



0318

HLA-B*27

Detection of the HLA-B*27 allele with Real Time PCR

REV ST.RT-53-ENITA.1

REF RT-53 - 48 tests

Instructions For Use

INTRODUCTION AND PURPOSE OF USE

The kit HLA-B*27 is a qualitative test that allows the determination, by means of Real Time PCR, of the presence of HLA-B*27 allele, associated with ankylosing spondylitis (90% of cases).

The Procedure allows the detection of the DNA target by means a genomic amplification reaction. The analysis of the results is made using a Real Time PCR analyzer (thermal cycler integrated with a system for fluorescence detection and a dedicated software).

CONTENT

The kit contains reagents enough to perform 48 amplification tests:

	Quantity	Descrizione
R1	3 x 220 µl	Amplification mMix dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , Taq Polymerase, Nuclease-free water, <i>AmpErase</i> Uracil N-Glycosylase (<i>UNG</i>), ROX (pink Cap)
R2	3 x 130 µl	HLA-B*27 probes Mix Upstream primer 1, Downstream primer 2, downstream primer, Target probes (FAM for HLA-B*27 and VIC internal positive control) Nuclease-free water (white Cap)
R3	3 x 35 µl	HLA-B*27 positive control Cloned DNA corresponding to the HLA-B*27 allele
R4	3 x 35 µl	HLA-B*27 negative control Cloned DNA corresponding to the β-globin gene
R5	1 x 30 µl	Negative Control

MATERIALS AND STRUMENTATION REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Disposable latex powder-free gloves or similar material;
Bench microcentrifuge (12,000 - 14,000 rpm);
Micropipettes and Sterile tips with aerosol filter;
Vortex;
Plastic materials (microplate and optical adhesive cover);
Dry block shaker for 1.5ml conical tubes
Magnetic rack for 1.5ml conical tubes
EZ1 ADV XL DSP DNA Blood Card (ref. 9018702)

Reagents

The **HLA-B*27** kit was developed and validated to be used with the following extraction method:

Manual Extraction

Ref. 51304/51306

QIAmp DNA mini kit. The kit allows the manual DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 50/250 samples. (QIAGEN)

Automatic extraction

Ref. 62124

EZ1 DSP DNA Blood kit. The kit allows the automatic DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 48 samples. (QIAGEN)

Manual/Automatic extraction (Siemens)

10629800 - *VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1*. The kit allows the manual DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 96 samples.

10629801 - *VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2*. The kit allows the manual DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents enough to perform the DNA extraction for 96 samples.

ELITE InGenius®SYSTEM

ELITE InGenius® (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030)

For automatic sample analysis with the instrument «ELITE InGenius®» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) the following generic products are required:

- The extraction cartridges «ELITE InGenius® SP 200» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200)
- The consumables for extraction of nucleic acids from biological samples «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS),
- The box for tips waste «ELITE InGenius® Waste Box» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000),
- The cassettes for amplification of nucleic acids «ELITE InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR),
- The filter tips for the single nozzle pipettor «300 µL Filter Tips Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

The equipment should be regularly maintained, in accordance with the manufacturer's instructions, and calibrated to ensure an optimal performance.

Instruments

The **HLA-B*27** kit was developed and validated to be used with the following instruments:

Extraction System

Ref. 9001492. *EZ1 Advanced XL*.

Robotic Workstation for the automatic purification of the nucleic acids until 14 samples simultaneously (QIAGEN)

Real Time PCR

- 7500 Fast from Lifetechnologies
- StepOne plus from Lifetechnologies
- VERSANT kPCR AD from Siemens or Stratagene MX3005P/MX3000P
- Rotor Gene Q MDx from QIAGEN
- CFX96 Real Time PCR System from Bio-Rad
- LightCycler 480 from Roche

Please ensure that the instruments have been installed, calibrated, checked and maintained according to the manufacturers' instructions and recommendations.

SAMPLES

The **HLA-B*27** system must be used with extracted DNA from the following biological samples: **whole Blood EDTA**. Collected samples must be shipped and stored at +2 - +8°C and used within 3 days from the collected data.

Store the sample at -20°C if it is used after 3 days..

PRECAUTIONS FOR USE

- This kit is for in vitro diagnostics (IVD), for professional use only and not for in vivo use.
- Carefully read this Instruction For Use before using the kit.
- If required, Clonit offers the necessary technical support for the correct use of the kit.
- In compliance with Good Laboratory Practice, define three separate laboratory's areas for: DNA extraction, PCR reaction mix preparation; manipulation of controls provided with the kit. Each area must have dedicated pipettes and laminar flow hood.
- Periodically wipe the working area with 0,5% hypochlorite.
- Wear protective clothing such as laboratory coats and disposable gloves while assaying samples.
- Use powder-free gloves. Do not leave fingerprints on optical caps. Do not write on caps as this may cause an interference with fluorescent detection.
- Avoid any contact between hands and eyes or nose during specimen collection and testing.
- Materials containing or potentially containing infectious agents must always be manipulated in a separated microbiological safety room under a Biohazard biological hood. Waste should be discarded according to local law.
- Never pipette solutions by mouth.
- Use calibrated and regularly checked pipettes and instrumentation only.
- Avoid the air bubbles during the master mix dispensing. Eliminate them before starting amplification.
- Wash hands carefully after handling samples and reagents.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
- Provided reagents are not infectious and hazardous for the health (see Material Safety data Sheet – MSDS).
- The ELITe InGenius® PCR Cassettes must be handled in such a way to reduce as much as possible amplification product diffusion into the environment in order to avoid sample and reagent contamination.

LIMITS OF THE METHOD

The extreme sensitivity of gene amplification may cause false positives due to cross-contamination between samples and/or controls. Therefore, you should:

-physically separate all the products and reagents used for amplification reactions from those used for other reactions, as well as from post-amplification products

- use tips with filters to prevent cross-contamination between samples
- use disposable gloves and change them frequently
- carefully open test tubes to prevent aerosol formation
- close every test tube before opening another one

As with any diagnostic device, the results obtained with this product must be interpreted taking into consideration all the clinical data and other laboratory tests available for the patient

As with any diagnostic device, with this product there is a residual risk of obtaining invalid, false positives or false negatives results.

Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis. The proper functioning of the amplification mix depends on the correct collection, correct transportation, correct storage and correct preparation of a biological sample.

WARNINGS

- Read carefully the instructions for use before using this test.
- Use only extracted DNA from Blood EDTA
- Do not mix reagents from different lots.
- Thaw and carefully mix the reagents of the kit before use.
- The PCR mix has to be freshly prepared every time.

After reconstitution, the amplification master mix must be used in one time (16 reactions). Repeat thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.

- Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
- Do not use the product when stored at temperatures other than those indicated on the labels or described in this Instructions For Use.
- In case of spillage of the kit contents, please refer to the specific Material Safety Data Sheet (MSDS, available on request).
- In case of damaged package, contact the technical support before using the kit.
- In case of any serious incident that has occurred in relation to the device, a notice shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

STORAGE AND STABILITY

Store the product **HLA-B*27** at **-10°C/-20°C**.

The **HLA-B*27** kit is shipped on dry ice. The kit components should be frozen. If one or more components are not frozen upon receipt or if the tubes have been compromised during transport, contact Clonit srl for assistance.

An intact and well stored product has a stability of 12 months from the date of production. Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.

Repeat thawing and freezing of reagents (more than four times) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.

The data of the stability tests show that the kit cod RT-53 maintains an optimum amplification efficiency and is stable for 24 Hours when stored at the room temperature and normal light conditions

ANALYTICAL PROCEDURE

Manual Extraction

Ref. 51304/51306 - QIAmp DNA mini kit (QIAGEN).

Follow the instructions inside the kit QIAmp DNA Mini Kit. Elute the sample in 50 µl of buffer AE.

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C.

Automatic extraction

Ref. 62124 - EZ1 DSP DNA Blood kit on EZ1 Advanced XL instrument.

Follow the instructions inside the kit EZ1 DSP DNA Blood kit. Start from 200 µl of sample and elute it in 50 µl of buffer AE.

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C

Manual extraction (SIEMENS)

Ref. 10629800 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1.

Ref. 10629801 - VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2.

Follow the instructions supplied by Siemens and elute it in 70 µl of Elution buffer. Transfer 55 µl of eluted sample to an appropriately size tube.

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C

OPERATING PROCEDURE FOR ELITE InGenius®SYSTEM

Before starting the session, referring to the instrument documentation, it is necessary to:

- switch on the ELITE InGenius® and select the login mode "CLOSED",
- verify that the amplification controls (**HLA-B*27 Positive Control**, **HLA-B*27 Negative Control** and **Negative Control**) were run in association with the amplification reagent lot to be used and that they are approved and valid (Status). If there are not amplification controls approved or valid, run them as described in the following paragraphs;
- Choose the type of run, following the instructions on the Graphical User Interface (GUI) for the session setup and using the Assay Protocols provided by ELITechGroup S.p.A. These IVD protocols were specifically validated with the ELITE InGenius® instrument and the cited matrix. The Assay protocol available for sample testing with the **HLA-B*27 Kit** product is described in the table below.

Name	Matrix	Report	Characteristics
Clonit HLA B27_200_200	Whole Blood	Positive Negative	Extraction Input Volume: 200 µL Extraction Elute Volume: 200 µL Internal Control: NO Sonication: NO Dilution Factor: 1 PCR Mix volume: 20 µL Sample PCR input volume: 5 µL

The **HLA-B*27 Kit** product, in association with the ELITE InGenius® system, can be used in order to perform:

- Integrated run (Extract + PCR),
- Amplification run, (PCR only),
- Amplification Positive Control and Negative Control run (PCR only).

All the parameters needed for the session are included in the Assay protocol available on the instrument and are automatically recalled when the Assay protocol is selected.

INTEGRATED RUN (EXTRACT + PCR).

To setup an integrated run, carry out the following steps as per the GUI:

1. Thaw the Amplification Mix and the HLA-B*27 probe mix tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
2. Select "Perform Run" from the "Home" screen.
3. Ensure that the "Extraction Input Volume" is 200 µL and the Extracted Elute Volume is 200 µL.
4. For each Track of interest fill in the "SampleID" (SID) by typing or by scanning the sample barcode.
5. Select the Assay protocol to be used in the "Assay" column
6. Ensure that the "Protocol" displayed is: "Extract + PCR".
7. Select the sample loading position in the "Sample Position" column:
 - if a primary tube is used, select "Primary Tube",
 - if a secondary tube is used, select "Extraction Tube".
8. Click "Next" to continue the setup.
9. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
10. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
11. Load the "PCR Cassettes", the "ELITE InGenius® SP 200" extraction cartridges, all the required consumables and the samples to be extracted, following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
12. Close the instrument door.
13. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELITE InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

AMPLIFICATION RUN (PCR ONLY)

To set up the amplification run carry out the following steps as per GUI:

1. Thaw the Amplification Mix and the HLA-B*27 probe mix tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
2. Select "Perform Run" from the "Home" screen.
3. Even if no extraction will be carried out, ensure that the Extraction Input Volume is 200 µL and the Extracted Elute Volume is 200 µL.
4. For each Track of interest fill in the "SampleID" (SID) by typing or by scanning the sample barcode.
5. Select the Assay protocol to be used in the "Assay" column
6. Select "PCR Only" in the "Protocol" column.
7. Ensure the sample loading position in the "Sample Position" column is "Elution Tube (bottom row)". Click "Next" to continue the setup.
8. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
9. Load the "PCR Cassette" and the extracted Nucleic Acid samples following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
10. Close the instrument door.
11. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELITE InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

AMPLIFICATION RUN FOR POSITIVE CONTROL HLA-B*27, NEGATIVE CONTROL HLA-B*27 AND NEGATIVE CONTROL (PCR ONLY)

Before analysis of any sample, it is mandatory to generate and to approve the amplification controls for the amplification reagent lot that will be used in testing:

- as amplification Positive Controls, use the Positive Control HLA-B*27 and the Negative Control HLA-B*27 (provided with this kit) in association with Assay Protocol Clonit HLA B27_PC,
- as amplification Negative Control, use the negative control tube (provided with this kit) in association with Assay Protocol Clonit HLA B27_NC.

To setup the amplification run for amplification controls carry out the following steps as per GUI:

1. Thaw the Amplification Mix and the HLA-B*27 probe mix tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
2. Select "Perform Run" from the "Home" screen.
3. Thaw the Positive Control HLA-B*27 tube, the Negative Control HLA-B*27 tube and the negative control tube for the session.
4. Transfer at least 10 µl of each control to an "Elution tube", provided with the ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set.
5. In the Track of interest, select the Assay protocol to be used in the "Assay" column.

- For the Positive Control HLA-B*27 and Negative Control HLA-B*27, select the Assay Protocol Clonit HLA B27_PC in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date
- For the Negative Control, select the Assay Protocol Clonit HLA B27_NC in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date of the molecular biology grade water. Click "Next" to continue the setup.
- Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
- Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
- Load the "PCR Cassettes", the Positive Control HLA-B*27 tube, Negative Control HLA-B*27Int and the Negative Control tube following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
- Close the instrument door.
- Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELITE InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

Review and approval of results

At the end of the run, the "Results Display" screen is automatically shown. In this screen, the sample/control results and the run information are shown. From this screen it is possible to approve the results, print or save the reports ("Sample Report" or "Track Report"). Refer to the ELITE InGenius® instrument user's manual for more details.

The ELITE InGenius® system generates the results with the product **HLA-B*27 Kit** through the following procedure:

- Validation of amplification Positive Control and Negative Control results,
- Validation of sample results,
- Sample result reporting.

The amplification Positive Control HLA-B*27, Negative Control HLA-B*27 and Negative Control results, specific for the amplification reagent lot, will expire **after 15 days**.

The results of Positive Control HLA-B*27, Negative Control HLA-B*27 and Negative Control amplification runs are used by the instrument software to setup the "Control Charts" monitoring the amplification step performances. Refer to the instrument user's manual for more details.

When the Positive Control HLA-B*27 or Negative Control HLA-B*27 or Negative Control result does not meet the acceptance criteria, the "not passed" message is shown on the "Controls" screen and it is not possible to approve it. In this case, the amplification Positive Control HLA-B*27 or Negative Control HLA-B*27 or Negative Control reaction has to be repeated.

When the Positive Control HLA-B*27 and/or Negative Control HLA-B*27 and/or Negative Control is run together with samples to be tested and its result is invalid, the entire session is invalid. In this case, the amplification of all samples must be repeated too.

For each sample, the assay result is automatically interpreted by the system as established by the ELITE InGenius® software algorithm and the Assay protocol parameters. The sample results are stored in the database and can be exported as "Sample Report" and "Track Report".

Sample Result Reporting

The sample results are stored in the database and can be viewed as "Sample Report" and "Track Report".

The "Sample Report" shows the details of a sample run sorted by Sample ID (SID).

The "Track Report" shows the details of a sample run track by track.

The "Sample Report" and "Track Report" can be printed and signed by authorized personnel.

SOFTWARE SETTING

Lifetechnologies 7500 fast/StepOne plus

Turn the instrument and the computer on and open the control software. Click on "**Advance Setup**": by default the software will shows the page "**experiment properties**". Write in the "**experiment name**" the file name, choose the type of instrument (**7500 or 7500fast / StepOne or StepOne Plus**), the type of reaction (**quantitation standard curve**), the type of reagents used (**Taqman®Reagents**) and the analysis reaction time (**Standard ≈ 2 hours to complete a run**).

Open the page named "**page setup**" (sheet **Define Target and Samples**).

In the window **Define Targets** set:

Target	Reporter	Quencer
HLA-B*27 probe:	FAM	NFQ-MGB
IC (β-globin) probe:	VIC	TAMRA

Set the samples' name in the window "**Define Samples**".

In the same page "**plate setup**" select the sheet "**Assign Target and Samples**". On the screen you will see the microplate draft.

Select an area of the plate where the controls will be placed: select wells of the plate and set both targets (HLA-B*27 and β-globin). Select "**Assign target to selected wells**" in the blank, the "**task Standard (S)**" for HLA-B*27 target.

Choose an area in the plate where negative control will be placed: select wells of the plate and set both targets (HLA-B*27 and β-globin). Select "**Assign target to selected wells**" in the blank, the "**task Negative (N)**" for the HLA-B*27 target.

Select an area of the plate where samples will be placed: select the wells and set both targets (HLA-B*27 and β-globine). Link every well to a sample, through the window "**Assign samples to selected wells**".

For each sample, select in the blank "**Assign targets to selected wells**" the "**task UnKnown (U)**" for the HLA-B*27 target.

Set ROX as passive reference, using it as normalizer of detected fluorescence.

Open "**Run Method**" (sheet **Graphic View**) and set the thermal cycling as follows, with the "collect data" in annealing/extension phase:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

In the window "**Reaction volume plate per well**" set a volume of 25 µl.

After having prepared the plate, and correctly inserted in the instrument, press the button "**Start Run**".

Rotor Gene Q MDx

The experiments can be **set using the Quick Start Wizard or the Advanced Wizard**, which appears when the software is started.

Select the wizard "**Advanced**". As a first step, select the model "**Two Step Reaction**" with a double click in the "**New Run**".

In the next window, select the type of rotor installed on the instrument from the list that appears. Check the "**Locking Ring Attached**", check the checkbox and then click "**Next**". Enter the name of the operator and the reaction volume of 25 µl, and then click "**Next**".

In the next window click on "**edit profile**". Set the following thermal cycle:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Select the annealing/extension from the thermal profile and click on "**Acquiring A to cycling**".

In the next window, select yellow from the **available channels** and add it to **acquiring channel** along with the green channel and click "**OK**". In the next window click on "**OK**" and then click "**Next**".

Click on "Edit Gain" button and set the following values for each channel:

Reporter	Gain
Green	5
Yellow	5

To begin the course, click on the button "Start Run". You can save the model before you begin your run by clicking on "Save Template". After clicking on the button "Start Run" window appears "Save As". The stroke can be saved in the desired position by the user. Once the run started, the window "Edit Samples" allows you to set the name of samples and controls in the positions in which they were loaded on the instrument. Select the locations where they were positioned the controls. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analysed. Select "Positive Control". Enter the concentrations of the controls. Select the location where you placed the Negative Control and name it as Negative Control. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analysed. Select "Negative Controls". Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analysed. Select "Unknown". At the end of the operation click "OK" in the "edit samples" and wait until the end of the race for the analysis (see "Interpretation of Results").

Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P

Turn the instrument on and wait until both green lamps have fixed light, turn on the computer and start the control software. In the main screen will appear the window "New Experiment Options": select "Experiment type": **quantitative PCR (Multiple Standard)**. Turn the lamp on 20 minutes before doing a new experiment. For turning the lamp on, click on the icon of the lamp in the tool bar or select "Lamp On" from the menu "Instruments". Verify the right setting of the gain of the fluorescent reporters: in the menu of settings, choose: "Instrument" and then "Filter set gain setting".

Reporter	Gain
FAM	8
JOE/HEX	4
ROX	1

Click on button "setup" in the tool bar and choose "Plate Setup".

Sign the wells corresponding to positive control. Define the positive control positions in right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Pos. Control FAM	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well it will appear the window "well information". Choose the name of the positive control (*HLA-B*27 Positive control*). Identify the wells correspondent to HLA-B*27 Negative control. Define the Negative control positions in the menu by setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
HLA-B*27 Neg Control	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well will appear the window "well information", and you can set HLA-B*27 Neg. Control as the name. Identify the wells correspondent to Negative control. Define the Negative control positions in the menu by setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
NTC	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well will appear the window "well information", and you can set NTC as the name. Sign the wells correspondent to samples. Define the sample positions in the right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Unknown	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well it will appear the window "well information"; it is possible to write in the name or the code of the sample. It's possible to set the name of the dye near the name of the analysed target:

FAM	HEX
HLA-B*27	β -Globin

In the toolbar choose the sheet "Thermal Profile Setup" and set thermal cycle as follows, with the "collect data" in annealing/extension phase:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

After preparing the plate and inserting it in the instrument, press the button "Run", selecting the sheet Thermal profile status and check the accuracy of the thermal profile. Select the box **Turn Lamp Off** at the end of execution. Push the button Start: the software will ask to indicate the name of saved file and will begin the analysis.

CFX 96 Real Time PCR

Turn the instrument and the computer on and start the control software. In the principal screen will appear the window "Startup wizard": select "CFX96" and press "ok". In the next window push "create new" and set the thermal protocol and the reaction volume (25 μ l), with the "collect data" in annealing/extension phase:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Save the protocol and click the next button. The software will open in default the sheet "plate". Click "create new", select "Fluorophores button" to choose fluorophores (FAM and VIC). Select the locations where they were positioned the controls of known concentration and choose the "Sample Type" **Standards**. Click "Load" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name. Select the location where you placed the Negative Control. Choose the "Sample Type" **NTC**. Click "Load" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name. Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Choose the "Sample Type" **Unknown**. Click "Load" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name.

Save the plate clicking the next button and start the experiment

LightCycler 480

Turn the instrument and the computer on and start the control software. In the principal screen, on "Experiment Creation" select the "Plate type" and push the "New experiment" button. The window "experiment" appears. On the "Run protocol" sheet set: Thermal protocol, Reaction volume (25 μ l) and Detection format (**dual colour hydrolysis probe**), with the "collect data" in annealing/extension phase:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Push the "**Subset editor**" button and in this window, select an area of the plate where controls and samples will be placed.

Push the "**Sample editor**" button. Select the correct workflow (Step1: **Abs quantification**), choose the samples Subset created in the step before and insert the name for each well. Choose the correct type for each well: Positive CTR, Negative CTR or Unknown sample. Push again the "**experiment button**", insert the plate in the instrument and push "**start run**"

PREPARATION OF THE REACTIONS:

Thaw a tube of **Amplification mMix**;

Thaw tube of **HLA-B*27 probe mix**

Mix carefully through vortex **210µl** of **Amplification mMix** with **126µl** of **HLA-B*27 probe mix**

The mix is enough for 16 amplification reactions: **2 positive controls**, **1 negative control** and **13 samples**.

For a total number of tests other than 16, prepare a mixture for $n + 1$ tests, following the volumes shown in the table:

Reagent	Description	Volume for single test (µl)
R1 -	Amplification mMix	12,5
R2	HLA-B*27 probe Mix	7,5

Distribute, in the amplification plate, **20µl** of just reconstituted mix in chosen positions and already setted on the instrument software.

Distribute, in the negative control position, **5µl** of solution taken by **the negative control** vial.

Distribute, in chosen position for each sample, **5µl** of corresponding **sample**.

Distribute, in chosen positions for the positive controls, **5µl** of **HLA-B*27 positive control** and **5µl** of **HLA-B*27 negative control**.

Seal up accurately the plate using an optical adhesive film and verify that there aren't air bubbles in the mix, to avoid the amplification interferences. For the Rotor-Gene Q MDx, seal each tube with the appropriate cap. The air bubbles presence is not influent; the rotor centrifugal force will allow automatic deletion. Transfer the plate in the instrument and push the button "**Start Run**".

QUANTITATIVE ANALYSIS

Lifetechnologies 7500 Fast/StepOne Plus.

At the end of the PCR run, the software automatically opens the "**Analysis**" window in the "**Amplification plot**" sheet on the menu on the left. Select the wells corresponding to the positive control, negative control and samples for analysis.

Select in the "**Option**" window inside the "**Target**" pop-up menu the **HLA-B*27 target**. Check the correct setting of the threshold.

Select in the "**Option**" window inside the "**Target**" pop-up menu the **IC Control target**. Check the correct setting of the threshold.

The analysis of the results is made selecting from the menu in the left the page "**Analysis**". From the page "**Amplification Plot**" verify the amplification plot for every single sample. Opening the sheet "**view well table**" in the right side of the software it is possible to verify the data obtained from experiments: Threshold Cycles, emitted fluorescences etc...

Clicking from the menu file and selecting the box export, the window "**export properties**" will open. Indicate the file name, select the position to save it (**Browse**) and click on button "**Start export**". In this way the software will permit to save a excel file with all the data corresponding to selected experiment.

Rotor-Gene Q MDx

At the end of the PCR run open the "**Analysis**" window. Select the "**Quantification**" sheet and click on "**cycling A (green)**".

Select from the menu "**Dynamic Tube**" and subsequently "**Slope correct**". Check the correct setting of the threshold in the space provided "**CT calculation – Threshold**". Open the "**Analysis**" window. Select the "**Quantification**" sheet and click on "**cycling A (yellow)**". Select from the menu "**Dynamic Tube**" and subsequently "**Slope correct**". Check the correct setting of the threshold in the space provided "**CT calculation – Threshold**". Also in this case, you can print a report of the analysis by clicking on the "**Report**" window and selecting the file in the first **Quantification cycling A (green)** and then the file **cycling A (yellow)**.

Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P

Click on button "**Analysis**" in the toolbar. The software will open in default the sheet "**Analysis Term Setting**". Activate the buttons FAM and HEX in the lower part of the screen and select testing samples.

Click on sheet "**results**"; the software will open in default the page "**Amplification plot**". Check the correct setting of the threshold in the specific window "**Threshold fluorescence**", in the menu on the right of the screen. Selecting the box **Text report** from menu "**Area to Analyse**" in the right side of the screen it's possible to verify the data obtained from the experiments: Threshold Cycles, emitted Fluorescences etc.. From the window **Text Report** it's possible to export the results obtained clicking **file, export** on main menu.

CFX96 Real Time PCR System

At the end of the PCR, select the "**quantitation**" sheet. On the top of the screen, select "**settings**" from the menu and choose "**Baseline Threshold...**". You can export the report pushing the paper block figure on the top of the screen.

LightCycler 480

When the run is completed select analysis and choose the correct kind of analysis you want: "**Abs Quant/Fit Points**". Choose the samples subset you want to analyse. Select the "**NoiseBand**" sheet, under the plot you can choose "**NoiseBand (Fluoresc.)**"; and move the line of the NoiseBand on the plot with the mouse of your PC. Repeat this action for each fluorophore using the "**Filter comb**" button. Clicking the sheet "**Analysis**" you can set the threshold choosing the option "Threshold(manual)".

After setting parameters push the "**Calculate**" button. Repeat this action for each fluorophore.

INTERPRETATION OF RESULTS

In the Real Time PCR reaction the Ct values of specific probe for HLA-B*27 are used for detect the presence of the Target in analysis.

Fluorescence increase of the specific probe for HLA-B*27 (FAM) indicates the positivity of the sample for the target in exam.

As with any diagnostic device, the results obtained with this product must be interpreted taking in consideration all the clinical data and other laboratory tests done on the patient.

The use of positive and negative control in each amplification session allows to verify the correct functioning of the amplification mix and the absence of any contamination.

The instrument software is able to analyse the fluorescences that are emitted by the specific probe for HLA-B*27 (FAM) and by the specific probe for the positive internal control (β -globin VIC). A proper functioning of the amplification mix can be verified analysing these parameters:

Parameters	Ref.
Ctrl HLA-B*27 positive (FAM)	Ct \leq 27
Ctrl HLA-B*27 negative (VIC)	Ct \leq 28

If the amplification reaction of each controls produces a Ct > 27 for the CTRL HLA-B*27 positive, and Ct > 28 for the CTRL HLA-B*27 negative, the session can't be considered valid and so it must be cancelled.

Be sure that there isn't any specific fluorescence increasing for examining target in negative control (FAM).

In the amplification reaction of each sample, the Ct values for the internal control (β -globin) specific probe are used for validating the analysis session beginning from extraction process until detection stage.

A good extraction performances presents internal control (β -globin) threshold cycle between 22 and 25.

Be sure that emitted fluorescence from internal control amplification has not a Ct >28 or undetermined. If a sample presents an undetermined HLA-B*27 and internal control Ct >28 means that some problems happened in the extraction stage or in the amplification stage; therefore the sample could be a false negative. **Repeat the sample.**

Detector FAM	Detector VIC/JOE	Assay	Sample
Ct undetermined	Ct > 28 o undetermined	Not valid	Repeat
Ct undetermined	Ct < 28	Valid	Negative
Ct positive	Ct < 28	Valid	Positive
Ct low	Ct > 28 undetermined	Valid	High Positive

PERFORMANCES

Analytical sensitivity:

The highest dilution (titre) to which a positive sample can be diluted without the system losing the ability to detect it as positive with a rate of $\geq 95\%$ is considered analytical sensitivity.

The HLA-B*27 test identifies a congenital target, totally present or absent in the patient's organism. For this reason the analytical sensitivity of the test is not required and the functionality of the system is validated with the correct identification of the internal control (Ct <28).

Clinical sensitivity:

For the purposes of this evaluation is considered as clinical sensitivity the skill of determining true positives in the totality of positive screened samples. The analysis is made on HLA-B*27 positive samples and the test is performed following the method advices. Positive samples are confirmed with another available method.

Positive Samples	Founded Positive Samples	C.sensitivity
69	69	100%

Obtained results show a clinical sensitivity of 100%.

Diagnostic Specificity:

For the purposes of this evaluation is considered as diagnostic specificity the skill of the method of determining real negative samples. The diagnostic specificity of the system is valued analysing human genomic samples tested and confirmed as negative with another available system.

Negative Samples	Founded Negative Samples	D. specificity
112	112	100%

Diagnostic specificity is 100% for material extracted from EDTA blood.

Analytical Specificity:

Test's specificity is guaranteed by the use of specific primers for determining HLA-B*27.

The alignment of the choose regions for specific primers' hybridization for HLA-B*27 demonstrated: their conservation, the absence of significative mutations and the complete specificity for the analysed target.

Samples recognized as positive for a given genotype must be recognized as such by the amplification system described.

Reproducibility and Repeatability:

The reproducibility and repeatability of the system were valued the synthetic positive control of the kit (HLA-B*27 positive control Cloned DNA corresponding to the HLA-B*27 allele and β -globin gene - HLA-B*27 negative control Cloned DNA corresponding to the β -globin gene) quantified by spectrophotometric analysis and a negative control (negative DNA). For each session, 5 replicates were made in 3 different sessions, performed by different technicians, using 3 different lots of product.

Instrument Average Positive CTRL

Positive Control HLA-B*27	Lot	N° replicates	Med. Reveal. Ct. (FAM)	Med. Reveal. Ct. (VIC)	Inaccuracy % (FAM)	Inaccuracy % (VIC)
	L.62	15	21.34	21.34	0.77%	2.38%
	L.63	15	21.32	21.4	1.75%	2.36%
	L.64	15	21.76	21.63	1.97%	1.02%

The medium inaccuracy Positive CTRL HLA-B*27 % is 1,5% and Positive CTRL Beta globine % is 1,92%

Instrument Average Negative CTRL

Negative Control HLA-B*27	Lot	N° replicates	Med. Reveal. Ct.	Inaccuracy %
	L.62	15	21.73	2.37%
	L.63	15	21.67	1.65%
	L.64	15	22.02	0.38%

The medium inaccuracy Negative CTRL Beta globina % is 1,5%.

Reproducibility and Repeatability FOR ELITE InGenius®SYSTEM

To evaluate the Reproducibility and Repeatability of the HLA-B*27 Kit on the ELITE InGenius integrated instrument and to have at least as same performances obtained with other validated instruments.

The ELITE InGenius® system is a fully automated instrument that integrates operations of extraction and purification of nucleic acids, amplification and detection of the target sequence by Real Time polymerase chain reaction (RT-PCR) and interpretation of the results. A dedicated Assay Protocol for the use of the HLA-B*27 Kit on this platform and interpretation of the results were developed in collaboration with ELITechGroup Spa.

To evaluate the reproducibility and repeatability of the test, two contrived samples plus a negative control were tested in 5 replicates using 3 different lots of the product. The contrived samples were comprised of:

- the synthetic positive control R3 of the kit (HLA-B*27 positive control Cloned DNA) corresponding to the HLA-B*27 allele
- the synthetic positive control R4 of the kit (HLA-B*27 negative control Cloned DNA) corresponding to the β -globin gene

The repeatability and reproducibility was performed using Amplification Run (PCR Only)

Instrument Average Positive CTRL

Positive Control HLA-B*27	Lot	N° replicates	Average Ct (FAM)	Average Ct (VIC)	Inaccuracy % FAM	Inaccuracy % VIC
	L.290921	5	20,99	20,26	3,38%	1,55%
	L.161121	5	20,52	20,25	4,77%	3,98%
	L.191221	5	19,38	20,52	1,44%	0,45%

The average inaccuracy for the Positive Control is 2,55 % for the HLA-B*27 allele and 1,99% for the β -globin gene

Instrument Average Negative CTRL

Negative Control HLA-B*27	Lot	N° replicates	Average Ct (VIC)	Inaccuracy %
	L.290921	5	20,60	4,84 %
	L.161121	5	20,48	2,56 %
	L.191221	5	20,68	0,52 %

The average inaccuracy for the Negative Control is 2,64 %

CROSS-REACTIVITY

To check the cross-reactivity of the assay, we use samples tested as negative for HLA-B*27 that meas to have another HLA allele.
We found the 100% of correlation.

INTERFERENCES:

Verify that in the DNA extracted from the sample there is no contamination from mucoproteins and haemoglobin, to exclude possible inhibition of PCR reaction. The interference due to contaminants can be detected through a spectrophotometric analysis, verifying the ratio between the absorbance readings at 260 nm (maximum absorption of Nucleic Acids) and 280 nm (maximum absorption of Proteins). A pure DNA should have a ratio of approximately 1.8.

QUALITY CONTROL

It is recommended to include in each analytical run, as quality control of every extraction, amplification and detection step, an already tested negative and positive sample, or a reference material with known concentration.
Each batch of HLA-B*27 was produced according to predetermined specifications in order to ensure compliance with the ISO EN 13485 certified quality management system.

BIBLIOGRAPHY

Sun Young Cho, M.D., Kwang Gil Lee, M.T., Su Yon Park, M.D., and Hee Joo Lee, M.D. **Utility of In-House PCR for HLA-B27 Typing: Comparison of Concordance Rate between PCR Kit and In-House PCR.** Korean J Lab Med 2008;28:239-43

O. Nathalang, S. Tantimavanich, K. Nillakupt, P. Arnutti & C. Jaruchaimontree. **HLA-B27 testing in Thai patients using the PCR-SSP technique.** Tissue Antigens ISSN 0001-2815

A. Cauli, G. Dessole, M. T. Fiorillo1, A. Vacca, A. Mameli, P. Bitti2, G. Passiu, R. Sorrentino1 and A. Mathieu. **Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease.** Rheumatology 2002;41:1375–1379

TECHNICAL ASSISTANCE

For any question and support please contact our Technical support:

e-mail: info@clonit.it

phone: +39 02 56814413



0318

HLA-B*27**Determinazione dell'allele HLA-B*27 mediante Real Time PCR****REV** ST.RT-53-ENITA.1**REF** RT-53 - 48 tests**Istruzioni per l'uso****INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO**

Il Kit HLA-B*27 è un saggio qualitativo che consente la determinazione, mediante metodica Real-Time PCR, della presenza dell'allele HLA-B*27 associata, per il 90% dei casi, con la Spondilite Anchilosante.

La procedura prevede il rilevamento del DNA target di interesse mediante una reazione di amplificazione genomica in micropiastre. L'analisi dei risultati viene effettuata tramite uno strumento di Real Time PCR, composto da un thermal cycler provvisto di un sistema di rilevamento della fluorescenza.

COMPOSIZIONE

Il sistema contiene reagenti sufficienti per l'esecuzione di 48 test.

	Quantità	Descrizione
R1	3 x 220 µl	Amplification mMix dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , Taq Polymerase, Nuclease-free water, ROX
R2	3 x 130 µl	HLA-B*27 probes Mix Upstream primer 1, Upstream primer 2, downstream primer 1, downstream primer 2, Target probes (FAM for HLA-B*27 and VIC internal positive control) Nuclease-free water (white Cap)
R3	3 x 35 µl	HLA-B*27 positive control Cloned DNA corresponding to the HLA-B*27 allele
R4	3 x 35 µl	HLA-B*27 negative control Cloned DNA corresponding to the β-globin gene
R5	1 x 30 µl	Controllo negativo

MATERIALE E STRUMENTAZIONE NECESSARIA MA NON FORNITA

Guanti senza polvere monouso in lattice o simili;
Microcentrifuga da banco;
Micropipette e puntali sterili con filtro incorporato per la prevenzione di aerosol;
Vortex;
Materiale plastico monouso sterile (Micropiastre e pellicole ottiche adesive);
Dry block shaker per tubi da 1.5ml
EZ1 ADV XL DSP DNA Blood Card (ref. 9018702)

Reagenti

Il kit **HLA-B*27** è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti metodi di estrazione:

Estrazione Manuale

Ref. 51304/51306

QIAamp DNA mini kit. Il Sistema consente l'estrazione manuale di DNA dai campioni umani in esame. Il kit contiene reagenti utili per 50/250 estrazioni (QIAGEN).

Estrazione Automatica

Ref. 62124 EZ1 DSP DNA Blood kit. Il Sistema consente l'estrazione automatica di DNA dai campioni umani in esame. Il kit contiene reagenti utili per 50/250 estrazioni (QIAGEN).

Estrazione Manuale/Automatica (Siemens)

10629800 - VERSANT Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1. Il Sistema consente l'estrazione del DNA dai campioni in esame. Il kit contiene reagenti utili per 96 estrazioni.

10629801 - VERSANT Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2. Il Sistema consente l'estrazione del DNA dai campioni in esame. Il kit contiene reagenti utili per 96 estrazioni.

ELITE InGenius®SYSTEM

ELITE InGenius® (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030).

Ref. INT030 ELITE InGenius (ELITechGroup S.p.A.). Per l'esecuzione automatica dei test con lo strumento «**ELITE InGenius**» sono inoltre richiesti i seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione da campioni biologici «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS),
- cartucce di amplificazione «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR),
- puntali «**300 µL Filter Tip Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, codice TF-350-L-R-S),
- raccogliatore «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000).

La corretta estrazione degli acidi nucleici può essere eseguita utilizzando sistemi di estrazione alternativi e seguendo le istruzioni del produttore. L'idoneità di nuove procedure di estrazione, per i campioni utilizzabili con il kit HLA-B*27, deve essere validata dall'utente finale.

STRUMENTAZIONE

Il kit **HLA-B*27** è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti:

Estrazione Automatica

Ref. 9001492.

EZ1 Advanced XL. Robotic Workstation. (QIAGEN) per la purificazione automatica degli acidi nucleici fino a 14 campioni simultaneamente (QIAGEN).

Real Time PCR

Il kit **HLA-B*27** è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di Real time PCR:

- 7500 Fast fornito da Lifetechnologies
- StepOne plus fornito da Lifetechnologies
- Versant kPCR AD fornito da Siemens (Stratagene MX3005P)
- Rotor Gene Q MDx fornito da QIAGEN
- CFX96 Real Time PCR System fornito da Bio-Rad
- Light Cycler 480 fornito da Roche

Assicurarsi che gli strumenti siano stati correttamente installati, calibrati e controllati con la manutenzione tecnica appropriata in accordo con le istruzioni del produttore.

CAMPIONI

Il prodotto **HLA-B*27** è progettato per essere utilizzato con DNA estratto dai seguenti campioni biologici: **Sangue intero EDTA**. I campioni raccolti devono essere trasportati e conservati a +2-+8°C ed utilizzati entro 3 giorni dalla data del prelievo. Conservare il campione a -20°C se utilizzato dopo 3 giorni.

PRECAUZIONI D'USO

- Questo kit è per la diagnostica in vitro (IVD), solo per uso professionale e non per uso in vivo.
- Leggere attentamente queste istruzioni per l'uso prima di utilizzare il kit.
- Se richiesto, Clonit offre il supporto tecnico necessario per il corretto utilizzo del kit.
- In conformità con la Buona Pratica di Laboratorio, definire tre aree separate del laboratorio per: estrazione del DNA, preparazione della miscela di reazione PCR; manipolazione dei comandi forniti con il kit. Ogni area deve avere pipette dedicate e cappa a flusso laminare.
- Pulire periodicamente l'area di lavoro con ipoclorito allo 0,5%.
- Indossare indumenti protettivi come camici da laboratorio e guanti monouso durante l'analisi dei campioni.
- Utilizzare guanti senza polvere. Non lasciare impronte sui tappi ottici. Non scrivere sui tappi in quanto ciò potrebbe causare un'interferenza con il rilevamento fluorescente.
- Evitare qualsiasi contatto tra le mani e gli occhi o il naso durante la raccolta e l'analisi dei campioni.
- I materiali contenenti o potenzialmente contenenti agenti infettivi devono essere sempre manipolati in una stanza di sicurezza microbiologica separata sotto una cappa biologica a rischio biologico. I rifiuti devono essere smaltiti secondo la legge locale.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Utilizzare esclusivamente pipette e strumenti calibrati e regolarmente controllati.
- Evitare le bolle d'aria durante l'erogazione della master mix. Eliminarli prima di iniziare l'amplificazione.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area in cui vengono manipolati i campioni e i reagenti del kit.
- I reagenti forniti non sono infettivi e pericolosi per la salute (vedere la scheda di sicurezza del materiale – MSDS).
- Le cartucce di amplificazione (PCR Cassettes) di ELITE InGenius® devono essere manipolate in modo da non disperdere nell'ambiente i prodotti di amplificazione per evitare la possibilità di contaminazioni

LIMITI DEL METODO

L'estrema sensibilità dell'amplificazione genica può causare falsi positivi a causa della contaminazione incrociata tra campioni e/o controlli. Pertanto, si consiglia di:

- separare fisicamente tutti i prodotti e reagenti utilizzati per le reazioni di amplificazione da quelli utilizzati per le altre reazioni, nonché dai prodotti di post-amplificazione;
- utilizzare puntali con filtri per prevenire la contaminazione incrociata tra i campioni;
- usare guanti monouso e cambiarli frequentemente;
- aprire accuratamente le provette per evitare la formazione di aerosol;
- chiudere ogni provetta prima di aprirne un'altra.

Come per qualsiasi dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i dati clinici e gli altri test di laboratorio disponibili per il paziente.

Come con qualsiasi dispositivo diagnostico, con questo prodotto esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi o falsi negativi. Il trattamento farmacologico può interferire con il risultato finale dell'analisi di biologia molecolare.

Il corretto funzionamento della miscela di amplificazione dipende dalla corretta raccolta, corretto trasporto, corretta conservazione e corretta preparazione di un campione biologico. I risultati ottenuti utilizzando il prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e laboratoristici legati al paziente. Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi che non può essere eliminato o ridotto ulteriormente.

AVVERTENZE

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare questo test.
- Utilizzare solo DNA estratto da sangue EDTA
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Scongellare e mescolare accuratamente i reagenti del kit prima dell'uso.
- La miscela PCR deve essere preparata fresca ogni volta.

Dopo la ricostituzione, la miscela di amplificazione deve essere utilizzata in una sola volta (16 reazioni). Evitare di ripetere lo scongelamento e il congelamento dei reagenti (più di due volte), poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test.

I reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente.

- Non utilizzare oltre la data di scadenza che appare sull'etichetta della confezione.
- Non utilizzare il prodotto se conservato a temperature diverse da quelle indicate sulle etichette o descritte nelle presenti Istruzioni per l'uso.
- In caso di fuoriuscita del contenuto del kit, fare riferimento alla specifica Scheda di Sicurezza del Materiale (MSDS, disponibile su richiesta).
- In caso di pacco danneggiato, contattare il supporto tecnico prima di utilizzare il kit.
- In caso di incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo, deve essere notificato un avviso al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utente e/o il paziente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il prodotto **HLA-B*27** a -10°C/ -20°C.

HLA-B*27 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit dovrebbero arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al ricevimento, o se i tubi sono stati compromessi durante il trasporto, contattare Clonit srl per l'assistenza. Il prodotto integro e correttamente conservato ha una stabilità di 12 mesi dalla data di produzione. Non utilizzare oltre la data di scadenza riportata sulla scatola. Il congelamento e scongelamento dei reagenti più di quattro volte dovrebbe essere evitato, in quanto questo potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente. I dati dei test di stabilità mostrano che il kit RT-53 mantiene un'efficienza di amplificazione ottimale ed è stabile per 24 ore se conservato a temperatura ambiente e in condizioni di luce normali

PROCEDURA ANALITICA

Estrazione di DNA genomico

Ref. 51304/51306 - QIAmp DNA mini kit (QIAGEN).

Seguire le istruzioni riportate nel kit QIAmp DNA mini kit. Eluire il campione in 50 µl di buffer AE.

Estrazione Automatica

Ref. 62124 - EZ1 DSP DNA Blood kit su strumento EZ1 Advanced XL.

Seguire le istruzioni riportate nel kit EZ1 DSP DNA Blood kit.

Partire da un volume di campioni pari a 200 µl di campione ed eluire il campione in 50 µl di buffer AE. Il campione così preparato può essere utilizzato subito oppure conservato a -20°C.

Estrazione Manuale (SIEMENS)

Ref. 10629800 - VERSANT Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 1./ Ref. 10629801 - VERSANT Sample Preparation 1.2 Reagents kit box 2.

Seguire le istruzioni fornite da Siemens ed eluire il DNA estratto in 70 µl di Elution buffer. Trasferire 55 µl di eluato in una provetta appropriata. Il campione così preparato può essere utilizzato subito oppure conservato a -20°C.

PROTOCOLLO OPERATIVO PER IL SISTEMA ELITE InGenius®

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario

- accendere ELITE InGenius® e accedere al sistema con la modalità "CLOSED";
- verificare che i controlli di amplificazione (Controllo Positivo HLA-B*27, Controllo Negativo HLA-B*27 e Controllo Negativo) siano ottenuti in associazione al lotto di reagente di amplificazione che si intende usare e che i risultati siano presenti, approvati e non scaduti (Status). Se non sono presenti risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi.
- Scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione e utilizzando i protocolli del saggio forniti da ELITechGroup S.p.A..
- L'Assay Protocol del saggio per l'analisi dei campioni clinici disponibile per il prodotto **HLA-B*27** è descritto nella tabella seguente:

Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
Clonit HLA B27_WB_200_200	Sangue intero	Positivo Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume dell'Eluato Estratto: 200 µL Internal Control: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 5 µL

Il kit **HLA-B*27** in associazione al sistema ELITE InGenius® può essere utilizzato per eseguire:

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- Corsa di Amplificazione Controllo Positivo HLA-B*27, Controllo Negativo HLA-B*27 e Controllo Negativo (PCR only).

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay Protocol del saggio disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol del saggio.

CORSA INTEGRATA (EXTRACT + PCR)

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da GUI

1. Scongellare la provetta di Amplification Mix e di HLA-B*27 probe mix e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Assicurarsi che l'Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL.
4. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay"
6. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
7. Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position": se è utilizzato il tubo primario, selezionare "Primary Tube", se è utilizzato un tubo secondario, selezionare "Extraction Tube".
8. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI.
10. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius® SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, l'ELITE InGenius® permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto

CORSA DI AMPLIFICAZIONE (PCR ONLY)

Per impostare la corsa di amplificazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare la provetta di Amplification Mix e di HLA-B*27 probe mix e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home". Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL.
3. Per ogni Track di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
4. Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay"
5. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
6. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare le "PCR Cassette" e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Chiudere la porta dello strumento.
11. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITE InGenius® permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

CORSA DI AMPLIFICAZIONE PER CONTROLLO POSITIVO HLA-B*27, CONTROLLO NEGATIVO HLA-B*27 e NEGATIVO (PCR ONLY)

Prima dell'analisi di qualunque campione, è obbligatorio amplificare e approvare i controlli di amplificazione per il lotto di reagenti che verrà usato:

- Come Controllo Positivo di amplificazione, usare il Controllo Positivo HLA-B*27 e Controllo Negativo HLA-B*27 (forniti con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit HLA B27_PC.

Come Controllo Negativo di amplificazione, usare il Controllo Negativo (fornito con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit HLA B27_NC

Per impostare la corsa di amplificazione, seguire i seguenti step come indicato dalla GUI:

1. Scongellare la provetta di Amplification Mix e di HLA-B*27 probe mix e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Scongellare la provetta del Controllo Positivo HLA-B*27, Controllo Negativo HLA-B*27 e del controllo negativo.
4. Trasferire almeno 10 µl di ciascun controllo in un "Elution tube" fornito con l'ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set.
5. A partire dalla "Track" di interesse, selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay".
6. Per i Controllo Positivo HLA-B*27 e Controllo Negativo HLA-B*27, selezionare l'Assay Protocol Clonit HLA B27_PC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dei controlli.
7. Per il controllo negativo (bianco di reazione), selezionare l'Assay Protocol del test Clonit HLA B27_NC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo negativo.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'impostazione. ..

9. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le "PCR Cassette", la provetta del Controllo Positivo HLA-B*27, Controllo Negativo HLA-B*27 e la provetta del controllo negativo (bianco di reazione) seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento.
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius®** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa è visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione/controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento ELITE InGenius®.

Il sistema ELITE InGenius® genera i risultati con **HLA-B*27** attraverso questa procedura:

- Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo HLA-B*27, Controllo Negativo HLA-B*27 e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati del campione,
- Refertazione dei risultati del campione.

I risultati dell'amplificazione del Controllo Positivo HLA-B*27, del Controllo Negativo HLA-B*27 e del Controllo Negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono **dopo 15 giorni**.

I risultati dell'amplificazione del Controllo Positivo HLA-B*27, del Controllo Negativo HLA-B*27 e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal software dello strumento per impostare i "grafici di controllo" che monitorano le prestazioni della fase di amplificazione.

Quando il Controllo del Controllo Positivo HLA-B*27 e/o del Controllo Negativo HLA-B*27 e/o il Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo.

In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo del Controllo Positivo HLA-B*27 e/o del Controllo Negativo HLA-B*27 e/o del Controllo Negativo deve essere ripetuta. Se il Controllo del Controllo Positivo HLA-B*27 e/o del Controllo Negativo HLA-B*27 e/o il Controllo Negativo sono processati insieme ai campioni da analizzare ed il loro risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

Per ciascun campione, il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITE InGenius® software** e dai parametri dell'Assay Protocol del saggio.

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati come "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i campioni selezionati (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i Track selezionati.

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

IMPOSTAZIONI DEL SOFTWARE

Lifetechnologies 7500 fast

Accendere lo strumento, il computer ed avviare il software di controllo. Dalla schermata principale del software cliccare sul bottone "**Advanced Setup**": di default il software vi mostra la pagina "**experiment properties**". Digitare nella finestra "**experiment name**" il nome con il quale verrà salvato l'esperimento. Scegliere il tipo di strumento che si utilizza (**7500 o 7500fast – StepOne o StepOne plus**), scegliere il tipo di esperimento (**quantitation-standard curve**), il tipo di reagenti utilizzati (**Taqman reagents**) ed il tempo di reazione (**Standard 2 hours to complete a run**). Aprire la pagina "**page setup**" (sheet **Define Target and Samples**).

Nella finestra "**Define Targets**" impostare:

Target	Reporter	Quencher
HLA-B*27 probe:	FAM	NFQ-MGB
IC (β-globin) probe:	VIC	TAMRA

Nella finestra "**Define Samples**" impostare il nome dei campioni in analisi. Sempre nella pagina "**plate setup**" selezionare lo sheet "**Assign Target and Samples**": comparirà nella vostra schermata la piastra schematizzata. Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati il *controllo HLA-B*27 positivo* e il *controllo HLA-B*27 negativo*: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare entrambi i target (HLA-B*27 e β-globina). Selezionare nello spazio "**Assign target to selected wells**" il "**task Standard (S)**" per il target HLA-B*27. Scegliere una zona della piastra dove verrà posizionato il controllo negativo: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare entrambi i target (HLA-B*27 e β-globina). Selezionare nello spazio "**Assign target to selected wells**" il "**task Negative (N)**" per il target HLA-B*27. Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i campioni: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare entrambi i target (HLA-B*27 e β-globina). Associare ad ogni pozzetto un campione in analisi mediante la finestra "**Assign samples to selected wells**". Selezionare per ciascun campione nell'apposito spazio "**Assign targets to selected wells**" il "**task UnKnown (U)**" per il target HLA-B*27. Impostare come passive reference, utilizzato come normalizzatore della fluorescenza rilevata, il **ROX**. Aprire la pagina "**Run Method**" (sheet **Graphic View**) ed impostare il ciclo termico corretto, selezionando "collect data" nella fase di annealing/extension:

Cicli	Denaturazione	Annealing/Extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Nella finestra "**Reaction volume plate per well**" impostare il volume di 25µl.

Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "**Start Run**".

Rotor Gene Q MDx

Nuovi esperimenti possono essere impostati utilizzando la procedura guidata di avvio rapido o la procedura guidata avanzata, che appare quando il software viene avviato. Selezionare la procedura guidata "**Advanced**".

Come primo passo, selezionare il modello "**Two Step Reaction**" con un doppio clic nella finestra "**New Run**". Nella finestra successiva, selezionare il tipo di rotore montato sullo strumento dalla lista che appare. Controllare il "**Locking Ring Attached**", spuntare la casella di controllo e quindi fare clic su "**Avanti**". Inserire il nome dell'operatore e il volume di reazione di 25µl e fare clic su "**Avanti**".

Nella finestra successiva fare clic su "**edit profile**". Impostare ciclo termico seguente:

Cicli	Denaturazione	Annealing/Extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Selezionare la fase di annealing/extension dal profilo termico e fare clic su "**Acquiring to cycling A**". Nella finestra successiva, selezionare il giallo da **available channel** e aggiungerlo a **acquiring channel** insieme al canale verde e fare clic su "**ok**". Nella finestra successiva fare clic su "**ok**" e poi su "**Avanti**". Cliccare sul pulsante "Edit Gain" ed impostare i seguenti valori per i due canali interessati:

Reporter	Gain
Green	5
Yellow	5

Per avviare la corsa, fare clic sul pulsante **"Start Run"**. E' anche possibile salvare il modello prima di iniziare la corsa facendo clic su **"Save Template"**. Dopo aver fatto clic sul pulsante **"Start Run"**, viene visualizzata la finestra **"Save As"**. La corsa può essere salvata nella posizione desiderata dell'utente. Una volta che la corsa è iniziata, la finestra **"Edit Samples"** permette di impostare il nome di campioni e controlli nelle posizioni in cui sono stati caricati sullo strumento. Selezionare la posizione dove è stato posizionato il controllo ad alta concentrazione e nominarla come **HLA-B*27 Positive Control**. Cliccando sulla casellina **"Type"** corrispondente, nel menu a tendina **"Samples"** è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare **"Positive Controls"**. Selezionare la posizione dove è stato posizionato il controllo a Negativo e nominarla come **Negative Control**. Cliccando sulla casellina **"Type"** corrispondente, nel menu a tendina **"Samples"** è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare **"Negative Controls"**. Selezionare la posizione di ogni singolo campione, ed inserire il nome od il codice del paziente. Cliccando sulla casellina **"Type"** corrispondente, nel menu a tendina **"Samples"** è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare **"Unknown"**. Al termine delle operazioni cliccare **"OK"** nella finestra **"edit samples"** e attendere il termine della corsa per l'analisi (vedi interpretazione dei risultati).

Versant kPCR AD (Stratagene MX3005P)

Accendere lo strumento ed attendere che le due lampade verdi abbiano luce fissa, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale del software apparirà la finestra di dialogo **"New Experiment Options"**: selezionare **"Experiment type: quantitative PCR (Multiple Standard)"**. Accendere la lampada almeno 20 minuti prima di eseguire un nuovo esperimento. Per accendere la lampada cliccare sull'icona lampada dalla barra degli strumenti o selezionare **"Lamp On"** dal menù **"Strumenti"**. Verificare la corretta impostazione dei guadagni dei reporter fluorescenti: Nel menù di impostazione scegliere **"Instrument"** e quindi **"Filter set gain setting"**.

Reporter	Gain
FAM	8
JOE/HEX	4
ROX	1

Cliccare sul pulsante **"setup"** nella barra degli strumenti e scegliere lo sheet **"Plate Setup"**.

Contrassegnare i pozzetti corrispondenti al controllo positivo. Definire le posizioni del controllo nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Pos. Control FAM	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo **"well information"** in cui sarà possibile impostare il nome del calibratore (*HLA-B*27 Positive control*). E' possibile inoltre impostare accanto al nome dei fluorofori il nome del target in analisi:

FAM	HEX
HLA-B*27	β-Globin

Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai controlli negativi per HLA-B*27. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
HLA-B*27 Neg Control	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo **"well information"** in cui sarà possibile impostare Neg. Control come nome. Impostare accanto al nome dei fluorofori il nome del target in analisi:

FAM	HEX
HLA-B*27	β-Globin

Contrassegnare i pozzetti corrispondenti al controllo negativo. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
NTC	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo **"well information"** in cui sarà possibile impostare NTC come nome. Impostare accanto al nome dei fluorofori il nome del target in analisi:

FAM	HEX
HLA-B*27	β-Globin

Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai campioni clinici. Definire le posizioni dei campioni nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Unknown	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo **"well information"** in cui sarà possibile impostare il nome o il codice del campione clinico. Impostare accanto al nome dei fluorofori il nome del target in analisi:

FAM	HEX
HLA-B*27	β-Globin

Nella barra degli strumenti scegliere lo sheet **"Thermal Profile Setup"** ed impostare il ciclo termico corretto, selezionando "collect data" nella fase di annealing/extension:

Cicli	Denaturazione	Annealing/Extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante **"Run"**, selezionare lo sheet Thermal profile status e controllare la correttezza del profilo termico. Selezionare la casella **Turn Lamp Off** alla fine dell'esecuzione nella finestra di dialogo. Premere il pulsante **Start**: il software vi chiederà di indicare il nome con cui salvare il file e avvierà l'analisi.

CFX 96 Real Time PCR

Accendere lo strumento, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale del software apparirà **"Startup wizard"**: selezionare **"CFX96"**. Nella schermata successiva premere **"create new"** ed impostare il protocollo termico ed i volumi di reazione (25µl), selezionando "collect data" nella fase di annealing/extension:

Cicli	Denaturazione	Annealing/Extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Salvare il protocollo termico e cliccare **"Next"**. Il software aprirà automaticamente la pagina **"Plate"**. Premere **"create new"**, premere il bottone **"Fluorophores button"** per selezionare i fluorofori corretti (FAM and VIC). Selezionare i pozzetti contenenti i controlli a concentrazione nota e scegliere dal menù a tendina **"Sample Type": Standards**. Cliccare **"Load check boxes"** per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. Selezionare i pozzetti contenenti il controllo negativo e scegliere dal menù a tendina **"Sample Type": NTC**. Cliccare **"Load check boxes"** per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. **Selezionare i pozzetti contenenti i campioni in esame e scegliere dal menù a tendina "Sample Type": Unknown**. **Cliccare "Load check boxes" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. Salvare la piastra cliccando il pulsante "Next" e, non appena preparata la piastra ed averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "Start Run"**.

LightCycler 480

Accendere lo strumento, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale, selezionare "Plate type" da "Experiment Creation" e premere il bottone "New experiment". Viene visualizzata la finestra "experiment". Dalla schermata "Run protocol" impostare: Thermal protocol, Reaction volume (25µl) e Detection format (dual colour hydrolysis probe), selezionando "collect data" nella fase di annealing/extension:

Cicli	Denaturazione	Annealing/Extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
35	95° C 15 sec	60° C 1 min

Premere il pulsante "Subset editor" ed, in questa finestra, selezionare un'area della piastra dove verranno posizionati i controlli e i campioni. Premere il pulsante "Sample Editor". Selezionare il flusso di lavoro corretto (Step1: quantificazione Abs), scegliere i campioni caricati nel "Subset editor" creato nella fase precedente ed inserire il nome corrispondente ad ogni pozzetto.

Scegliere il tipo corretto di ogni pozzetto utilizzato: CTR positivo, CTR negativo o campione incognito. Premere di nuovo il tasto "esperimento", inserire la piastra nello strumento e premere "start run"

ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI:

Scongellare una provetta di Amplification mMix;

Scongellare una provetta di HLA-B*27 probe mix

Miscelare accuratamente mediante vortex 210µl di Amplification mMix e 126µl di HLA-B*27 probe mix (la miscela così prodotta sono sufficienti per l'esecuzione di 16 reazioni di amplificazione: 2 controlli positivi, 1 controllo negativo e 13 campioni).

Per un numero totale di test diverso da 16, preparare una miscela per n+1 test, seguendo i volumi riportati in tabella:

Reagente	Descrizione	Volume per singolo Test (µl)
R1	Amplification mMix	12,5
R2	HLA-B*27 probe mix	7,5

Dispensare, nella piastra di amplificazione, 20 µl della miscela HLA-B*27 appena ricostituita nelle posizioni prescelte e già predisposte sul software dello strumento.

Dispensare, nelle posizioni del controllo negativo, 5µl di soluzione prelevata dalla vial controllo negativo.

Dispensare, nelle posizioni predefinite per ciascun campione, 5µl del campione corrispondente.

Dispensare, nelle posizioni predisposte per i controlli positivi, 5µl di soluzione Controllo positivo HLA-B*27 e 5µl di Controllo Negativo HLA-B*27.

Sigillare accuratamente la piastra mediante l'utilizzo di optichal adhesive film e verificare che, nella miscela, non vi siano bolle d'aria che possano interferire con l'amplificazione. Trasferire la piastra nello strumento e premere il pulsante "Start Run".

ANALISI QUANTITATIVA

Lifetechnologies 7500 Fast

Al termine della corsa di PCR il software apre automaticamente la finestra "Analysis" nella sezione "Amplification plot" posta nel Menu a sinistra.

Selezionare dalla piastra i pozzetti corrispondenti ai controlli positivi, al controllo negativo ed ai campioni in analisi.

Selezionare nella finestra "Option" il Menu a tendina "Target" e impostare HLA-B*27. Inserire il Threshold indicato in tabella.

Selezionare nella finestra "Option" il Menu a tendina "Target" e impostare IC Control. Inserire il Threshold indicato in tabella.

	HLA-B*27 - FAM Threshold	IC Control - VIC Threshold
7500 Fast	0.2	0.09
StepOne Plus	0.2	0.09

Selezionando lo sheet "view well table" è possibile visualizzare al posto della rappresentazione della piastra in analisi, la tabella con i risultati ottenuti. Cliccando sul Menu "file" e successivamente su "export" è inoltre possibile esportare i dati su file excel.

RotorGene Q MDx

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analysis". Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (green)". Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct". Impostare nell'apposito spazio "CT calculation - Threshold" il valore indicato nella tabella. Aprire nuovamente la finestra "Analysis". Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (yellow)". Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct". Impostare nell'apposito spazio "CT calculation - Threshold" il valore indicato nella tabella.

	HLA-B*27 - FAM Threshold	IC Control - VIC Threshold
RotorGene Q	0.1	0.09

Anche in questo caso è possibile stampare un report dell'analisi cliccando sulla finestra "Report" e selezionando nella sezione Quantification prima il file cycling A (green) e successivamente il file cycling A (yellow).

Versant kPCR AD (Stratagene MX3005P)

Fare clic sul pulsante "Analysis" nella barra degli strumenti. Il software aprirà di default lo sheet "Analysis Term Setting". Attivare i pulsanti FAM e JOE/HEX nella parte inferiore dello schermo e selezionare i campioni in esame. Selezionare dalla piastra i pozzetti corrispondenti ai controlli positivi, al controllo negativo ed ai campioni in analisi. Cliccare lo sheet "Results"; il software aprirà di default la pagina "Amplification plot". Impostare i valori di threshold indicati nella tabella nell'apposita finestra "Threshold fluorescence".

	HLA-B*27 - FAM Threshold	IC Control - VIC Threshold
Versant Kpcr	0.2	0.09

Spuntando la casella Text report dal Menu "Area to Analyze" nella parte destra del software è possibile verificare i dati ottenuti dagli esperimenti: Threshold Cycles, Fluorescenze emesse ecc...Dalla finestra Text Report è possibile esportare i risultati ottenuti cliccando dal Menu principale il comando file, export.

CFX96 Real Time PCR System

Alla fine della reazione di PCR, selezionare lo sheet "quantitation". Nella parte alta dello schermo, selezionare "settings" dal menù e scegliere "Baseline Threshold..." per impostare i seguenti parametri:

	HLA-B*27 - FAM Threshold	IC Control - VIC Threshold
CFX 96	100	135

È possibile esportare il report cliccando sulla figura block notes posta nella parte superiore dello schermo.

LightCycler 480

Al completamento della corsa,, selezionare analisi e scegliere il corretto tipo di analisi che si desidera effettuare: "Abs Quant/Fit Points". Scegliere il "samples subset" che si desidera analizzare. Selezionare lo sheet "NoiseBand", sotto il grafico si può scegliere "NoiseBand (Fluoresc.)" e spostare la linea del NoiseBand direttamente dal grafico. Ripetere questa azione per ogni fluoroforo con il pulsante "Filter comb". Cliccando il foglio "Analysis" è possibile impostare il valore del Threshold scegliendo l'opzione "Threshold (manuale)" e. Inserire la soglia indicata in tabella:

	HLA-B*27 - FAM Threshold	IC Control - VIC Threshold
LightCycler	5	8

Dopo aver impostato i parametri di premere il tasto "**Calculate**". Ripetere questa azione per ogni fluoroforo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun campione, i valori di Ct della sonda specifica per HLA-B*27 sono utilizzati per rilevare la presenza del Target in analisi. L'incremento di fluorescenza della sonda specifica per HLA-B*27 (FAM) indica una positività del campione per il target in esame. I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente. L'utilizzo del controllo positivo e negativo all'interno di ogni sessione di amplificazione consente di verificare il corretto funzionamento della miscela e l'assenza di possibili contaminazioni. Il software dello strumento è in grado di analizzare le fluorescenze emesse dalla sonda specifica per HLA-B*27 (FAM) e dalla sonda specifica per il controllo interno (β -globina VIC/JOE). Un corretto funzionamento della miscela di amplificazione può essere verificato analizzando i seguenti parametri:

Parametri	Ref.
Ctrl HLA-B*27 positivo (FAM)	Ct \leq 27
Ctrl HLA-B*27 negativo (VIC)	Ct \leq 28

Se il risultato delle reazioni di amplificazione di entrambi i controlli producono threshold cycle maggiori di 27 per CTRL HLA-B*27 positivo e maggiori di 28 per CTRL HLA-B*27 negativo, la sessione non può considerarsi valida e quindi deve essere ripetuta.

Assicurarsi che non vi sia nel controllo negativo alcun aumento della fluorescenza specifica per il target in esame (FAM).

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun campione, i valori di Ct della sonda specifica per il controllo interno (β -globina) vengono utilizzati per convalidare la sessione d'analisi a partire dal processo di estrazione sino alla fase di detection.

Una buona estrazione presenta controllo interno (β -globin) con threshold cycle compreso tra 22 and 25. Assicurarsi che la fluorescenza emessa dall'amplificazione del controllo interno non presenti un Ct > 28 o undetermined. Se un campione presenta HLA-B*27 undetermined e Ct del controllo interno >28 significa che si sono verificati problemi nella fase di estrazione o nella fase di amplificazione e quindi il campione potrebbe essere un falso negativo. **Ripetere il campione.**

Detector FAM	Detector VIC/HEX	Assay	Sample
Ct undetermined	Ct > 28 or undetermined	Not valid	Repeat
Ct undetermined	Ct < 28	Valid	Negative
Ct positive	Ct < 28	Valid	Positive
Ct low	Ct > 28 undetermined	Valid	High Positive

CARATTERISTICHE FUNZIONALI

Sensibilità Analitica:

Viene considerata sensibilità analitica la maggiore diluizione (titolo) a cui un campione positivo può essere diluito senza che il sistema perda la capacità di rilevarlo come positivo con un rate \geq 95%. Il test HLA-B*27 identifica un target congenito, totalmente presente o assente nell'organismo del paziente. Per questo motivo la sensibilità analitica del test non è richiesta e la funzionalità del sistema viene validata con la corretta identificazione del controllo interno (Ct<28).

Sensibilità clinica:

Ai fini della presente valutazione, viene considerata sensibilità clinica la capacità di determinare campioni positivi per HLA-B*27 sulla totalità dei campioni screenati. L'analisi è stata effettuata seguendo le indicazioni riportate nella metodica confrontandola con un sistema marcato CE già presente in commercio.

Campioni Positivi	Campioni Positivi trovati	Sensibilità clinica
69	69	100%

Risultati ottenuti mostrano una sensibilità clinica del 100%.

Specificità Diagnostica:

Ai fini della presente valutazione viene considerata specificità diagnostica la capacità del metodo di determinare campioni negativi per HLA-B*27. La specificità diagnostica del sistema è stata valutata analizzando campioni genomici umani testati e confermati negativi per HLA-B*27 con un altro sistema presente in commercio.

Campioni Negativi	Campioni Negativi trovati	Specificità Diagnostica
112	112	100%

La specificità diagnostica risulta essere al 100% per i campioni di DNA estratto da sangue intero con EDTA.

Specificità Analitica:

La specificità del test è garantita dall'utilizzo di primers specifici per HLA-B*27 e da probes disegnati appositamente per coprire tutti i sottotipi. L'esame di allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione dei primers specifici con le sequenze disponibili in banca dati ha dimostrato la loro conservazione, l'assenza di mutazioni significative e la completa specificità per i target analizzati. Campioni riconosciuti come positivi per un determinato genotipo devono essere riconosciuti come tali dal sistema di amplificazione descritto.

Riproducibilità e Ripetibilità

La riproducibilità e ripetibilità del sistema sono state valutate analizzando i controlli positivi del kit (controllo HLA-B*27 positivo, DNA clonato corrispondente al allele HLA-B*27 e al gene della beta globina - controllo HLA-B*27 negativo, DNA clonato corrispondente al gene della beta globina) quantificati da analisi spettrofotometrica e un controllo negativo (DNA negativo). Per ogni sessione sono stati preparati 5 replicati, per tre sessioni fatte da operatori differenti, con 3 lotti diversi.

Controllo Positivo HLA B*27	Lot	N° ripetizioni	Ct medio Ct. (FAM)	Ct medio Ct (VIC)	Inaccuratezza % (FAM)	Inaccuratezza % (VIC)
	L.62	15	21.34	21.34	0.77%	2.38%
	L.63	15	21.32	21.4	1.75%	2.36%
	L.64	15	21.76	21.63	1.97%	1.02%

L'inaccuratezza media per il controllo positivo HLA-B*27 è pari a 1,5% e del controllo positivo Beta globina è 1,92%

Controllo Negativo HLA B*27	Lot	N. ripetizioni	Ct medio	Inaccuratezza %
	L.62	15	21.73	2.37%
	L.63	15	21.67	1.65%
	L.64	15	22.02	0.38%

L'inaccuratezza media per il controllo negativo HLA-B*27 è pari a 1,5%

Riproducibilità e Ripetibilità PER IL SISTEMA ELITE InGenius®

Valutare la Riproducibilità e Ripetibilità del Kit HLA-B*27 sullo strumento integrato ELITE InGenius e avere almeno le stesse prestazioni ottenute con altri strumenti validati.

Il sistema ELITE InGenius® è uno strumento completamente automatizzato che integra operazioni di estrazione e purificazione degli acidi nucleici, amplificazione e rilevazione della sequenza bersaglio mediante reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR) e interpretazione dei risultati. Un protocollo di analisi dedicato per l'uso del kit HLA-B*27 su questa piattaforma e l'interpretazione dei risultati sono stati sviluppati in collaborazione con ELITechGroup Spa.

Per valutare la riproducibilità e la ripetibilità del test, sono stati testati due campioni artificiali più un controllo negativo in 5 replicati utilizzando 3 diversi lotti del prodotto. I campioni inventati erano composti da:

- il controllo positivo sintetico R3 del kit (controllo positivo HLA-B*27 Cloned DNA) corrispondente all'allele HLA-B*27
- il controllo positivo sintetico R4 del kit (controllo negativo HLA-B*27 DNA clonato) corrispondente al gene β -globina

La ripetibilità e la riproducibilità sono state eseguite utilizzando Amplification Run (solo PCR)

Controllo Positivo HLA B*27	Lot	N° repetitions	Average Ct (FAM)	Average Ct (VIC)	Inaccuracy % FAM	Inaccuracy % VIC
	L.290921	5	20,99	20,26	3,38%	1,55%
	L.161121	5	20,52	20,25	4,77%	3,98%
	L.191221	5	19,38	20,52	1,44%	0,45%

L'inaccuratezza media per il controllo positivo HLA-B*27 è pari a 2,55% e del controllo positivo Beta globina è 1,99%

Controllo Negativo HLA B*27	Lot	N° repetitions	Average Ct (VIC)	Inaccuracy %
	L.290921	5	20,60	4,84 %
	L.161121	5	20,48	2,56 %
	L.191221	5	20,68	0,52 %

L'inaccuratezza media per il controllo negativo HLA-B*27 è pari a 2,64%

CROSS-REACTIVITY

Per verificare la cross-reattività, sono stati utilizzati campioni negative per HLA-B*27. Questo implica la presenza di altri alleli del complesso. È stata identificata una correlazione al 100%

INTERFERENZE

Verificare che nel DNA estratto dal campione di partenza non vi siano presenti mucoproteine ed emoglobina in modo da escludere eventuali inibizioni nella reazione di PCR. L'interferenza dovuta a contaminanti può essere evidenziata mediante l'analisi spettrofotometrica e rapporto dei dati ottenuti a 260 nm (Assorbimento massimo Acidi Nucleici) e 280 nm (Assorbimento massimo Proteine). Un DNA puro dovrebbe avere un rapporto di circa 1.8.

CONTROLLO QUALITÀ

Si consiglia inoltre di inserire come controllo di qualità interno di ciascuna sessione di estrazione, amplificazione e rilevamento un campione negativo ed un campione positivo già testati in precedenza o materiale di riferimento a titolo noto.

Ogni lotto di HLA-B*27 è stato prodotto seguendo specifiche predeterminate al fine di garantire la conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485.

BIBLIOGRAFIA

Sun Young Cho, M.D., Kwang Gil Lee, M.T., Su Yon Park, M.D., and **Comparison of Concordance Rate between PCR Kit and In-House PCR**. Korean J Lab Med 2008;28:239-43

O. Nathalang, S. Tantimavanich, K. Nillakupt, P. Arnutti & C. Jaruchaimontree. **HLA-B27 testing in Thai patients using the PCR-SSP technique**. Tissue Antigens ISSN 0001-2815






A. Cauli, G. Dessole, M. T. Fiorillo1, A. Vacca, A. Mameli, P. Bitti2, G. Passiu, R. Sorrentino1 and A. Mathieu. **Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease**. Rheumatology 2002;41:1375-1379

ASSISTENZA TECNICA

Per ogni domanda o per assistenza contattare il nostro servizio tecnico:

e-mail: info@clonit.it

phone: +39 02 56814413

Legenda dei Simboli Utilizzati Key to symbols used			
REF	Codice del prodotto Catalogue number		Limitazioni di temperatura Temperature limitation
IVD	Dispositivo medico diagnostico in vitro In Vitro Diagnostic Medical Device	REV	Revisione Revision
LOT	Numero di lotto Batch code		Leggere le istruzioni d'uso Consult instructions for use
	Data di scadenza Use by		Sufficiente per un <n> di test Contains sufficient for <n> tests
	Fabbricante Manufacturer	CE	Conforme ai requisiti della Direttiva 98/79/CE According to 98/79/CE Directive



CLONIT S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano

Production Site: Via Umberto Saba 25 - 20081 Abbiategrasso (MI)

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it



0318
for *in vitro* diagnostic use

ST.RT-53-ENITA.1
Revision 17th November 2022