

DE

GEBRAUCHSINFORMATION

HISTO TYPE Rainbow

Testkit zur Bestimmung von HLA Allelen auf molekulargenetischer Basis

REF 728220

IVD

CE 0123

Version: 04/2021 / Stand: 2021-12 Änderungen zu Version 03/2021 sind orange markiert.



INHALT

1.	ZWECKBESTIMMUNG.....	2
2.	PRODUKTBESCHREIBUNG	2
3.	TESTPRINZIP	2
4.	MATERIAL	3
4.1	Inhalt des Rainbow Kits	3
4.2	Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte	3
4.3	Validierte RT-PCR Cycler.....	3
5.	LAGERUNG UND HALTBARKEIT	4
6.	TESTDURCHFÜHRUNG.....	4
6.1	Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	4
6.2	DNA Isolation	5
6.3	Eingabe der Probeninformationen in die PlexTyper® Software.....	5
6.4	PCR Setup.....	6
6.5	Cycler-Einstellungen und PCR Lauf	8
6.6	Auswertung und Interpretation der Ergebnisse	13
6.7	Import der Ergebnisse in die PlexTyper® Software.....	13
7.	WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE	14
8.	KITSPEZIFIKATIONEN.....	15
8.1	Leistungsmerkmale.....	15
8.1.1	Diagnostische Sensitivität und Spezifität	15
8.1.2	Analytische Sensitivität und Messbereich.....	16
8.1.3	Analytische Spezifität und Kreuzreaktivität	16
9.	GRENZEN DER METHODE.....	16
10.	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE.....	16
11.	TROUBLESHOOTING.....	16
12.	VERWENDETE MARKENNAMEN.....	17
13.	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN	17
14.	LITERATUR.....	18

1. ZWECKBESTIMMUNG

Die Zweckbestimmung des HISTO TYPE Rainbow Kits ist die Identifizierung von HLA Klasse I und Klasse II Allelen unter Verwendung eines validierten CFX Real-Time PCR Detection Systems für die PCR Amplifikation. HISTO TYPE Rainbow ist ein In-vitro-Diagnostikum zur Gewebetypisierung auf molekulargenetischer Basis (siehe Produktbeschreibung).

Der HISTO TYPE Rainbow Kit ist für den Gebrauch durch Fachpersonal mit Erfahrung in molekularbiologischen Techniken in folgenden Einrichtungen bestimmt:

- Transplantationszentren
- Krankenhauslabore
- Knochenmarkspenderegister

Die HLA Typisierung für Transplantationszwecke muss entsprechend den Richtlinien erfolgen, die von den Fachgesellschaften wie der European Federation for Immunogenetics (EFI), der American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) oder nationalen Gesellschaften wie der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI) herausgegeben werden.

2. PRODUKTBESCHREIBUNG

Die HISTO TYPE Rainbow Kits werden für die molekulargenetische Bestimmung der HLA Klasse I und II Allele für 11 Genorte verwendet; HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1. Das Kit erfasst generell alle Allele der 11 HLA Genorte. Sollten bestimmte seltene Allele nicht erkannt werden, sind sie in den Kit-spezifischen Dokumenten (KSI) aufgeführt, die im Downloadbereich der BAG Website verfügbar sind. Dort sind auch die Primer- und Sondenbindungsstellen aufgelistet. Der Kit liefert eine niedrige bis mittlere Auflösung der häufigen und gut dokumentierten Allele aus der CWD 2.1.0 Liste, die weitgehend auf dem CWD 2.0.0 Katalog (1) basiert. Die verwendete CWD 2.1.0 Liste kann im Downloadbereich der BAG Website heruntergeladen werden. Die bestätigten diagnostischen Ergebnisse der HLA-Allele sind eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Organtransplantation.

3. TESTPRINZIP

Der Test wird mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die DNA wird in einer Real-Time-PCR mit sequenz-spezifischen Primern (SSP) amplifiziert. Die Primer wurden speziell zur selektiven Amplifikation von Abschnitten spezifischer HLA Allele oder Allelgruppen entwickelt. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen fluoreszenzfarbstoff-markierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) nachgewiesen, wodurch die Sensivität und Spezifität des Tests im Vergleich zur klassischen SSP erhöht wird.

Wenn Amplifikate vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq-Polymerase hydrolysiert und ein Fluoreszenzsignal wird erzeugt, um den Nachweis des PCR-Produkts zu ermöglichen. Fünf verschiedene Wellenlängenbereiche von Fluoreszenzsignalen werden von der optischen Detektionseinheit des RT-PCR-Cyclers gemessen. Das Vorhandensein einer positiven Reaktion wird in erster Linie durch den Cq-Punkt bestimmt, d.h. den Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal über die Basisschwelle ansteigt. Damit die positive Amplifikation

valide ist, muss die Amplifikation am Ende des PCR-Prozesses auch einen bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwert erreichen. Dies soll falsch positive Reaktionen verhindern.

Jede PCR-Reaktion enthält zusätzlich eine interne Amplifikationskontrolle (Human Growth Hormone Gen (HGH)), welche in einem spezifischen Fluoreszenzkanal nachgewiesen wird.

Zur Unterscheidung positiver Reaktionen von negativen oder irrelevanten Amplifikationen wird das Verhältnis des Cq für die spezifische Reaktion zum Cq der internen Amplifikationskontrolle herangezogen. Die Schwellenwerte für dieses Cq Verhältnis (CqR) variieren von Reaktion zu Reaktion, daher ist die PlexTyper[®]-Software für die Analyse der Amplifikationsdaten erforderlich.

4. MATERIAL

4.1 Inhalt des Rainbow Kits

- 10x 230 µl Plex Mix, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer. (enthält den Gefahrstoff 2-Methylisothiazol-3(2H)-on in einer Konzentration von < 0,05%, siehe Kapitel 7 und 13)
- 10x HISTO TYPE Rainbow Platten für die HLA-Typisierung. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten HLA-spezifische Primer und Sonden sowie HGH-spezifische Kontrollprimer und Sonden (Oligomixe).
- 10x Verschlussfolien für die PCR Platten

4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur DNA-Isolation (validierte Extraktionskits siehe 6.2)
- RT-PCR-Cycler (validierter Cycler siehe 4.3)
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- Applikationsspatel für PCR-Folie
- Aqua dest. (DNase frei)
- Geeignete Plattenzentrifuge

4.3 Validierte RT-PCR Cycler

- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX 96 DX ORM (Bio-Rad, CE zertifizierte Version des CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System)
- CFX Opus 96 Real-Time PCR System (Bio-Rad)
- CFX Opus 96 Dx (Bio-Rad, CE zertifizierte Version des CFX Opus 96 Real-Time PCR System)

Folgende Fluorophore werden eingesetzt:

Fluorophor	am Cycler auswählen	Wellenlänge in nm
F495 FAM	FAM	Anregung: 495 / Emission: 520
O560 (CAL Fluor® Orange 560)	HEX	Anregung: 538 / Emission: 559
R610 (CAL Fluor® Red 610)	ROX	Anregung: 590 / Emission: 610
Q670 (Quasar® 670)	Cy5	Anregung: 647 / Emission: 670
Q705 (Quasar® 705)	Quasar 705	Anregung: 690 / Emission: 705

5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Alle Reagenzien müssen bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ in temperatur-kontrollierten Geräten gelagert werden. Das Haltbarkeitsdatum ist auf dem Etikett der Reagenzien angegeben. Das auf dem äußeren Etikett angegebene Haltbarkeitsdatum bezieht sich auf den Kitbestandteil mit der kürzesten Laufzeit. Der Gefrier-Auftau-Zyklus-Test hat gezeigt, dass bis zu 12 Zyklen für den Plex Mix keine negativen Auswirkungen auf die Qualität des Kits haben.

Stabilität nach dem Öffnen: Der Plex Mix und die HISTO TYPE Rainbow Platten sind nach der Entnahme aus dem Tiefkühlgerät bis zum Ansatz der PCR bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur stabil. Die fertig angesetzten PCR Platten können bis 16 Stunden im Kühlschrank dunkel gelagert werden, bevor der PCR Lauf gestartet wird.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken durchgeführt werden.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- Spitzen mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel verwenden
- zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion); möglichst zwei getrennte Räume nutzen
- Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen

6.2 DNA Isolation

Das Probenmaterial für die Isolation der genomischen DNA muss in geeigneten Abnahmesystemen verschickt werden. Für den Test ist EDTA- oder Citrat-Blut erforderlich. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen (2), derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet und dürfen nicht verwendet werden. Es wird empfohlen, für die DNA-Isolierung **CE** IVD zertifizierte Kits zu verwenden.

Validierte DNA Extraktionskits:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (Säulen)

Sowohl die manuelle Isolation als auch die automatisierte DNA Isolation (QIAcube) ist validiert.

Wenn die im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden soll, und dafür keines der genannten Testkits verwendet wird, muss diese vom Anwender validiert werden.

Für den HISTO TYPE Rainbow Test ist eine DNA-Menge von 10 – 20 ng pro Kavität erforderlich.

Die Reinheitsindices müssen sich im folgenden Bereich befinden:

- $OD_{260} / OD_{280} = > 1,5 \text{ und } < 2,0$
Höhere Werte deuten auf das Vorhandensein von RNA hin, niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen.
- $OD_{260} / OD_{230} = > 1,8$
Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln hin.

6.3 Eingabe der Probeninformationen in die PlexTyper® Software

Die Verwendung der PlexTyper® Software ist für die Auswertung der HISTO TYPE Rainbow Daten erforderlich. Es wird empfohlen, die Probeninformationen vor der PCR Amplifikation in die PlexTyper® Software einzugeben, um eine eindeutige RUN ID zu generieren. Alle Import-Dateien müssen eine PT Nummer als Präfix haben.

Wenn der Test in PlexTyper® gespeichert wird, ordnet die Software dem Test eine **Run ID** zu, die im Summary Fenster unten in Rot angezeigt wird. Es handelt sich um eine fortlaufende Nummer mit dem Präfix PT (PT1, PT2, PT3...), die mit dem Test verknüpft ist und auf dem PCR Gerät als Präfix für den Export File verwendet wird, um den PCR Export File wieder korrekt der Probe zuzuordnen. Diese Run ID sollte beim Erstellen des Files für den Lauf am PCR Gerät verwendet werden. Wenn die PCR xml Exportdatei nicht mit der RUN ID beginnt, kann das RUN ID Präfix vor dem Import in PlexTyper® manuell ergänzt werden.



6.4 PCR Setup

Für die Amplifikation wird ein Prä-Mix aus Plex Mix, Wasser und DNA hergestellt, der auf die Kavitäten 1-95 der PCR Platte verteilt wird. In der Kavität 96 befindet sich die Negativkontrolle (No Template Control = NTC), in die nur Wasser und Plex Mix pipettiert werden darf.

- Das Reaktionsvolumen für jeden PCR-Ansatz beträgt 10 µl.
- Für eine einzelne Kavität müssen die folgenden Reagenzien in ein Reaktionsgefäß pipettiert werden:

2 µl Plex Mix
1 µl Proben DNA (10 -20 ng/µl)
7 µl Aqua dest. (DNase frei)

Bei abweichenden DNA-Konzentrationen wird der Prä-Mix entsprechend modifiziert (s.u.).

Eine **Negativkontrolle (NTC)** sollte mitgeführt werden. Dafür wird eine PCR Reaktion mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA angesetzt.

2 µl Plex Mix
8 µl Aqua dest. (DNase frei)

DNA Konzentration 10-20 ng/µl

- **805 µl** Aqua dest. in das Röhrchen mit **230 µl** Plex Mix geben und mischen (1-3 Sek. vortexten).
- Nach dem Mischen **10 µl** entnehmen und in die NTC-Kavität (Kavität 96, Position H12) pipettieren (siehe auch Abbildung 1 und 2).
- Anschließend **115 µl** DNA in das Röhrchen mit dem restlichen Plex Mix-Wasser-Gemisch pipettieren und mischen (1 - 3 Sek. vortexten).
- Jeweils **10 µl** der DNA/Plex Mix/Wasser-Lösung in die Kavitäten 1-95 der HISTO TYPE Rainbow Platte verteilen (bitte Abbildung 1 und 2 beachten). Die NTC-Kavität 96 (Position H12) darf nicht mit dem DNA-Mix befüllt werden, weil dies zu einer positiven Reaktion führt und damit zu einem invaliden Ergebnis führt!

Vorgehen bei abweichenden DNA-Konzentrationen

- **8 µl** Aqua dest. und **2 µl** Plex Mix in die NTC-Kavität (Position H12) geben. Die NTC-Kavität (Kavität 96; Position H12) darf nicht mit dem DNA-Mix befüllt werden!
- Anschließend die DNA und Aqua dest. entsprechend der folgenden Tabelle zu den verbleibenden 228 µl Plex Mix pipettieren und mischen (1-3 Sek. vortexen):

In Abhängigkeit von der DNA-Konzentration anhand der folgenden Tabelle die entsprechenden Volumina zu den verbleibenden 228 µl Plex Mix pipettieren:

Konzentration der DNA [ng/µl]	Aqua dest. [µl]	DNA Volumen [µl]
2 - 4	350	570
5 - 9	690	230
10 - 19	805	115
20 - 39	860	60
40 - 79	890	30
80 - 150	905	15
151 - 200	912	8

- Jeweils **10 µl** der DNA-Plex Mix-Wasser-Lösung in die Kavitäten 1-95 der HISTO TYPE Rainbow-Platte verteilen.

Hinweis: Beim Pipettieren in die PCR-Kavitäten ist es wichtig, dass die Pipettenspitze nicht mit den getrockneten Mixen (blau eingefärbt) am Boden der Kavitäten in Kontakt kommt. Es sollte seitlich an die Gefäßwand pipettiert werden, damit sich die 10 µl durch die Gravitation mit dem getrockneten Mix mischen können (siehe Abbildung 1).

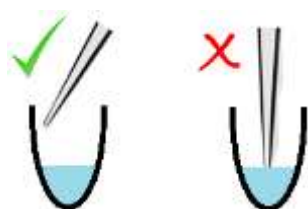


Abbildung 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	NTC

Abbildung 2: HISTO TYPE Rainbow Platte. In den Kavitäten A1 bis G12 befinden sich die getrockneten spezifischen Mixe (blau gefärbt). In der Kavität H12 befindet sich die getrocknete NTC.

Die PCR-Platte mit der mitgelieferten PCR-Folie verschließen und die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugieren. Sicherstellen, dass die Platte durch die Folie **vollständig verschlossen** ist, besonders an den Rändern. Zwischen Folie und Platte dürfen sich keine Blasen befinden, um eine Evaporation während der PCR zu vermeiden. Achten Sie darauf, dass sich die Flüssigkeit mit dem getrockneten Mixen gemischt hat und sich **keine Blasen** in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen auftreten, die Gefäße vorsichtig auf den Labortisch klopfen oder die Platte kurz (10 Sekunden) zentrifugieren, um diese zu entfernen. Die verschlossene PCR Platte in das CFX Gerät stellen.

Hinweis: Die PCR Platte muss in der richtigen Orientierung wie in Abbildung 2 oben dargestellt in den Cyler gestellt werden – die NTC Kontrolle muss sich in der rechten unteren Ecke auf Position H12 befinden.

6.5 Cyler-Einstellungen und PCR Lauf

PCR-Programm (im Rainbow Template enthalten)

Programm-Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Anstiegsrate (Ramp Rate) [°C/s]	Plate read	Anzahl Zyklen
Initiale Aktivierung	120	96	2,5	-	1
Denaturierung	5	98	2,5	-	13
Annealing + Extension	25	68	2,2	-	
Denaturierung	5	98	2,5	-	37
Annealing + Extension	25	68	-	Ja	

Hinweis: Bei dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System ist eine **veränderte Heizrate** des Geräts (Ramp Rate) zu verwenden. Diese sind in der obigen Tabellenspalte "Anstiegsrate (Ramp Rate)" aufgelistet.

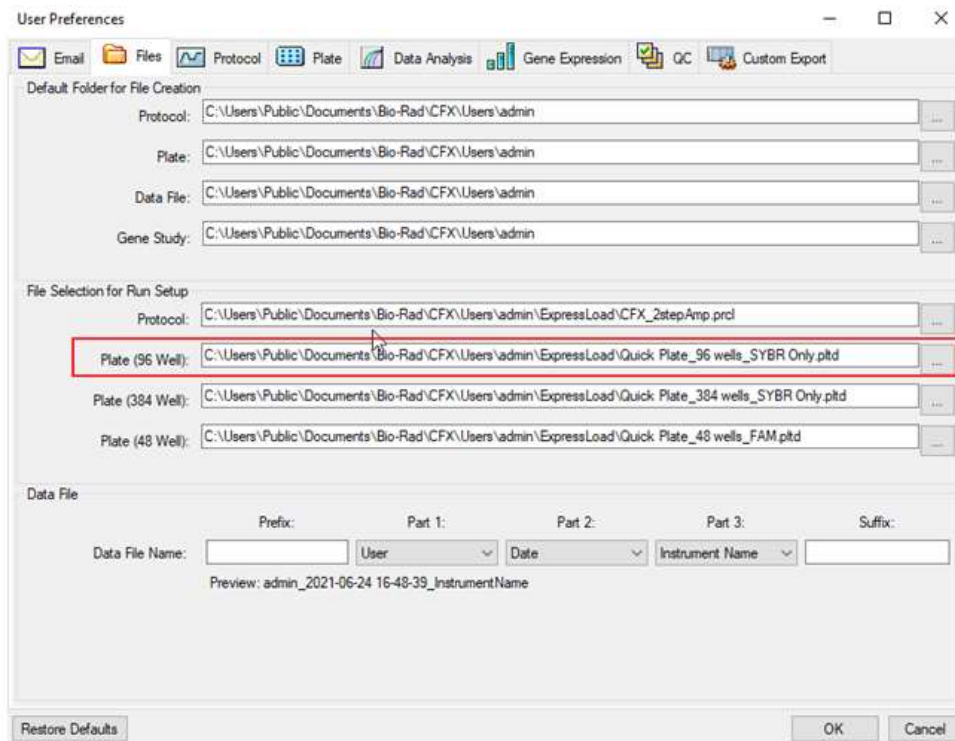
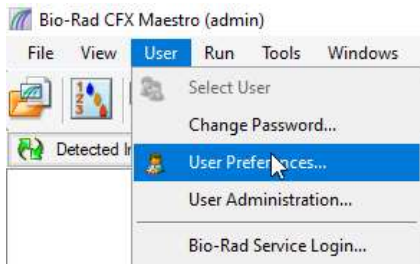
Den Real-Time PCR Lauf von einem verbundenen PC aus starten.

Es wird dringend empfohlen die Rainbow Templates für das PCR Protokoll und das Platten Layout zu verwenden. Die Templates können im Downloadbereich der BAG Diagnostics Website heruntergeladen werden. Sie enthalten die korrekten Amplifikationsparameter und Cyler Einstellungen und sollten unter folgendem oder einem ähnlichen Pfad gespeichert werden:

Standardpfad für Templates:

C:\Users\Public\Documents\Bio-Rad\CFX\Users\admin\ExpressLoad

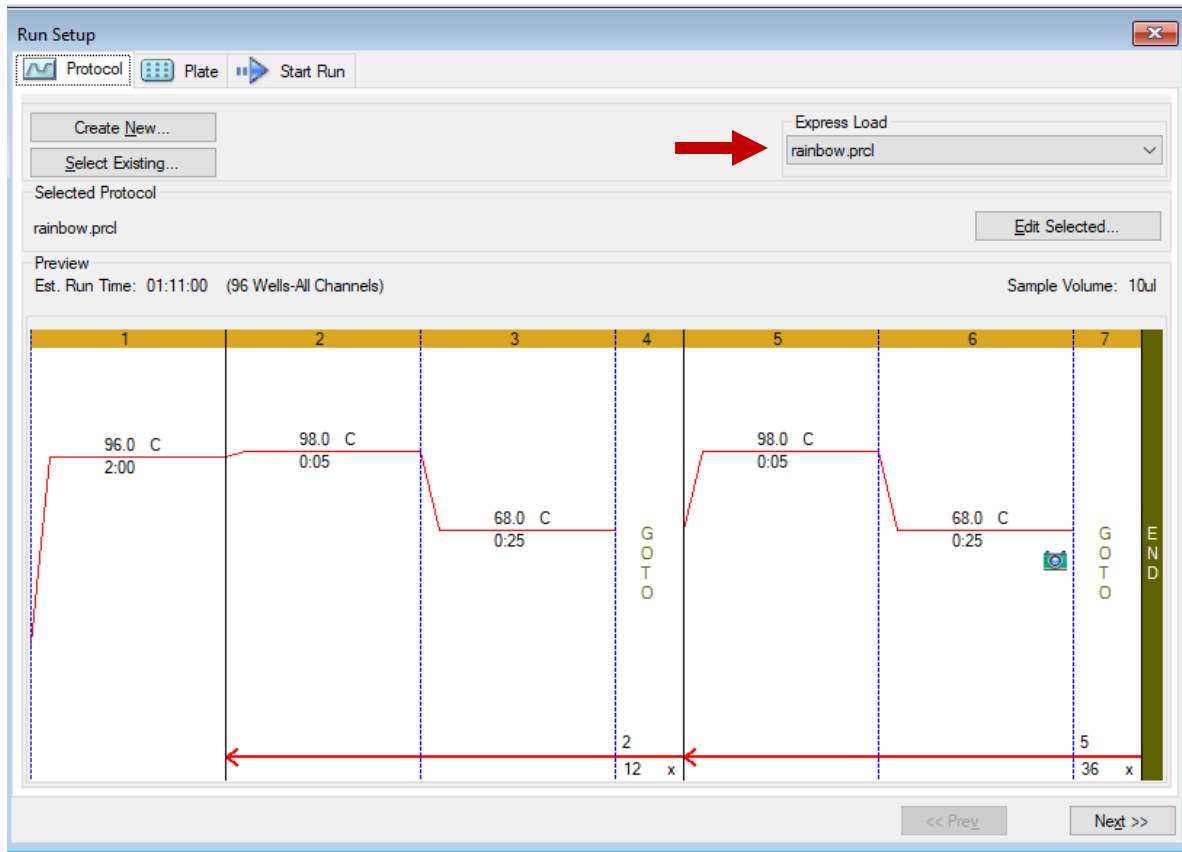
Der Express Load Pfad kann in Abhängigkeit von den Bio-Rad Software-Einstellungen unterschiedlich sein und kann in der Bio-Rad Maestro Software ermittelt werden.



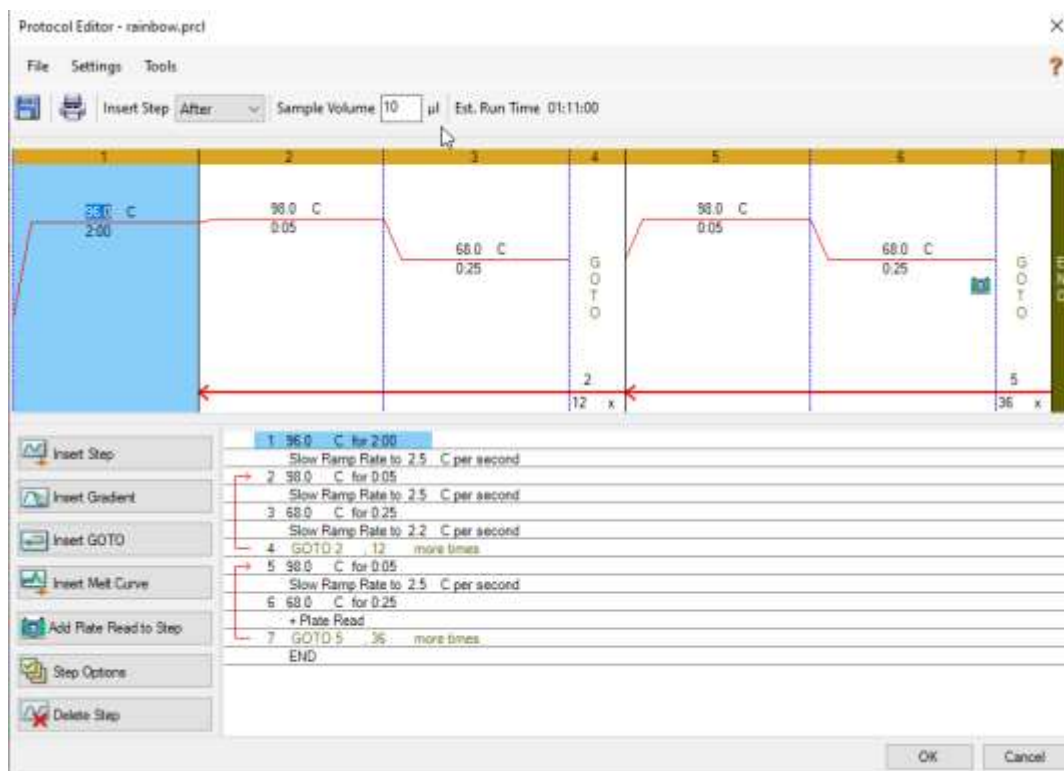
Danach können die Rainbow Templates für das PCR Protokoll und das Plattenlayout im Express Load Menü im Run Setup der CFX Maestro Software ausgewählt werden.



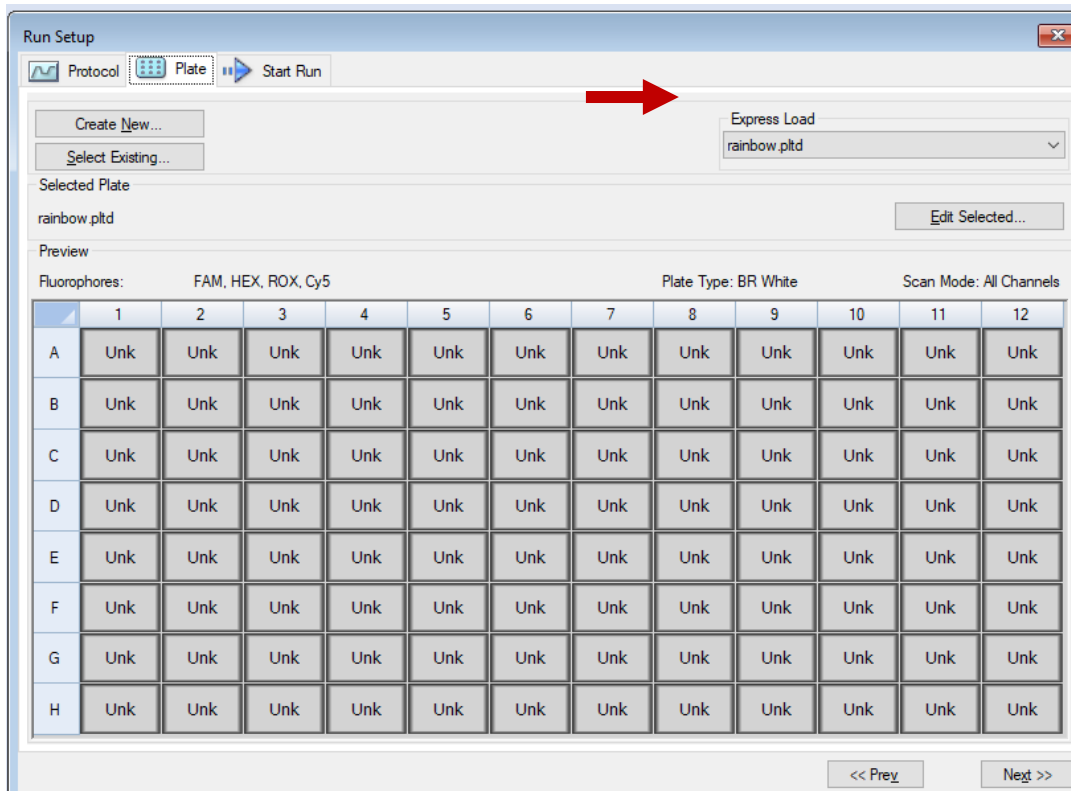
Für das Protokoll das "rainbow.prc1" Template in der Dropdown Liste unter Express Load auswählen:



Klicken auf "Edit Selected" zeigt die Details des Programms und das Programm kann editiert werden (dies sollte nicht getan werden, wenn das Template verwendet wird!):

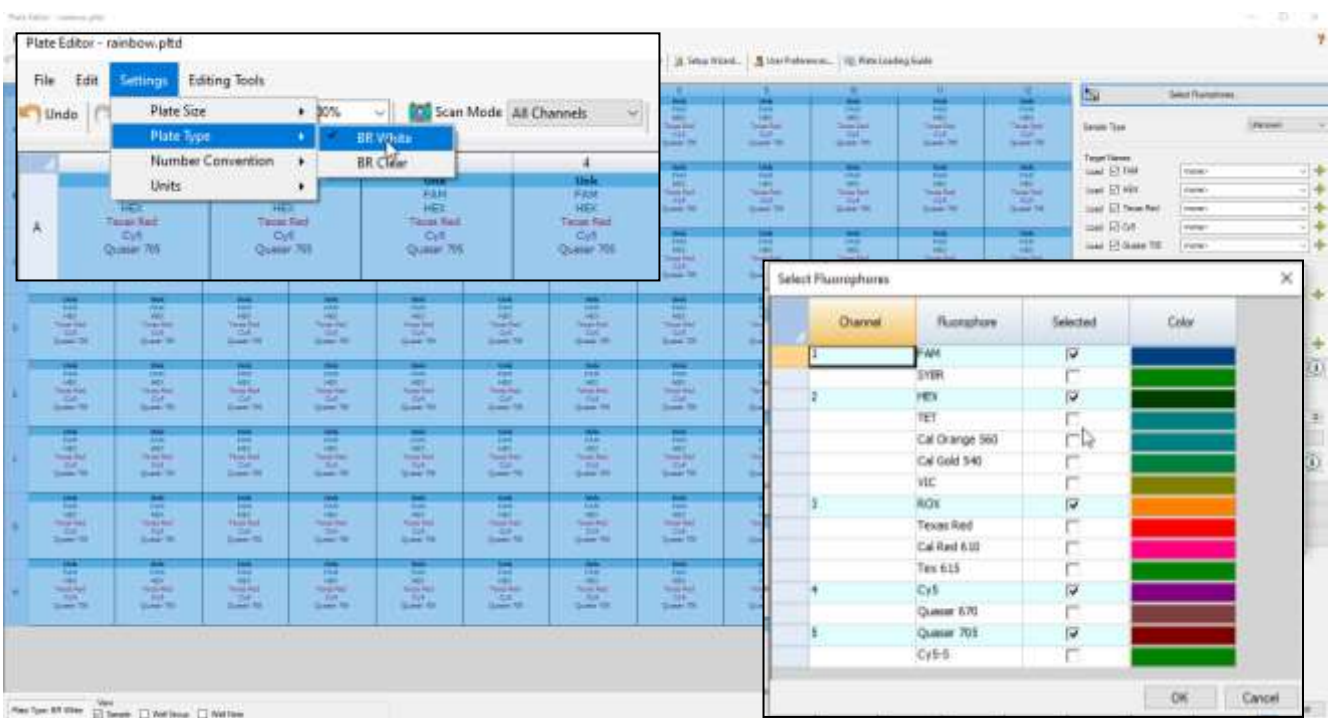


Für die Platte das "rainbow.pltd" Template in der Dropdown Liste unter Express Load auswählen:

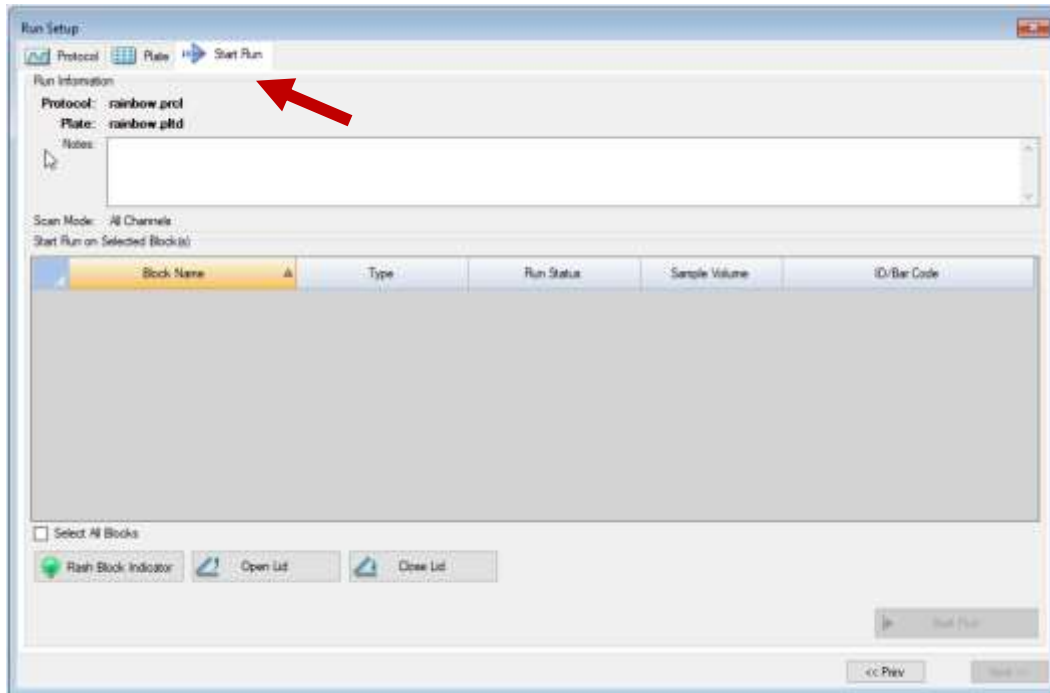


Klicken auf "Edit Selected" zeigt die Details der Platte an und die Einstellungen der Fluorophore müssen wie im Screenshot unten abgebildet verwendet werden: FAM, HEX, ROX, Cy5, Quasar 705. Bei Verwendung des Templates sind Fluorophore bereits festgelegt und dürfen nicht verändert werden.

Es ist wichtig, dass **BR White** für den **Plate Type** ausgewählt ist:



Nun kann der PCR Lauf gestartet werden. Der Name des PCR Laufs muss die von der PlexTyper[®] Software vergebene **RUN ID** as Präfix enthalten.



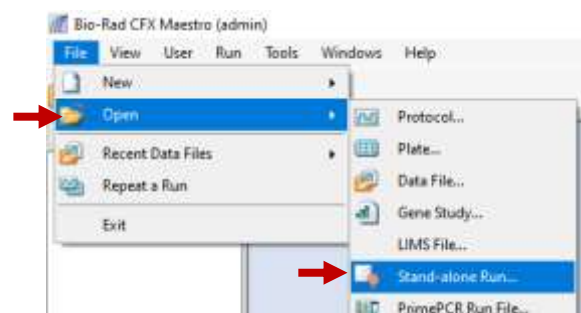
Alternativ: Den Real-Time PCR Lauf auf einem "Stand-Alone" Gerät starten

Auf dem Touchscreen des CFX Geräts das Rainbow-Protokoll auswählen und sicherstellen, dass der Scan-Mode **"All Channels"** ausgewählt ist, bevor der Lauf gestartet wird.



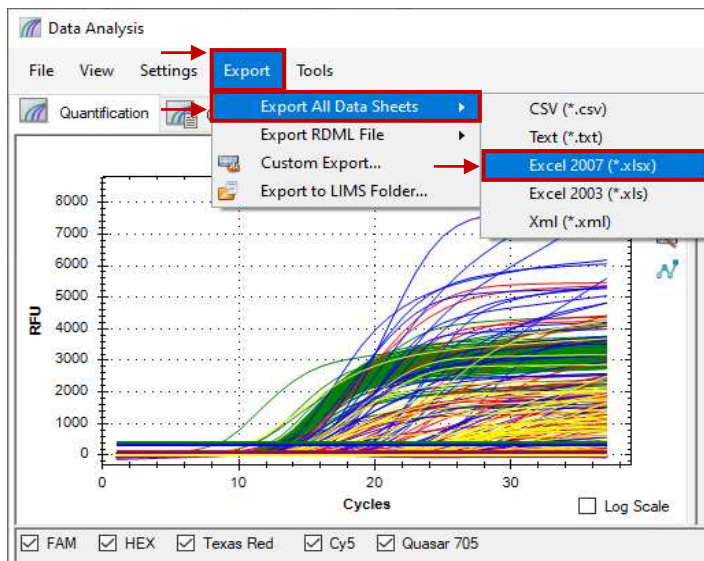
Alternativ: Export der Daten von einem "Stand-Alone" Gerät

Nach dem Lauf werden die Daten auf einen USB Stick exportiert (über **File Options**). Die Dateien mit den Rohdaten werden in der CFX Maestro Software geöffnet und gespeichert.



Export der Daten aus der CFX Maestro Software

Aus dem Data Analysis Bildschirm der CFX Maestro Software werden die Daten im Excel 2007 Format exportiert. Die Daten werden dann zu einem PC mit der PlexTyper[®] Software übertragen.



6.6 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Für die Auswertung der PCR-Daten muss die PlexTyper[®] Software (wird kostenlos von der BAG Diagnostics zur Verfügung gestellt) und der Kit File verwendet werden. Die zur Auswertung benötigten Kit File-Dateien stehen zum Herunterladen auf dem Download Server (www.service.bag-diagnostics.com) zur Verfügung.

Beachten Sie während der Durchführung und der Auswertung die Lotbezeichnung des Kits. Die Kit Files zur Interpretation der Daten sind produkt- und lotspezifisch. Bei Verwendung von falschen Kit Files können falsche Ergebnisse auftreten. Für die Auswertung und Interpretation müssen die Rohdaten vom RT-Cycler auf einen PC mit der installierten PlexTyper[®] Software transferiert werden (z.B. mit einem USB-Stick).

HISTO TYPE Rainbow ist ein 96 Well Multiplex Typisierungstest, der 5 Farbkanäle nutzt. Es ist möglich die Daten in der Software des Cyclers anzusehen, aber die Interpretation ist nur mit der PlexTyper[®] Software durchführbar.

6.7 Import der Ergebnisse in die PlexTyper[®] Software

Bitte beachten Sie die Gebrauchsinformation für die PlexTyper[®]-Software bei der Interpretation der Daten.

Die PlexTyper[®] Software öffnen. Vom Startbildschirm **View plates with no associated results** unter **Plates** auswählen. Es öffnet sich eine Liste mit allen Tests, denen noch keine Rohdaten zugeordnet sind. Über der Tabelle befindet sich ein globales Suchfeld, mit dem die ganze Tabelle durchsucht werden kann.

View Plates: With No Associated Results

192 Search

Run ID	Test Size	When Added	User	Product Number	Lot	Kit Name	KSI	Sample ID1	Sample ID2	Full Name	Date of Birth
PT4	96	13 May 2020	admin	728220	950FEHM06	HistoType Rainbow	1017	1920025	WONM		
PT5	96	13 May 2020	admin	728220	950FEHM06	HistoType Rainbow	1017	1920030	PAR		
PT6	96	13 May 2020	admin	728220	950FEHM06	HistoType Rainbow	1017	1920744			

Doppelklicken auf den zu interpretierenden Test öffnet das Fenster mit den Ergebnissen (results summary window). **Import File** auswählen und dann den XML File mit dem korrekten PT RUN ID Präfix (z.B. PT4.xml) auswählen, der vom CFX Cyclyer exportiert wurde.

Das initiale Laden der Kit File Daten dauert ca. 45 Sekunden, wenn er nicht schon geöffnet wurde. In der unteren linken Ecke erscheint ein Fortschrittsbalken. Danach werden die Ergebnisse zur Durchsicht angezeigt.

Eine Negativkontrolle (NTC) dient als Kontaminationskontrolle. Wenn DNA oder kontaminierende Amplifikate unbeabsichtigt in die NTC Reaktion gelangt sind, führt dies zu einem positiven Signal. Liegt der Cq unter 36 wird dies von der PlexTyper[®] Software als mögliche Kontamination erkannt und ein Warnhinweis wird erstellt. Amplifikationssignale mit einem höheren Cq als 36 in der NTC werden als PCR Artefakte angesehen und nicht berücksichtigt. Wird eine PCR Kontamination vermutet, wird empfohlen den PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Die aus der cyclerspezifischen Software ermittelten Rohdaten werden in die PlexTyper[®] Software importiert. Die PlexTyper[®] Software ermittelt anhand der Cq-Werte, RFUs (Relative Fluorescence Units), Quality Scores und dem Kurvenverlauf das molekulargenetische HLA-Muster der eingesetzten Proben (detaillierte Informationen, siehe PlexTyper[®]-Gebrauchsanweisung).

7. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

HISTO TYPE Rainbow ist **für die In-vitro-Diagnostik konzipiert**. Das Kit sollte nur von speziell ausgebildetem, qualifiziertem Personal verwendet werden. Alle Arbeiten sollten unter Berücksichtigung der guten Laborpraxis durchgeführt werden.

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Daher werden geeignete Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit biologischem Material gemäß den Standards der guten Laborpraxis empfohlen. Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren), Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes, potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots sollte vermieden werden. Der Gebrauch von sterilen Einmalpipetten und Pipettenspitzen wird empfohlen. Keine Reagenzien mit Trübung oder Anzeichen für mikrobielle Kontamination verwenden!

Der Plex Mix enthält den Gefahrstoff 2-Methylisothiazol-3(2H)-on in einer Konzentration von < 0.05%. Für den Plex Mix gilt folgende Gefahrstoffkennzeichnung:



Symbol: Achtung

Gefahren- und Sicherheitssätze: Siehe Kapitel 13

Ein Sicherheitsdatenblatt für den Plex Mix kann unter www.bag-diagnostics.com heruntergeladen werden. Weitere Sicherheitsdatenblätter gemäß Artikel 31 der REACH-Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 sowie der Verordnung EG Nr. 1272/2008 für weitere Kitkomponenten sind nicht erforderlich.

8. KITSPEZIFIKATIONEN

Die Kombination der Primer und Sonden ermöglicht eine Bestimmung der humanen HLA Klasse I und II Allele entsprechend der lot-spezifischen Angaben (niedrige bis mittlere Auflösung, Erfassung aller Allele, mit Ausnahmen einzelner seltener Allele). Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität des Test Kits wird für jede Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten HLA-Allelen überprüft. Das Kit bestimmt die HLA-Loci A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1 und DPB1.

8.1 Leistungsmerkmale

8.1.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Insgesamt 177 DNA Proben mit bekannten HLA Typen für alle oder einige der untersuchten HLA Genorte wurden mit dem HISTO TYPE Rainbow Kit getestet. Die Ergebnisse zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit den Vortypisierungen.

Genort	Anzahl Proben mit Vortypisierung für den Genort	übereinstimmend	% Übereinstimmung
A	177	177	100%
B	177	177	100%
C	177	177	100%
DRB1	174	174	100%
DRB3	165	165	100%
DRB4	165	165	100%
DRB5	165	165	100%
DQA1	161	161	100%
DQB1	171	171	100%
DPA1	117	117	100%
DPB1	141	141	100%

8.1.2 Analytische Sensitivität und Messbereich

Validierungstests haben gezeigt, dass Abweichungen der DNA Mengen von 5 ng bis 50 ng pro Reaktion keinen signifikanten Einfluss auf den spezifischen Nachweis der HLA Allele haben.

8.1.3 Analytische Spezifität und Kreuzreaktivität

Acht Substanzen, die mit dem Test interferieren könnten, wurden getestet und für die folgenden Konzentrationen konnte kein negativer Effekt beobachtet werden:

Substanz	Maximale nicht inhibierende Konzentration
Protein (BSA)	0,2 mg/ml
TE (Tris/EDTA, pH 8,0)	7 mM Tris, 0,7 mM EDTA
NaCl	20 mM
Ethanol	1%
Hämoglobin	0,01 mg/ml
Natriumcitrat	7 mM
DNA Extraktionspuffer 1 (Qiagen QIAamp DNA Blood Kits)	1%
DNA Extraktionspuffer 2 (Qiagen QIAamp DNA Blood Kits)	2%

9. GRENZEN DER METHODE

Bei der DNA Isolation sollte darauf geachtet, dass das RT-PCR Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen reagieren kann. Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons oder DNA sollten sorgfältig vermieden werden.

Die Durchführung einer Negativkontrolle ohne DNA in Kavität H12 wird dringend empfohlen. In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal unterhalb dem Cq von 36 nachgewiesen werden. Im Fall einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle ist ggf. der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und gegebenenfalls die Reagenzien auszutauschen.

Alle Geräte (z.B. Pipetten, Real-Time Cycler) müssen entsprechend der Herstellervorgaben kalibriert werden.

10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots können mit einer Kombination von DNA-Proben mit bekanntem HLA-Typ durchgeführt werden. Eine interne Kontrolle zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation ist in den getrockneten Oligomixen enthalten.

Die Mitführung von Negativkontrollen (Kavität H12) zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Bereiten Sie zu diesem Zweck einen Test ohne DNA (NTC) vor, siehe Kapitel 6.4.

11. TROUBLESHOOTING

Das entsprechende Troubleshooting für die Interpretation der Ergebnisse entnehmen Sie bitte der Gebrauchsinformation für die PlexTyper[®] Software.







Fehler	mögliche Ursache	mögliche Lösung
FAM-Signal über die gesamte Platte schwach oder nicht vorhanden	Vorhandensein eines Inhibitors in der PCR-Reaktion.	Andere Isolationsmethode oder Probe verwenden.
	Unzureichende DNA im Reaktionsansatz.	Test mit korrekter DNA-Menge wiederholen.
	Falsche Amplifikationsparameter.	PCR Programm prüfen.
	Verunreinigte oder degradierte DNA.	Konzentration/Qualität der DNA überprüfen. DNA auf einem Gel überprüfen. DNA-Isolierung wiederholen.
	Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert.	Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/Auftauen vermeiden. Lagerungsbedingungen beachten.
Schlechtes oder kein FAM-Signal in einzelnen Kavitäten	Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand.	Vorsichtiges Pipettieren. Abzentrifugieren der PCR Platte.
	Anwenderfehler.	Sicherstellen, dass alle Kavitäten das notwendige Volumen enthalten.
	Verdunstung der Reagenzien durch falsches Verschließen der PCR-Gefäße.	Stellen Sie sicher, dass die PCR-Gefäße ordnungsgemäß verschlossen sind. Vorsicht bei Klebefolien im Randbereich.
Signal in der Negativkontrolle	Kontamination mit DNA oder Amplifikat in der Negativkontrolle.	Wiederholen Sie den Test. Dekontaminieren Sie den Arbeitsplatz.
	Amplifikation aufgrund von PCR-Artefakten.	Nach dem Import in PlexTyper® überprüfen, ob die Signale unter dem Schwellenwert liegen oder die Daten doch korrekt sind (siehe Gebrauchsinformation PlexTyper®).


12. VERWENDETE MARKENNAMEN

TaqMan® ist ein Markenname der Firma Roche Molecular Systems Inc.

®Cal Fluor & Quasar Dyes sind registrierte Markennamen der Firma LGC Biosearch Technologies

13. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN

	Ausreichend for n Tests
	Lagertemperatur / Oberer Temperaturgrenzwert
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
	Verwendbar bis
	Inhalt, enthält

eIFU	Elektronische Gebrauchsinformation
HLA TYPING	Zweckbestimmung: HLA-Typisierung
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nr.
PCRFOIL	PCR-Folien
PCRPLATE	PCR-Platten
PLEX MIX	Plex Mix: Mastermix, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
REACTIONMIX	Reaktionsmische
REF	Bestell-Nr.
RTU	Gebrauchsfertig
	<p>Achtung (siehe Kapitel 7)</p> <p>H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. <u>Sicherheitshinweise</u></p> <p>P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.</p> <p>P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.</p> <p>P103 Lesen Sie sämtliche Anweisungen aufmerksam und befolgen Sie diese.</p> <p>P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.</p> <p>P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen.</p> <p>P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.</p> <p>P501 Inhalt/Behälter gemäß lokalen/nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.</p>

14. LITERATUR

1. Cano, P. et al, 2007. Human Immunology 68, 392–417
2. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website www.bag-diagnostics.com oder kontaktieren Sie uns direkt über info@bag-diagnostics.com