

## Istruzioni per l'uso

**IT**

# HISTO SPOT<sup>®</sup> SSO Kit

Kit per test di tipizzazione tissutale HLA in biologia molecolare

Per le istruzioni d'uso in formato elettronico si consulti [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

**IVD** **CE** 0123

<b>REF</b> 726010: HISTO SPOT <sup>®</sup> A 4D	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726011: HISTO SPOT <sup>®</sup> A Xtend	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726020: HISTO SPOT <sup>®</sup> B 4D	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726021: HISTO SPOT <sup>®</sup> B Xtend	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726030: HISTO SPOT <sup>®</sup> C 4D	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726040: HISTO SPOT <sup>®</sup> DRB1 4D	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726041: HISTO SPOT <sup>®</sup> DRB1 Xtend	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726045: HISTO SPOT <sup>®</sup> DRB3/4/5	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726050: HISTO SPOT <sup>®</sup> DQB1 4D	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726051: HISTO SPOT <sup>®</sup> DQB1 4D / DQA1	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726060: HISTO SPOT <sup>®</sup> DPB1 (96 test)	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726061: HISTO SPOT <sup>®</sup> DPB1 (24 test)	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726070: HISTO SPOT <sup>®</sup> On-Call Typing Kit	<b>CE</b> 0123
<b>REF</b> 726061: HISTO SPOT <sup>®</sup> Coeliac Disease	<b>CE</b>
<b>REF</b> 726098: HISTO SPOT <sup>®</sup> Reagent Kit	<b>CE</b>

**Indice**

1.	DESCRIZIONE DEL PRODOTTO.....	3
2.	PRINCIPIO DEL TEST .....	4
3.	MATERIALI.....	5
3.1	Reagenti forniti con i kit di tipizzazione HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xextend e HISTO SPOT® Coeliac Disease.....	5
3.2	Reagenti forniti con il kit di tipizzazione HISTO SPOT® On-Call Typing.....	5
3.3	Soluzioni fornite con i kit HISTO SPOT® Reagent .....	5
3.4	Definizione di lotti e batch .....	5
3.5	Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit .....	6
4.	CONSERVAZIONE E STABILITA' .....	6
5.	PROCEDIMENTO DEL TEST.....	6
5.1	Precauzioni di sicurezza e note speciali.....	6
5.2	Estrazione del DNA.....	6
5.3	Amplificazione.....	7
5.3.1	Kit HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xextend e HISTO SPOT® Coeliac Disease .....	7
5.3.2	Kit HISTO SPOT® On-Call Typing .....	8
5.3.3	Programma di PCR.....	8
5.4	Test automatizzato di ibridazione su MR.SPOT® .....	9
5.4.1	Preparazione dei reagenti.....	9
5.4.2	Preparazione di MR.SPOT®.....	10
5.4.3	Trasferimento dei risultati ad un PC per l'interpretazione .....	10
5.4.4	Interpretazione dei risultati.....	10
6.	AVVERTENZE E PRECAUZIONI .....	11
7.	CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI.....	12
7.1	Validazione .....	12
7.2	Reazione di amplificazione PCR .....	12
8.	LIMITI DEL METODO .....	12
9.	CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO .....	13
10.	PROBLEMI E SOLUZIONI.....	13
11.	MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO.....	13
12.	SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE.....	14
13.	BIBLIOGRAFIA.....	14

## 1. DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il sistema HISTO SPOT® SSO è un test di diagnostica in vitro per la tipizzazione tissutale degli alleli HLA in biologia molecolare e fornisce risultati in medio-alta risoluzione. Consiste dei kit di tipizzazione HISTO SPOT®, dei kit reagenti HISTO SPOT®, dello strumento automatico MR.SPOT® per l'esecuzione dei test e del software interpretativo HISTO MATCH.

I kit di tipizzazione HISTO SPOT® contengono tutti i componenti necessari all'allestimento della reazione di PCR e i pozzetti test sul fondo dei quali sono immobilizzate probe oligonucleotidiche sequenza-specifiche per la rilevazione dei prodotti di PCR. Il kit reagenti HISTO SPOT® consiste dei reagenti necessari alle fasi di ibridazione e rilevazione e possono essere usati in combinazione con i kit di tipizzazione HISTO SPOT®. Lo strumento MR.SPOT® è stato appositamente realizzato per l'uso combinato con i kit di tipizzazione HISTO SPOT®, ed è indicato per il processamento da uno a 96 campioni, rendendo il processo di ibridazione, rilevazione ed interpretazione dei risultati del tutto automatico. Per l'interpretazione dei risultati è necessario il software HISTO MATCH.

Sono disponibili differenti tipi e formati di kit per diversi livelli di risoluzione ed applicazioni:

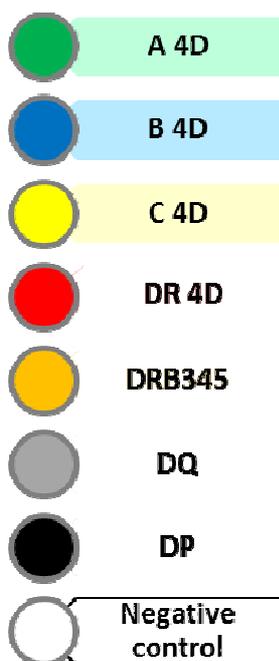
### Kit HISTO SPOT® / HISTO SPOT® 4D

I kit HISTO SPOT® sono stati ideati per fornire risultati non ambigui almeno al livello di gruppo allelico, in altri termini al 1° campo nella nomenclatura standard. Si considerano come ambigue le differenti combinazioni alleliche che coinvolgono alleli di gruppo differente ma che presentano il medesimo pattern di sonde positive.

I kit HISTO SPOT® 4D forniscono generalmente risultati a livello allelico (2° campo) quando viene applicato un filtro per gli alleli comuni (C contenuti nel catalogo CWD 2.0.0).

### Kit HISTO SPOT® On-Call Typing

Il kit HISTO SPOT® On-Call Typing è una combinazione di tutti i test necessari per un trapianto d'organo. Il kit è stato ideato per facilitare il più possibile il procedimento in particolare quando si debba affrontare una situazione di urgenza. I primer per l'amplificazione sono pertanto presemminati e liofilizzati in apposite strip di provette PCR e i singoli test SSO sono già combinati in un telaio nel corretto orientamento (Fig. 1). Il software HISTO MATCH semplifica ulteriormente il flusso di lavoro e l'interpretazione avviene combinatamente per tutti i loci inclusi nel test.



**Figure 1: Configurazione del kit HISTO SPOT® On-Call Typing**

Il controllo negativo contiene primer e sonde per i loci HLA-A, -B e -DRB1.

**Kit HISTO SPOT® Xtend**

I kit HISTO SPOT® Xtend sono costituiti da pozzetti test, complementari ai kit HISTO SPOT® 4D, in grado di fornire risultati a risoluzione maggiore che include gli alleli well documented (WD) indicati nel CWD 2.0.0 catalogue. Generalmente il loro impiego consente di raggiungere un risultato ad alta risoluzione, utilizzando in combinazione il filtro CWD nel software HISTO MATCH per risolvere le ambiguità in singoli campioni.

**Kit HISTO SPOT® Coeliac Disease**

La Malattia celiaca è una reazione autoimmune scatenata dal glutine che è un componente di diversi cereali; qualora non venga diagnosticata precocemente può degenerare in una infiammazione cronica e nella distruzione dell'intestino tenue. La malattia celiaca è fortemente associata con l'aplotipo DQA1\*05:01 - DQB1\*02:01 e DQA1\*03-DQB1\*03:02. Il kit HISTO SPOT® Coeliac Disease rileva gli alleli HLA associati e l'interpretazione mediante il software HISTO MATCH consente di assegnare la classe di rischio (secondo la nomenclatura di Megiorni e Pizzuti, 2012).

**2. PRINCIPIO DEL TEST**

Il test può essere diviso in quattro fasi principali:

- Estrazione del DNA
- Amplificazione tramite PCR
- ibridazione e rilevazione
- interpretazione dei dati.

Sul campione clinico è necessario procedere all'estrazione del DNA, utilizzando un qualsiasi metodo validato nel proprio laboratorio o un kit commerciale. Il DNA viene quindi amplificato con un programma di PCR e una reazione che si avvale di mastermix e  $MgCl_2$  già compresi nel kit. La specificità dell'amplificazione è determinata da un insieme di primer biotinilati che sono stati disegnati in modo da garantire l'amplificazione univoca del locus HLA prescelto. Dopo l'amplificazione, la piastra PCR contenente gli ampliconi marcati con biotina viene trasferita sullo strumento MR.SPOT®. MR.SPOT® aggiunge il tampone di ibridazione ad ogni pozzetto e trasferisce ogni amplicone (diluito in questo tampone) in un pozzetto test sul fondo del quale sono immobilizzate delle probe oligonucleotidiche sequenza-specifiche (SSO). Queste probe sono o sonde oligonucleotidiche singole o la combinazione di due o più sonde singole, immobilizzate nello stesso spot (probe mosaico), disegnate in modo da incrementare l'identificazione dei polimorfismi localizzati in cis.

L'amplicone marcato con biotina si lega a quelle sonde SSO che contengono una sequenza target complementare e il legame può successivamente essere evidenziato da una reazione colorimetrica. Per prevenire il legame aspecifico dell'amplicone sulla superficie del pozzetto test, MR.SPOT® provvede a saturare i pozzetti stessi tramite un tampone di bloccaggio prima di trasferirvi l'amplicone.

A seguito di una fase di lavaggio stringente volta alla rimozione di tutti gli ampliconi non legati, viene aggiunto nel pozzetto il coniugato streptavidina-fosfatasi alcalina, che si lega all'amplicone marcato con biotina e legato alla sonda SSO. Dopo ulteriori lavaggi, si aggiunge il substrato BCIP/NBT che viene convertito in un prodotto dal colore blu-porpora grazie all'azione enzimatica della fosfatasi alcalina. Il pattern di punti colorati risultante sul fondo di ciascun pozzetto test viene fotografato da MR.SPOT® e l'immagine viene trasmessa al software HISTO MATCH residente sul PC dell'operatore. Il software di analisi di immagine HISTO MATCH determina l'intensità di ciascun punto nell'array e ne confronta il livello rispetto al background. Da questi dati si evincono le reazioni positive e negative. Il software HISTO MATCH confronta il pattern di ibridazioni con quello atteso per ogni determinato allele HLA e quindi determina il tipo di allele/i presente/i nel campione.

### 3. MATERIALI

#### 3.1 Reagenti forniti con i kit di tipizzazione HISTO SPOT® locus-specifici

##### 3.1 Reagenti forniti con i kit di tipizzazione HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend e HISTO SPOT® Coeliac Disease

- Strip test confezionate singolarmente per la tipizzazione HLA; ogni strip ospita 8 test e contiene sonde oligonucleotidiche sequenza-specifiche immobilizzate
- **Mastermix**, pronta all'uso, contenente i primer biotinilati per il locus specifico, dNTP, Taq polimerasi, tampone di reazione, 0.05% sodio azide
- **Magnesio cloruro**, 6 mM, pronto all'uso
- CD con istruzioni d'uso, file batch lotto specifico, hit table ed informazioni relative alle sonde.

##### 3.2 Reagenti forniti con i kit di tipizzazione HISTO SPOT® On-Call Typing

- Strip test confezionate singolarmente e combinate con i pozzetti test ordinati in un telaio per una tipizzazione HLA multitest. I pozzetti test contengono sonde oligonucleotidiche sequenzaspecifiche immobilizzate
- **Strip PCR** con primer liofilizzati per l'amplificazione locus specifica del locus HLA da tipizzare
- **Tappini PCR**
- **Buffer PCR** pronto all'uso, contenente dNTPs, Taq polimerasi, tampone di reazione, 0.05% sodio azide
- **Magnesio cloruro**, 6 mM, pronto all'uso
- CD con istruzioni d'uso, file batch lotto specifico, hit table ed informazioni relative alle sonde.

##### 3.3 Soluzioni fornite con i kit HISTO SPOT® Reagent

- **Tampone di bloccaggio**, pronto all'uso, con 0.001% Proclin® 150
- **Tampone di ibridazione**, pronto all'uso, contiene 0.001% colorante, 0.1% sodio dodecil solfato, 0.001% Proclin® 150
- **Tampone di lavaggio stringente**, pronto all'uso, contiene 0.001% colorante, 0.1% sodio dodecil solfato, 0.001% Proclin® 150
- **Tampone di lavaggio TBS** (Tris Buffered Saline), pronto all'uso, contiene 20 mM Tris, 0.003% colorante, 0.001% Proclin® 150
- **Substrato BCIP / NBT**, pronto all'uso, (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitro blue tetrazolio)
- **Coniugato**, Streptavidina – fosfatasi alcalina, concentrato, contiene < 0.1% di sodio azide (da diluire 1:1666 in tampone di bloccaggio).

##### 3.4 Definizione di lotti e batch

- **Kit**: es. **HISTO SPOT® A**, definisce il locus che si intende analizzare
- **Lotto**: es. **A084, A085**, definisce lo schema spaziale e le specificità delle sonde legate sul fondo dei pozzetti reattivi di ciascun kit. Ogni singolo lotto può essere prodotto in batch differenti
- **Batch**: es. **A085-1, A085-2, A085-3**, definisce la reattività di ogni sonda rispetto alle sonde di controllo, è specifico per ogni data produzione, ed è caratterizzato da una precisa data di scadenza. In alcuni batch dello stesso lotto potrebbero esserci delle sonde singole inattivate. Questa informazione è presente sul CD lotto specifico fornito con il kit (Hit Tables – Excel file).

### 3.5 Reagenti e dispositivi richiesti e non inclusi nel kit

- Processore MR.SPOT® (REF 726100), o MR.SPOT® 2.0 (REF 726110)
- Software HISTO MATCH (REF 726102)
- Puntali per pipette per MR.SPOT®, da 1000 µl (REF 726099) e da 200 µl (REF 726097)
- Reagenti per l'estrazione di DNA (si sconsiglia l'uso del metodo salting out)
- Piastre PCR skirted con tappini o film adesivo HISTO SPOT® PCR Frameplates, (REF 726220), HISTO SPOT® PCR Caps, (REF 726090), HISTO SPOT® PCR Foils, (REF 726089)
- Termociclatore
- Acqua deionizzata
- Pipette a volume variabile (range 0,5 – 1000 µl) e puntali consumabili

## 4. CONSERVAZIONE E STABILITA'

I kit vengono spediti a temperatura ambiente. Tutti i reagenti e componenti del kit dovrebbero essere mantenuti a una temperatura tra i +2 °C e + 8 °C. La data di scadenza è indicata sull'etichetta di ciascun componente del kit ed è valida per i reagenti correttamente conservati e tenuti sigillati. La data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione esterna fa riferimento a quella del componente con stabilità minore contenuto nel kit. I kit di tipizzazione devono essere impiegati nella configurazione con la quale sono stati ricevuti (ossia, la mastermix/magnesio cloruro di un lotto non devono essere utilizzati per un test differente). Si raccomanda di conservare i componenti dei kit insieme nella scatola originale.

Strip individuali da 8 pozzetti contenute nei kit tipizzazione HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend e HISTO SPOT® Coeliac Disease possono essere aperte, spezzate in modo da utilizzare solo il numero di pozzetti richiesti e richiudere quelli non utilizzati nella confezione. I pozzetti all'interno di una confezione aperta, però, devono essere utilizzati entro 30 giorni dall'apertura. Si consiglia di prendere nota della data di apertura del blister sul blister stesso. Gli altri reagenti aperti devono essere utilizzati entro 3 mesi. La diluizione del coniugato deve essere preparata sempre fresca prima di ogni test.

## 5. PROCEDIMENTO DEL TEST

### 5.1 Precauzioni di sicurezza e note speciali

Le tecniche di genetica molecolare sono metodi particolarmente sensibili e dovrebbero essere condotte solo da personale adeguatamente istruito ed esperto nel campo della istocompatibilità. I risultati di questi test non devono essere utilizzati come unica fonte per prendere decisioni a livello clinico. Per minimizzare il rischio di false tipizzazioni, occorre seguire le linee guida e gli standard EFI, in particolare nel caso di discrepanze tra i risultati ottenuti con la metodica in sierologia e biologia molecolare.

Occorre seguire particolari condizioni di sicurezza per evitare la contaminazione e quindi reazioni false positive:

- ◆ Indossare i guanti durante il lavoro (se possibile, senza talco).
- ◆ Cambiare il puntale ad ogni fase di dispensazione (con filtro).
- ◆ Separare l'area di lavoro della pre-amplificazione (estrazione del DNA ed allestimento delle reazioni) da quella della post-amplificazione (ibridazione e rivelazione). Preferibilmente, utilizzare due stanze separate.
- ◆ L'amplificato non deve essere riportato nell'area pre-PCR.
- ◆ Utilizzare dispositivi ed altri materiali solo in posti fissi e prescelti e non cambiarli.

### 5.2 Estrazione del DNA

Si consiglia fortemente di utilizzare un kit di estrazione di DNA marcato CE ed IVD; l'impiego di una metodica comunemente utilizzata nel proprio laboratorio deve essere validata dall'utente, si sconsiglia l'utilizzo del metodo di salting out.

Metodi validati di estrazione del DNA:

- colonnine Qiagen

Metodi testati con successo sul campo:

- EZ-1/ Geno M6 (biglie Qiagen)
- Promega Maxwell 16
- QuatroProbe (BeeRobotics)

La presenza di eparina è causa potenziale di inibizione della PCR; pertanto, si consiglia di raccogliere il sangue in provette con EDTA o citrato. I campioni di DNA estratti dovrebbero avere una concentrazione di circa 15-30 ng/μl.

Gli indici di purezza dovrebbero essere i seguenti:

- rapporto delle estinzioni  $OD_{260}/OD_{280}$ :  $> 1.5$  e  $< 2.0$

Valori maggiori sono indicativi della presenza di RNA, valori inferiori segnalano invece la contaminazione con proteine.

- Rapporto delle estinzioni  $OD_{260}/OD_{230}$ :  $> 1.8$

Valori inferiori sono indicativi di una possibile contaminazione con carboidrati, sali o solventi organici.

### 5.3 Amplificazione

#### 5.3.1 Kit HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend e HISTO SPOT® Coeliac Disease

Utilizzare delle piastre PCR skirted per l'amplificazione, poiché devono essere poi bloccate nell'alloggiamento di MR.SPOT® mediante una clamp a chiusura sul bordo. La metodica è stata validata con le HISTO SPOT® PCR Frameplates, piastre di altro fornitore dovranno essere validate dall'utilizzatore. Per ogni campione da amplificare, aggiungere i seguenti reagenti ad ogni provetta PCR:

- 10 μl Mastermix
- 5 μl MgCl<sub>2</sub>
- 5 μl DNA campione (15-30 ng/μl)

Il volume totale di ogni reazione di amplificazione è di 20 μl.

Premix per campioni multipli: no. di campioni+2 x 10 μl Mastermix } utilizzare 15μl di premix  
no. di campioni+2 x 5 μl MgCl<sub>2</sub> } per campione

**Nota:** è importante che la concentrazione del DNA sia nel range indicato tra i 15 e i 30 ng/μl. Concentrazioni maggiori possono generare reazioni false positive sulle sonde e concentrazioni inferiori viceversa possono causare mancanza d'amplificazione.

Nel caso in cui si desideri inserire un **controllo negativo**, preparare una reazione di PCR con acqua distillata in luogo del campione di DNA.

Chiudere le provette da PCR con tappini o film adesivo, effettuare una rapida centrifugata per raccogliere tutto il liquido sul fondo di ogni pozzetto, posizionarle nella griglia del termociclatore e procedere con l'amplificazione secondo il programma di amplificazione descritto in 5.3.3.

### 5.3.2 Kit HISTO SPOT® On-Call Typing

Per ogni test combinato prendere una strip PCR con i PCR primers primer di amplificazione presemminati dal frigorifero.

Allestire una pre-mix con i seguenti componenti per ogni campione:

**80 µl** Buffer PCR  
**40 µl** MgCl<sub>2</sub>  
**40 µl** DNA campione (15-30 ng/µl)

Dispensare 20 µl della pre-mix in ogni pozzetto con i primer presemminati e rispospendere i primer con la pre-mix.

**Nota:** è importante che la concentrazione del DNA sia nel range indicato tra i 15 e i 30 ng/µl. Concentrazioni maggiori possono generare reazioni false positive sulle sonde e concentrazioni inferiori viceversa possono causare mancanza d'amplificazione.

Per il **controllo negativo** nel pozzetto numero 8 dell'**HISTO SPOT® On-Call Typing** allestire una reazione di PCR con acqua distillata in luogo del campione di DNA:

**10 µl** Buffer PCR  
**5 µl** MgCl<sub>2</sub>  
**5 µl** H<sub>2</sub>O

Chiudere le provette da PCR con tappini o film adesivo, effettuare una rapida centrifugata per raccogliere tutto il liquido sul fondo di ogni pozzetto, posizionarle nella griglia del termociclatore e procedere con l'amplificazione secondo il programma di amplificazione descritto in 5.3.3.

### 5.3.3 Programma di PCR

Fase del programma	Tempo	Temperatura	N° di cicli
Prima denaturazione	2 Min	96°C	1 ciclo
Denaturazione	15 Sec	96°C	10 cicli
Annealing + Estensione	60 Sec	65°C	
Denaturazione	10 Sec	96°C	20 cicli
Annealing	50 Sec	61°C	
Estensione	30 Sec	72°C	
Attesa	∞	22°C	

Le condizioni sono identiche per tutti i termociclatori, tuttavia il tempo totale richiesto per l'amplificazione varierà a seconda della velocità di ramping dello specifico strumento in uso. i kit HISTO SPOT SSO sono stati validati coi seguenti modelli di termociclatore:

Applied Biosystems: PE9600, PE9700 (utilizzare la ramp rate del PE9600), Veriti™;

Biorad: PTC100/PTC200, MyCycler;

Eppendorf: Mastercycler EP Gradient S.

Qualora si utilizzino altri tipi di termociclatore, l'operatore dovrà validarli per la metodica HISTO SPOT SSO. Si raccomanda una ramp rate pari a 1-2°C/sec.

Una volta che la fase di amplificazione è stata completata, i campioni possono essere immediatamente processati o tenuti in frigorifero (tra +2°C e +8 °C) fino a 5 giorni. Non congelare gli ampliconi.

Non è necessario controllare l'amplificazione su gel, anche perché il risultato del test potrebbe essere comunque buono sebbene si veda solo una banda molto debole su gel. Nel caso si voglia comunque effettuare un controllo su gel si consiglia di non utilizzare più di 2-3 µl dell'amplificato. Le dimensioni delle bande di amplificazione dei diversi kit sono presenti sul CD informativo fornito con ogni kit (Hit table in formato Excel: seconda cartella "Notes").

## **5.4 Test automatizzato di ibridazione su MR.SPOT®**

### **5.4.1 Preparazione dei reagenti**

Prelevare i reagenti HISTO SPOT® e i pozzetti test fuori dalla confezione, lasciarli equilibrare a temperatura ambiente.

Potrebbero essere visibili cristalli di sale nel tampone di ibridazione e nella soluzione di lavaggio stringente. Nel caso in cui siano presenti tali precipitati, scaldare le soluzioni a 30 °C fino a completo scioglimento. Attenzione: scaldare l'intera soluzione, non solo un'aliquota.

Il coniugato dev'essere diluito nel tampone di bloccaggio ad 1:6666. La diluizione del coniugato dev'essere sempre preparata fresca al momento prima di ogni test.

**Vortexare e quindi eseguire un breve spin della provetta del coniugato prima di procedere allo step di diluizione!**

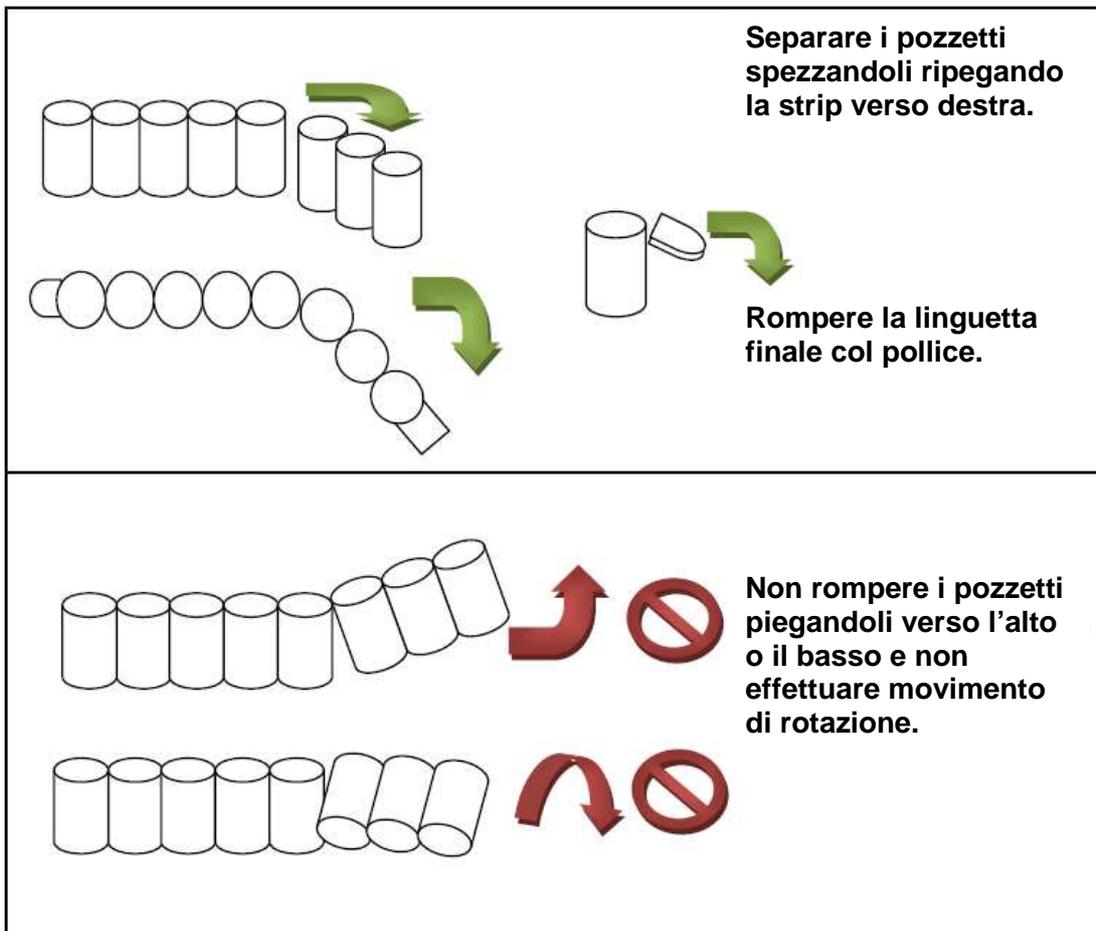
I volumi richiesti dei reagenti variano a seconda del numero di strip o pozzetti da testare. MR.SPOT® indica in automatico le quantità richieste in base al numero delle strip. Riempire i serbatoi corrispondenti con i volumi richiesti per ciascun reagente.

Posizionare i pozzetti test e la piastra da PCR nei loro alloggiamenti su MR.SPOT®. Prestare particolare attenzione al corretto posizionamento della piastra da PCR.

Assicurarsi che non ci siano particelle di polvere o plastica nell'alloggiamento della piastra di reazione, poiché potrebbero disturbare il trasferimento di calore durante l'ibridazione.

Le strip dei pozzetti test dei kit HISTO SPOT®, HISTO SPOT® 4D, HISTO SPOT® Xtend ed HISTO SPOT® Coeliac Disease possono essere separate in pozzetti singoli seguendo le istruzioni nella figura 1, nel caso in cui si debba eseguire un numero di test inferiore ad otto. Nel caso in cui si utilizzino pozzetti separati fare attenzione che siano posizionati in modo corretto nell'alloggiamento, senza che sia bloccato l'inserimento dai pozzetti vicini.

**Assicurarsi di aver aggiunto i pozzetti test dummy nelle posizioni vuote fino a raggiungere un numero di test pari a un multiplo di 4 nel caso in cui si usino pozzetti singoli o strip combinate!**



**Figura 1: Separazione dei pozzetti test singoli.**

#### 5.4.2 Preparazione di MR.SPOT®

Accendere lo strumento Mr.SPOT®, il PC interno e il touch screen. Quando compare la finestra di avvio, procedere come indicato nelle istruzioni a video. Nel manuale d'uso dello strumento MR.SPOT® queste operazioni sono descritte in modo dettagliato.

**Attenzione:** lo strumento Mr.SPOT® e i relativi reagenti devono essere tenuti lontani dalla luce solare diretta.

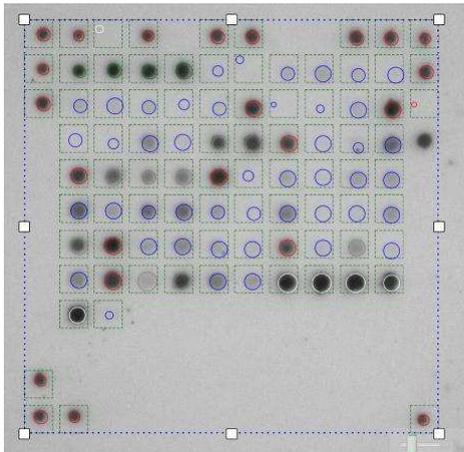
#### 5.4.3 Trasferimento dei risultati ad un PC per l'interpretazione

Trasferire i dati al software interpretativo HISTO MATCH attraverso un cavo di rete o con una chiavetta USB, come descritto nel manuale del software.

#### 5.4.4 Interpretazione dei risultati

Avviare il software HISTO MATCH (può essere installato, qualora non lo fosse, dal CD inviato insieme allo strumento) e procedere con l'interpretazione dei risultati come descritto nel manuale software.

Le immagini dovrebbero risultare come nella figura 2; la figura 3 fornisce lo schema illustrativo del risultato e delle funzioni delle diverse sonde.



Il colore dei cerchi attorno alle sonde indica la loro funzione (si vedano le istruzioni d'uso del software HistoMatch per i dettagli).

Figura 2: Immagine di un risultato per HLA A

●	●		●		●	●			●	●	●
●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	●
●	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	
	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●
	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	●	○	○	○	○	●	○	○	○	
	○	●	○	●	○	○	●	●	●	●	
	●	○									
●											
●	●										●

●: Sonde posizionali: reagiscono con i primer di amplificazione nella mastermix e indicano quindi che la mastermix è stata aggiunta e tutti i reagenti funzionano. Inoltre, consentono al software di localizzare l'immagine. Il pattern è specifico per ogni batch.

●+●: Controllo di amplificazione per l'esone 2 ed esone 3 in duplicato. Queste sonde sono universali per tutti gli alleli del locus rispettivo e mostrano che la PCR ha funzionato. Servono anche come riferimento d'intensità per le sonde allele specifiche.

●: Sonda allele specifica positiva

○: Sonda allele specifica negativa

Figura 3: Illustrazione schematica dei risultati e funzioni delle sonde

## 6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

HISTO SPOT® è stato ideato per uso diagnostico in vitro e dovrebbe essere utilizzato solo da personale adeguatamente istruito e qualificato. Le procedure devono essere eseguite utilizzando la buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practices).

Il materiale biologico utilizzato per l'estrazione del DNA, ad es. tessuti o sangue umano, dovrebbe essere maneggiato come se fosse potenzialmente infettivo. Nel maneggiare materiale biologico si raccomanda di adottare precauzioni di sicurezza adeguate (non pipettare con la bocca, indossare guanti monouso mentre si utilizza materiale biologico e durante il test, disinfettare le mani una volta terminato il test).

Prima dello smaltimento, il materiale biologico deve essere inattivato (ad es. in un ciclo di autoclave). I materiali consumabili dovrebbero essere autoclavati o bruciati dopo l'uso.

Fuoriuscite accidentali di materiale potenzialmente infettivo devono essere immediatamente rimosse con un tessuto di carta assorbente e le aree contaminate devono essere trattate con un disinfettante o con alcool al 70%. Il materiale utilizzato per pulire le fuoriuscite, guanti compresi, dev'essere inattivato prima dello smaltimento (ad esempio in un ciclo di autoclave).

Il tampone di bloccaggio, di ibridazione, di lavaggio stringente e il TBS contengono ProClin®150 mentre la soluzione di magnesio cloruro contiene ProClin®300. La concentrazione di ProClin®300 (0.001%) è molto bassa, si consiglia comunque di evitare il contatto con la pelle e le membrane mucose.

La mastermix e la soluzione del coniugato contengono sodio azide come conservante. La concentrazione di sodio azide è < 0.1%, che non è considerata dannosa. Tuttavia, si consiglia di evitare il contatto con la pelle e le membrane mucose: il sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame e formare metalli esplosivi. Quando si eliminano le soluzioni con sodio azide attraverso gli scarichi del laboratorio, far scorrere una quantità cospicua di acqua in modo da evitare la reazione suddetta.

Maneggiare i reagenti richiede delle opportune precauzioni: indossare una protezione per gli occhi, camice da laboratorio e guanti consumabili. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con acqua abbondante. In caso di mancato trattamento potrebbero manifestarsi delle bruciature.

Nel caso di fuoriuscite accidentali di reagenti, diluire prima con acqua e quindi pulire l'area contaminata. Non mettere in contatto il reagente "Substrate" con metalli o agenti ossidanti.

Smaltire i campioni, i reagenti non utilizzati e gli scarti secondo le legislazioni comunitarie, nazionali e locali.

Durante la preparazione di aliquote dalle bottiglie dei reagenti, porre molta attenzione per evitare contaminazione microbica. Si raccomanda l'uso di pipette consumabili e puntali sterili. Non utilizzare reagenti che presentano una soluzione torbida o evidente contaminazione microbica.

Una dichiarazione relativa alle schede di sicurezza (**MSDS**) può essere scaricata dal sito [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com).

## 7. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

### 7.1 Validazione

Per i kit HISTO SPOT® SSO è stato condotto un lavoro di validazione con 180 campioni. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con altre metodiche (ad es. SSP, sequenziamento). Non si sono osservate discrepanze tra i risultati ottenuti con le diverse metodiche. Per ciascun lotto, la specificità di ogni sonda è stata verificata utilizzando un DNA da campioni di controllo.

### 7.2 Reazione di amplificazione PCR

Le informazioni relative agli alleli amplificati da ogni kit HISTO SPOT® SSO, la versione aggiornata della nomenclatura a cui fanno riferimento, e gli esoni che vengono amplificati sono fornite nelle note specifiche per ogni lotto.

## 8. LIMITI DEL METODO

Poiché variazioni nella concentrazione e qualità del DNA hanno grande influenza sulla resa della reazione di PCR, bisogna usare campioni di DNA che mostrano una concentrazione compresa tra i 15 ed i 30 ng/µl e valori di purezza adeguati (rapporto di assorbanze  $OD_{260}/OD_{280}$  compreso tra 1.5 e 2.0;  $OD_{260}/OD_{230} > 1.8$ ).

Prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti del kit ed altri materiali e dispositivi di laboratorio con amplificati o DNA genomico. Si raccomanda vivamente di eseguire test di contaminazione (wipe test – ad es. con Wipetest della BAG, [REF] 7091) e di includere i controlli negativi in ogni test.

L'ibridazione è un processo critico per la temperatura. Pertanto, i kit HISTO SPOT® SSO devono essere utilizzati solo in combinazione con il processore automatico MR.SPOT® per assicurare tempi e temperature di incubazione corretti.

Tutti gli strumenti e dispositivi (ad es. pipette, termociclatori, blocchi riscaldanti, MR.SPOT®) devono essere calibrati secondo le istruzioni del produttore. In particolare, l'uniformità e l'accuratezza dei termociclatori può essere verificata con il kit BAG Cyler Check ([REF] 7104, 71044).

## 9. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Il controllo di qualità interno dei nuovi lotti di HISTO SPOT® SSO può essere eseguito utilizzando una combinazione di campioni di DNA con genotipo HLA noto.

In ogni pozzetto test sono inseriti dei controlli positivi interni, allo scopo di verificare che la PCR sia avvenuta in modo corretto e si sia verificata l'ibridazione.

Si raccomanda l'uso dei controlli negativi per controllare le possibili contaminazioni. Come controllo negativo, allestire una reazione di PCR senza DNA per ogni test di ibridazione successivo.

## 10. PROBLEMI E SOLUZIONI

Sintomo	Possibili problemi	Soluzioni potenziali
Malfunzionamento dello strumento	Numerosi	Fare riferimento al manuale di MR.SPOT®
Messaggio d'errore durante trasferimento dati	Fallimento nel trasferimento dati	Trasferire manualmente i dati con chiavetta USB
Nessun risultato	La griglia non è correttamente sovrapposta all'immagine	Procedere manualmente alla sovrapposizione della griglia
Nessuno spot nei pozzetti	Non è stata aggiunta la mastermix per la PCR	Ripetere l'intero test, controllando gli amplificati su gel
Solo gli spot di controllo sono positivi	Non è stato aggiunto il DNA per la PCR o non è avvenuta amplificazione	Ripetere l'intero test, controllando gli amplificati su gel
Probe false positive	Troppo DNA o concentrazione di coniugato elevata (mancato spin)	Verificare la concentrazione di DNA, spinnare il coniugato prima dell'utilizzo
Fallita reazione su esone	Concentrazione DNA troppo alta o DNA degradato	Verificare la concentrazione di DNA, effettuare elettroforesi
Nessun risultato / risultati inconsistenti a causa di basso segnale	Errore nella diluizione del coniugato o mancata amplificazione. Malfunzionamento dello strumento.	Ripetere il test. Controllare la temperatura d'ibridazione

## 11. MARCHI REGISTRATI UTILIZZATI NEL PRESENTE DOCUMENTO

Proclin® è un marchio registrato della Rohm and Haas

BCIP® è un marchio registrato di Sigma Aldrich Co.

Veriti™ è un marchio registrato di Applied Biosystems

**12. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI PRESENTI SULLE ETICHETTE**

<b>IVD</b>	Per uso diagnostico in vitro
	Temperatura di conservazione
<b>LOT</b>	Numero lotto
	Utilizzare entro
<b>REF</b>	Numero di catalogo
<b>HLA TYPING</b>	Destinazione d'uso: tipizzazione HLA
	Consultare le istruzioni per l'uso
<b>Mastermix   A</b>	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-A
<b>Mastermix   B</b>	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-B
<b>Mastermix   C</b>	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-C
<b>Mastermix   DRB1</b>	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-DRB1
<b>Mastermix   DQB1</b>	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-DQB1
<b>Mastermix   DQ</b>	Mastermix per l'amplificazione dei loci HLA-DQB1 e DQA1
<b>Mastermix   DPB1</b>	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-DPB1
<b>Mastermix   DP</b>	Mastermix per l'amplificazione dei loci HLA-DPB1 e DPA1
<b>Mastermix   DRB3/4/5</b>	Mastermix per l'amplificazione del locus HLA-DRB3/4/5
<b>Mastermix   Coeliac</b>	Mastermix per l'amplificazione dei loci specifici
<b>Testwells   A</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-A
<b>Testwells   A Xtend</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-A
<b>Testwells   B</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-B
<b>Testwells   B Xtend</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-B
<b>Testwells   C</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-C
<b>Testwells   DRB1</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-DRB1
<b>Testwells   DRB1 Xtend</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-DRB1
<b>Testwells   DQB1</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-DQB1
<b>Testwells   DQ</b>	Pozzetti test con sonde per tipizzazione dei loci HLA-DQB1 e DQA1
<b>Testwells   DPB1</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione del locus HLA-DPB1
<b>Testwells   DP</b>	Pozzetti test con sonde per tipizzazione dei loci HLA-DPB1 e DPA1
<b>Testwells   DRB3/4/5</b>	Pozzetti test con sonde per tipizzazione dei loci HLA-DRB1 3/4/5
<b>Testwells   Coeliac</b>	Pozzetti test con sonde per tipizzazione dei loci specifici
<b>Combistrip</b>	Pozzetti test con sonde per la tipizzazione di vari loci HLA
<b>PCR Primers</b>	Strip PCR con primer predispensati per l'amplificazione di vari loci
<b>PCR caps</b>	Tappini per PCR

PCR Buffer	Tampone PCR
MgCL <sub>2</sub>	Soluzione di magnesio cloruro
BLOCKBUF	Buffer di bloccaggio
HYBBUF	Buffer di ibridazione
STRGWASH	Soluzione di lavaggio stringente
TBS	TRIS buffered saline
SUBS	Substrato
CONJ	Coniugato streptavidina-fosfatasi alcalina
HISTO SPOT® INFORMATION CD	CD con istruzioni d'uso, batch file lotto specifico, hit table e informazioni sulle sonde

### 13. BIBLIOGRAFIA

Mack S.J. et al., Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue, Tissue Antigens 81/4, 183-257 (2013)

Megiorni and Pizzuti, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing Journal of Biomedical Science 19:88 (2012)

Istruzioni d'uso in altre lingue:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

o tel. +49 (0)6404-925-125