einer Pipette durchzuführen, die sich in Tests als negativ erwiesen hat. Wird eine Kontamination festgestellt, gemäß den Richtlinien Ihres Labors die Kontamination beseitigen und die Zonen erneut prüfen.

1. An einem DNA-freien Ort jeweils ein steriles DNase-freies 2-ml-Polypropylen-Röhrchen für jede zu testende Wischtestzone kennzeichnen. Ein zusätzliches Röhrchen als 'Negative Kontrolle' kennzeichnen.
2. Mit einer nachweislich kontaminationsfreien Pipette 500 µl steriles, destilliertes Wasser (Molecular Grade) in jedes der 2-ml-Röhrchen geben.
3. Einen mitgelieferten sterilen Kunststoff-Applikator in jedem Wischtest-Röhrchen anfeuchten.
4. Die zu testende Zone mit dem angefeuchteten Applikator abwischen.
5. Den Kunststoff-Stiel des Applikators abbrechen oder -schneiden und den Tupfer in das ursprüngliche 2-ml-Röhrchen mit Wasser geben.
6. Kurz mit dem Vortex mischen.
7. Den Tupfer mit einer sterilen Pinzette entnehmen und entsorgen.
8. 1 Minute lang bei 10.000 bis 13.000 UpM in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren, um feste Bestandteile zu entfernen.
9. Den Test-Folienbeutel öffnen. Alle Tests müssen mit insgesamt 10 µl Flüssigkeit wie in Abbildung 1 dargestellt rehydratisiert werden.
10. **Negative Kontrolle: 10 µl** steriles Wasser (Molecular Grade) zu Reaktion **2** (negative Kontrolle) (violett) geben.
11. **5 µl** steriles Wasser zu den Reaktionen **1, 4, 6, 8** geben.
12. **Positive Kontrolle**: **5 µl** von 10 ng/µl genomischer Human-DNA zu Reaktion **1** (rote Reaktion) und den Reaktionen **3, 5 & 7** (blau) geben.
13. **Wischtest-Reaktionen: 5 µl** zentrifugierte Flüssigkeit (Wischwasser) aus Wischzone 1 zu den Reaktionen **3 & 4**, aus Wischzone 2 zu den Reaktionen **5 & 6** und aus Wischzone 3 zu den Reaktionen **7 & 8** geben.
14. Alle Reaktionen verfügen nun über ein rehydratisiertes Volumen von 10 µl wie in Abbildung 1 dargestellt. Die Reaktionen mit den mitgelieferten Verschlüssen verschließen und mit den üblichen SSPGo PCR-Parametern wie nachfolgend dargestellt fortfahren.

Abbildung 1



HINWEIS ZUR RESUSPENSION: Sicherstellen, dass die PCR-Mischungen innerhalb von 3 Stunden nach der Entnahme der Platte aus dem Folienbeutel mit den Proben resuspendiert werden.

HINWEIS ZUR HÖHE DER PCR-PLATTE/STREIFEN: Es wird empfohlen, dass die Platten und Streifen dieselbe Höhe aufweisen, wenn sie im selben PCR-Gerät verwendet werden. Bei unterschiedlicher Höhe kann es zu unzureichendem Kontakt mit dem beheizten Deckel des PCR-Gerätes kommen. Dies kann zu einer schwachen oder fehlerhaften PCR-Amplifikation führen.

PCR-Parameter

Die folgenden PCR-Parameter sollten verwendet werden. Sicherstellen, dass die Temperaturerhöhungsgeschwindigkeit (ramp speed) mindestens 1 °C pro Sekunde beträgt, und den beheizten Deckel aktivieren. Eine vollständige Gebrauchsanweisung zum Thermocycler entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des Herstellers. Thermocycler sollten gemäß den Akkreditierungsrichtlinien der "American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI)" oder "European Federation of Immunogenetics (EFI)" kalibriert werden.

Denaturierung	94 °C	5 Minuten	
Denaturierung	96 °C	15 Sekunden	10 Zyklen
Anlagerung	66 °C	50 Sekunden	
Extension	72 °C	30 Sekunden	
Denaturierung	96 °C	15 Sekunden	20 Zyklen
Anlagerung	64 °C	50 Sekunden	
Extension	72 °C	30 Sekunden	
HALTEN	15 °C		

Gelelektrophorese

Diese Anweisungen gelten für die horizontale Agarose-Gelelektrophorese: Ein 2%iges Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer herstellen. Wenn das Gel bis auf ca. 60 °C abgekühlt ist, Ethidiumbromid in einer End-Konzentration von 0,5 µg/ml zugeben. Das Gel gießen und Kämme im Mikrotiter-Format einsetzen (z. B. 12 x 8 Vertiefungen mit 9 mm Abstand). Sobald das Gel erstarrt ist, die Kämme entnehmen und das Gel in 0,5x TBE-Puffer legen. Das Gel muss vollständig bedeckt sein. Mindestens 5 µl und höchstens 10 µl aus jeder Platten- bzw. Streifenreaktion in die entsprechende Vertiefung im Gel transferieren und die Position jeder Reaktion notieren. Eine 100-bp-Leiter kann zur Größenbestimmung hilfreich sein. Das Gel 20 Minuten bei 10 V/cm laufen lassen.

Genaue Angaben zur Ausrüstung entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung des Herstellers Ihres Elektrophorese-Gerätes. Die Betrachtung des Gels sollte mit einem UV-Geldokumentations-System mit UV-Transilluminator erfolgen.

9. Interpretation

Testergebnisse für abgewischte Zonen sind nur dann gültig, wenn die positive Kontrolle positiv und die negative Kontrolle negativ ist. Tests für abgewischte Zonen sind nur dann gültig, wenn der entsprechende Inhibitionskontroll-Test positiv ist.

Ein 187-bp-Amplifikat sollte festgestellt werden, wenn eine PCR-Kontamination oder DNA-Kontamination vorliegt. Streifen oder Banden unterschiedlicher Größe können ebenfalls auf eine PCR-Kontamination hindeuten, wohingegen Primer-Dimer und andere Primer-Extensions-Artefakte mit weniger als 100 bp ignoriert werden sollten.

Reaktionen	Farbstoff	Verwendung	Ergebnis	Interpretation	Maßnahme
1	Rot	Positive Kontrolle	187 bp positiv	Test gültig. DNA geeignet. PCR effektiv	
			Keine Amplifikation	Test ungültig	Den gesamten Test mit anderer DNA-Kontrolle wiederholen
2	Violett	Negative Kontrolle	187 bp positiv	Test ungültig. Wasser und/oder Pipette kontaminiert	Mit anderem Wasser und anderer Pipette testen
			Keine Amplifikation	Test gültig. Wasser nicht kontaminiert	
3, 5, 7	Blau	Inhibitionstest	187 bp positiv	Wischtest gültig. Keine Inhibitoren vorhanden	
			Keine Amplifikation	Wischtest ungültig. Potentielle Inhibitoren vorhanden	Bereich mit sterilem Wasser reinigen, wiederholen
4, 6, 8	Violett	Wischtest	187 bp positiv	Kontamination ist vorhanden	Verwendete Pipette separat reinigen. Kontaminierten Bereich mit einer Lösung reinigen, die zum Entfernen von DNA vorgesehen ist. Test wiederholen.
			Keine Amplifikation	Wischtest negativ. Keine Kontamination	

10. Qualitätssicherung und -kontrolle

Test-Überprüfung: Ein PCR-Amplifikat aus einem Biofortuna Kit wurde auf einer festen Oberfläche trocknen gelassen. Der Wischtest wurde mit dem Amplifikat zunächst unverdünnt und anschließend in Verdünnungen von $1x10^{1}$ bis $1x10^{15}$ durchgeführt. Das Amplifikat wurde in Verdünnungen bis einschließlich $1x10^{15}$ nachgewiesen.

Genomische DNA wurde auf einer festen Oberfläche trocknen gelassen. Der Wischtest wurde mit gDNA bei 100 ng/µl und anschließend in Verdünnungen von $1x10^{1}$ bis $1x10^{15}$ durchgeführt. Die DNA wurde in Verdünnungen bis $1x10^{3}$ nachgewiesen.

11. Literatur

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. Biofortuna HLA Wipe Test (v2): Probendokumentationsblatt

Probendokumentationsblatt Es wird empfohlen, vor der Verwendung Kopien dieses Probendokumentationsblattes zu machen, da der Wischtest-Kit über ausreichend Tests für 36 Zonen (3 Wischzonen pro Streifen mit 8 Vertiefungen, 12 Streifen pro Kit).

Testdatum:

Test durchgeführt von:

Genehmigt von:

Weitere Informationen:

Chargenbezeichnung des Kits:

Reaktion	Farbstoff	Verwendung (siehe Anweisungen)	Testergebnis	Maßnahme	Probeninformation
1	Rot	Positive Kontrolle: DNA			
2	Violett	Negative Kontrolle: Wasser			
3	Blau	Zone 1 Inhibitionstest			
4	Violett	Zone 1 Wischtest			
5	Blau	Zone 2 Inhibitionstest			
6	Violett	Zone 2 Wischtest			
7	Blau	Zone 3 Inhibitionstest			
8	Violett	Zone 3 Wischtest			

CE IVD CE

13. Erläuterung der verwendeten Symbole

Σ	Anzahl der Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
	Herstellungsort
IVD	In-vitro-Diagnostikum
	Verfallsdatum
4°C 30°C	Lagertemperatur
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer

14. Kontaktinformationen des Herstellers

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

BIOFORTUNA™
SIMPLY DIAGNOSTICS

15. Übersetzungen

Française :	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
Česky:	Překlady k dispozici
Dansk:	Tilgængelige oversættelser
Ελληνικά:	Διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítás rendelkezésre áll
Norsk:	Tilgjengelige oversettelser
Polski:	Tłumaczenia dostępne
Português:	Traduções disponíveis
Русский:	Переводы доступны
Slovensky:	Preklady k dispozícii
Türkçe:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

Änderungsverzeichnis

Bei diesem Dokument handelt es sich um Version 2.
Korrigiert wurden die Anweisungen in Abschnitt 8 sowie die Nummerierung der Abschnitte.

CE IVD CE