



Istruzioni per l'uso del Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01

Versione 2

Settembre 2011

1. Finalità d'uso

Il Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test prevede il suo utilizzo per il monitoraggio delle aree e dell'attrezzatura di laboratorio, per rilevare la contaminazione da ampliconi di PCR che può essere generata in seguito all'utilizzo dei prodotti Biofortuna SSPGo.

2. Introduzione

La PCR è una tecnica sensibile, che può subire la contaminazione da ampliconi di DNA provenienti da una PCR precedente. La contaminazione può indurre all'amplificazione di falsi positivi nelle successive reazioni di PCR, dando luogo ad una genotipizzazione non corretta. L'amplicone di PCR può contaminare reagenti e campioni, ma anche l'attrezzatura di laboratorio, ad esempio le pipette. I reagenti e l'attrezzatura di laboratorio vanno monitorati regolarmente, per rilevare eventuali segni di contaminazione.

3. Descrizione del test

Ciascun SSPGo HLA Wipe Test è costituito da una striscia di otto pozzetti per la PCR, contenenti tampone di PCR liofilizzato a freddo, Taq polimerasi e primer specifici per il gene HLA-DRA e produrrà un amplicone di 187bp dal DNA genomico umano. Poiché tutti i kit Biofortuna utilizzano un amplicone del gene DRA come controllo interno, qualsiasi contaminazione provocata dall'uso dei kit Biofortuna SSPGo presenterà l'amplificazione del gene DRA e verrà rilevata dai primer del Wipe Test.

Ciascuna striscia di otto pozzetti permette di analizzare fino a tre zone di monitoraggio per il rilevamento dell'eventuale contaminazione. Ciascuna striscia presenta le reazioni di controllo negativo e positivo e le reazioni di controllo di inibizione per ciascuna delle zone di monitoraggio. Per verificare la contaminazione di una zona, questa viene dapprima strofinata con un tampone che viene successivamente immerso in acqua. Il campione di acqua così ottenuto viene quindi utilizzato come template nel test di monitoraggio e, miscelato in proporzione 50:50 con DNA genomico, come test di inibizione della PCR.

Si raccomanda di verificare la contaminazione regolarmente. Le zone tipiche da analizzare comprendono l'area di preparazione del DNA, l'area di preparazione della PCR e l'area di post-amplificazione. I tipici strumenti da analizzare comprendono: piani di lavoro, pipette, centrifughe, maniglie di frigoriferi e congelatori, maniglie di porte e portacampioni. Le tipiche soluzioni da analizzare comprendono i tamponi di preparazione del DNA e i diluenti del DNA. I reagenti multiuso, come il tampone di PCR e la Taq polimerasi sono particolarmente suscettibili alla contaminazione, ma non nel caso dei kit Biofortuna, dal momento che tali prodotti sono già presenti miscelati nella provetta di reazione, la quale richiede solo l'aggiunta di DNA.

4. Contenuto del kit

- 12 strisce con 8 pozzetti di PCR, contenenti ciascuno 10 µl di: primer Taq polimerasi, dNTP* e tampone di PCR, liofilizzati a freddo e precedentemente dispensati. Ciascuna striscia confezionata singolarmente è ideata per l'analisi della contaminazione di tre zone. Il formato delle strisce a otto pozzetti è illustrato di seguito.

Reazione	Colorante	Uso
1	Rosso	Controllo positivo: DNA
2	Porpora	Controllo negativo: acqua utilizzata per inumidire il tampone
3	Blu	Test inibizione zona 1: 50% DNA, 50% acqua per il monitoraggio
4	Porpora	Test di monitoraggio zona 1
5	Blu	Test inibizione zona 2: 50% DNA, 50% acqua per il monitoraggio
6	Porpora	Test di monitoraggio zona 2
7	Blu	Test inibizione zona 3: 50% DNA, 50% acqua per il monitoraggio
8	Porpora	Test di monitoraggio zona 3

- 36 tamponi sterili
- 12x8 tappi PCR
- 1x istruzioni d'uso
- 1x certificato di analisi
- Le schede MSDS possono essere scaricate dal sito Biofortuna www.biofortuna.com. Nel caso non si riesca ad ottenere questi documenti dal sito, contattare il proprio distributore locale.

*CleanAmp™ dNTPs sono concessi in licenza da Trilink Biotechnologies Inc per l'uso con i prodotti Biofortuna SSPGo.

5. Reagenti e materiali non forniti

- Pipette e puntali per pipette appropriati, per es. pipetta P10 con puntali filtro da 10 µl.
- DNA genomico umano a 5-10 ng/µl da utilizzare come controllo positivo.
- Kit/dispositivo di isolamento del DNA.
- Spettrofotometro UV.
- Provette in polipropilene da 2 ml.
- Acqua sterile di grado molecolare.
- Termociclatore a 96 pozzetti con coperchio riscaldato. Le piastre e le provette per la PCR nei kit Biofortuna sono state validate per l'uso con la maggior parte dei termociclatori disponibili in commercio, compresi i termociclatori MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS e Techne TC-512. Modelli differenti potrebbero richiedere una ulteriore validazione da parte dell'operatore.
- Reagenti per elettroforesi su gel (agarosio, 0,5x TBE, marcatore di peso molecolare di DNA 1000 bp, 10 mg/ml di bromuro di etidio).
- Attrezzatura per elettroforesi su gel (vasche per il gel, alimentazione elettrica, sistema di documentazione gel con transilluminatore UV).

6. Avvertenze e precauzioni

- I test devono essere eseguiti solamente da personale specializzato.
- Trattare tutti i reagenti in base alle norme di buona pratica di laboratorio.
- Le aree di pre e post-PCR devono essere mantenute separate. I materiali di post-PCR non devono essere portati nuovamente nell'area di pre-PCR.
- **Avvertenza rischio biologico:** trattare tutti gli emoderivati come potenzialmente infettivi.
- **Avvertenza rischio biologico:** il bromuro di etidio è un potenziale cancerogeno. Se impiegato, indossare sempre guanti, camice da laboratorio e occhiali protettivi.
- **Avvertenza rischio biologico:** fare attenzione quando si usano fonti UV - indossare sempre guanti, camice da laboratorio e occhiali protettivi. Evitare di guardare direttamente la fonte di luce UV.
- Le schede di sicurezza dei componenti (Material Safety Data Sheets, MSDS) sono disponibili sul sito www.biofortuna.com.



7. Conservazione e stabilità

I kit Biofortuna SSPGo possono essere conservati a 4-30°C. Una volta rimosse le strisce o le piastre per la PCR dai sacchetti, i reagenti devono essere reidratati con il campione entro 3 ore. Per la data di scadenza fare riferimento a quanto riportato sulla confezione. Non utilizzare i prodotti successivamente alla data indicata.

I kit non devono essere usati nel caso il sacchetto sia strappato o perforato.

Assicurarsi dopo aver aggiunto il DNA che le strisce o le piastre per la PCR siano sigillate ermeticamente onde evitare l'evaporazione durante l'amplificazione PCR. Fare particolare attenzione ai lati e agli angoli.

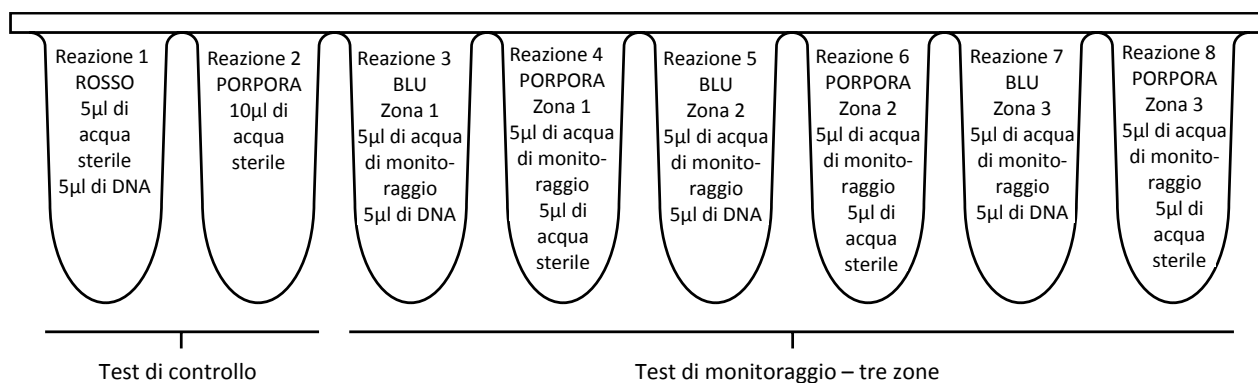
8. Indicazioni d'uso

Nota:

Una fonte frequente di contaminazione sono le pipette utilizzate per la PCR, pertanto si consiglia di strofinare il puntale della pipetta e se possibile anche l'interno del cilindro. Si raccomanda inoltre di eseguire i test di contaminazione utilizzando una pipetta che sia stata analizzata e risultata negativa. Se si rileva una contaminazione, seguire le linee guide del proprio laboratorio per eliminarla ed eseguire nuovamente l'analisi delle zone.

1. In un'area priva di DNA, etichettare una provetta sterile di polipropilene da 2 ml, priva di DNasi per ciascuno dei test di monitoraggio che si intende eseguire. Etichettare una ulteriore provetta come "controllo negativo"
2. Utilizzando una pipetta non contaminata, aggiungere 500 µl di acqua sterile, distillata di grado molecolare in ciascuna delle provette da 2 ml.
3. Inumidire un tampone applicatore di plastica sterile fornito in ciascuna provetta per il test.
4. Strofinare la zona da analizzare con l'applicatore inumidito.
5. Staccare o tagliare il manico di plastica dell'applicatore e metterlo nella provetta originale contenente 2 ml di acqua.
6. Agitare brevemente al Vortex.
7. Rimuovere ed eliminare il tampone con un pinza sterile.
8. Centrifugare per 1 minute a 10.000 - 13.000 rpm in una microcentrifuga per rimuovere le sostanze particolate.
9. Aprire la pellicola del test. Tutti i test devono essere reidratati con un totale di 10 µl di liquido, come illustra il diagramma 1.
10. **Controllo negativo:** aggiungere **10 µl** di acqua sterile di grado molecolare alla reazione del controllo negativo **2** (porpora).
11. Aggiungere **5 µl** di acqua sterile alle reazioni **1, 4, 6, 8**.
12. **Controllo positivo:** aggiungere **5 µl** di DNA genomico umano 10 ng/µl alla reazione **1** (rossa) e alle reazioni **3, 5 e 7** (blu).
13. **Reazioni per il test:** aggiungere **5µl** di liquido centrifugato (acqua per il monitoraggio) dalla zona di monitoraggio **1** alle reazioni **3 e 4**, dalla zona di monitoraggio **2** alle reazioni **5 e 6** e dalla zona di monitoraggio **3** alle reazioni **7 e 8**.
14. Tutte le reazioni adesso avranno 10 µl di volume reidratato, come illustrato dal diagramma 1. Tappare le reazioni con i tappi forniti e procedere con i normali parametri SSPGo PCR illustrati di seguito.

Diagramma 1.



NOTA SULLA RISOSPENSIONE: assicurarsi che le miscele PCR siano risospese con i campioni entro tre ore dalla rimozione del vassoio dal sacchetto.

NOTA SUL CORRETTO PROFILO D'ALTEZZA DELLA STRISCIA/PIASTRA DI PCR: se si posizionano le piastre e le strisce nello stesso dispositivo per la PCR si raccomanda di posizionarle in modo che il profilo dell'altezza sia equivalente. Profili di altezza differenti potrebbero causare un contatto impreciso con il coperchio riscaldato dei dispositivi per la PCR. L'amplificazione PCR potrebbe risultare scarsa o non avvenire.

Parametri PCR

Utilizzare i seguenti parametri per la reazione di PCR. Assicurarsi che le velocità della rampa siano di almeno 1°C al secondo e attivare il coperchio riscaldato. Per informazioni d'uso complete fare riferimento al manuale d'impiego del fabbricante del termociclatore. I termociclatori devono essere calibrati in accordo alle regole di accreditamento dell'American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) o dell'European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturazione	94°C	5 minuti	
Denaturazione	96°C	15 secondi	← 10 cicli
Appaiamento	66°C	50 secondi	
Estensione	72°C	30 secondi	
Denaturazione	96°C	15 secondi	← 20 cicli
Appaiamento	64°C	50 secondi	
Estensione	72°C	30 secondi	
MANTENERE	15°C		

Elettroforesi su gel

Le seguenti istruzioni si riferiscono all'elettroforesi orizzontale su gel di agarosio. Preparare il gel di agarosio al 2% in tampone 0,5x TBE. Una volta che il gel si è raffreddato intorno ai 60°C dispensare bromuro di etidio raggiungendo una concentrazione finale di 0,5 µg/ml. Allestire il gel inserendo i pettini da microtitolazione (per es. 12x8 pozzetti con spazi di 9 mm). Rimuovere quindi i pettini e immergere il gel in tampone 0,5x TBE. Trasferire da un minimo di 5 µl e un massimo di 10 µl da ciascuna piastra o striscia di reazione nel pozzetto corrispondente sul gel annotando la posizione di ciascuna reazione. Per determinare la dimensione dei prodotti di reazione, può essere di ausilio l'utilizzo di una scala da 100 bp. Far correre il gel per 20 minuti a 10 V/cm.

Per dettagli specifici relativi all'attrezzatura, fare riferimento alle istruzioni d'uso del fabbricante del sistema di elettroforesi. Archiviare i gel utilizzando un sistema di acquisizione di immagini con transilluminatore ad UV.

9. Interpretazione

I risultati del test per le zone monitorate sono validi solo se il controllo positivo risulta positivo e quello negativo risulta negativo.

I risultati del test per le zone monitorate sono validi solo il corrispondente test di controllo dell'inibizione è positivo.

Se è presente una contaminazione da prodotto di PCR o da DNA, si osserverà un amplicone di 187bp. Eventuali strisce di amplificato (smears) o bande di ampiezza diversa possono anche indicare una contaminazione da PCR, ma i dimeri di primer e altri artefatti di estensione dei primer inferiori a 100 bp devono essere ignorati.

Reaz.	Colorante	Uso	Risultato	Conclusione	Intervento
1	Rosso	Controllo positivo	187bp +ve	Test valido. DNA idoneo. PCR efficace	
			Nessuna amplificazione	Test non valido	Ripetere completamente l'analisi con un controllo DNA diverso
2	Porpora	Controllo negativo	187bp +ve	Test non valido. Acqua e/o pipette contaminate	Eseguire il test con acqua e pipette diverse
			Nessuna amplificazione	Test valido. Acqua non contaminata	
3, 5, 7	Blu	Test di inibizione	187bp +ve	Test di monitoraggio valido. Inibitori non presenti	
			Nessuna amplificazione	Test di monitoraggio non valido. Potenziali inibitori presenti	Pulire l'area con acqua sterile e ripetere
4, 6, 8	Porpora	Test di monitoraggio	187bp +ve	Contaminazione presente	Isolare e pulire le pipette usate. Pulire l'area contaminata con la soluzione destinata alla rimozione del DNA. Ripetere il test.
			Nessuna amplificazione	Test di monitoraggio negativo. Nessuna contaminazione	

10. Garanzia di qualità e controllo

Analisi del test: l'amplicone di PCR proveniente da un kit Biofortuna è stato lasciato seccare su una superficie solida. Il test è stato eseguito con l'amplicone non diluito e quindi con diluizioni da 1×10^1 a 1×10^{15} . L'amplicone è stato rilevato nelle diluizioni fino a 1×10^{15} .

Il DNA genomico è stato lasciato seccare su una superficie solida. Il test è stato eseguito con gDNA a $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e quindi con diluizioni da 1×10^1 a 1×10^{15} . Il DNA è stato rilevato nelle diluizioni fino a 1×10^3 .

11. Bibliografia

- 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): Registro dei campioni

Registro dei campioni Si raccomanda di fotocopiare il presente registro prima di utilizzarlo, in quanto è possibile eseguire il Wipe Test su 36 zone (3 zone di monitoraggio per ognuna delle 8 strisce di pozzetti, 12 strisce per kit).

Data del test:

Test eseguito da:









Approvato da:

Ulteriori informazioni:

Numero di lotto del kit:

Reazione	Colorante	Uso (vedere le istruzioni)	Risultato del test	Intervento	Informazioni sul campione
1	Rosso	Controllo positivo: DNA			
2	Porpora	Controllo negativo: acqua			
3	Blu	Test inibizione zona 1			
4	Porpora	Test di monitoraggio zona 1			
5	Blu	Test inibizione zona 2			
6	Porpora	Test di monitoraggio zona 2			
7	Blu	Test inibizione zona 3			
8	Porpora	Test di monitoraggio zona 3			

13. Legenda dei simboli utilizzati

	Numero di test
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Sito di produzione
	Diagnostico <i>in vitro</i>
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di lotto
	Numero di catalogo

14. Indirizzo fabbricante

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

**15. Traduzioni**

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

Revisioni

Versione del documento: 2.

Sono state corrette la numerazione delle sezioni e le istruzioni alla sezione 8.