

DE

Gebrauchsinformation HISTO TYPE SSP Kits

IVD

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-diagnostics.com

Testkits zur Typisierung von HLA - Allelen auf molekulargentischer Basis
(Klasse I: HLA-A,B,C und Klasse II: HLA-DR,DQ)

gebrauchsfertig vorgetropft

REF 70721	HISTO TYPE A low	
REF 70731	HISTO TYPE B low	
REF 70751	HISTO TYPE DR low	
REF 7098	HISTO TYPE ABDR	
REF 7102	HISTO TYPE ABC	
REF 7103	HISTO TYPE DR/DQB	CE 0123
REF 7070	HISTO TYPE B27 low	
REF 7071	HISTO TYPE B27 low	
REF 70941	HISTO TYPE Celiac Disease	
REF 70715	HISTO TYPE B*57:01/B*51	
REF 70716	HISTO TYPE Narcolepsy	
REF 70741	HISTO TYPE C low	CE
REF 70891	HISTO TYPE DQB low	
REF 709010	HISTO TYPE DQB high	

Inhalt

1. Produktbeschreibung.....	2
1.1 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE Celiac Disease.....	2
1.2 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE B*57:01/B*51	2
1.3 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE Narcolepsy.....	3
1.4 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE B27 low.....	3
2. Material	3
2.1 Inhalt der HISTO TYPE SSP Kits.....	3
2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material.....	4
2.3 Lagerung und Haltbarkeit.....	4
3. Leistungsdaten	5
4. Testdurchführung	5
4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise.....	5
4.2 DNA-Isolierung	6
4.3 Amplifikation.....	6
4.4 Gelelektrophorese	9
4.5 Dokumentation und Auswertung	9
5. Warn- und Entsorgungshinweise.....	10
6. Mögliche Fehlerquellen.....	11
7. Literatur	12
8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	13

Version: 20/2020 / Stand: 2020-08 Änderungen gegenüber Version 19/2019 sind gelb markiert!

1. Produktbeschreibung

Die **HISTO TYPE Kits** werden zur molekulargenetischen Typisierung von HLA-Allelen eingesetzt (Informationen zu Testkits mit denen krankheitsassoziierte HLA-Allele nachgewiesen werden siehe Kapitel 1.1, 1.2, 1.3 und 1.4).

Ausgangsmaterial für die Typisierung mit den **HISTO TYPE Kits** ist gereinigte, leukozytäre DNA. Die Testdurchführung basiert auf der **Sequence Specific Primer-(SSP)** PCR (siehe Abb. 1) [2,3]. Diese Methode nutzt die Tatsache, dass für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer, speziell am sogenannten 3'-Ende, keine Fehlpaarungen aufweisen dürfen. Somit führt nur eine vollständige Übereinstimmung der Primer mit der Zielsequenz zu einem Amplifikat, welches durch eine anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird.

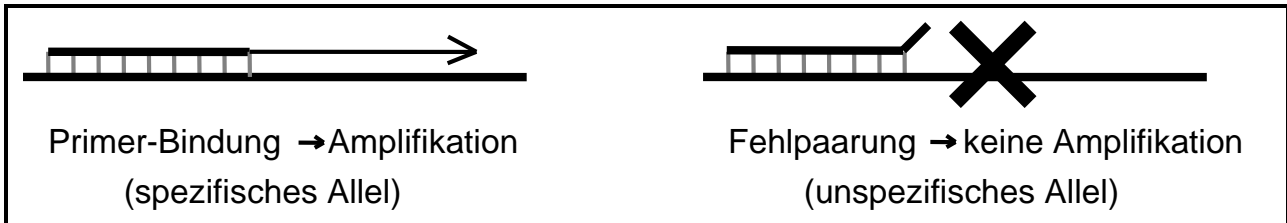


Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

Die Zusammensetzung der verschiedenen Primer-Mixe ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der jeweils in den Auswertediagrammen angegebenen HLA-Typen. Je Typisierung wird eine bestimmte Anzahl **vorgetropfter** und **getrockneter** Reaktionsansätze inkl. interner Amplifikationskontrolle mit einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt.

1.1 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE Celiac Disease

Celiac Disease (Zöliakie) ist eine Autoimmunreaktion die durch Gluten hervorgerufen wird. Gluten ist ein Bestandteil von verschiedenen Getreiden. Wenn die Krankheit nicht frühzeitig diagnostiziert wird, führt sie zu einer chronischer Entzündung und zur Zerstörung des Dünndarms. Zöliakie ist streng assoziiert mit dem HLA-DQA1*05 – DQB1*02 und HLA-DQA1*03 – DQB1*0302 Haplotyp. Zusätzlich dienen DR3, DR7 und DR11 Allele als genetische Marker. [8-10]

1.2 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE B*57:01/B*51

Eine Behandlung mit antiretroviralen Medikamenten (z. B. für die HIV Therapie) mit dem Wirkstoff Abacavir ist nur erlaubt, wenn ein Vorhandensein des Allel HLA B*57:01 beim Patienten ausgeschlossen wurde. Der Grund dafür ist die Gefahr einer mit diesem Allel assoziierten Hypersensitivitätsreaktion (HSR). [11-13]

Morbus Behcet ist eine chronische Gefäßentzündung und manifestiert sich in wiederkehrenden oralen und genitalen Geschwüren, beeinträchtigt die Haut und die Augen und führt zu weiteren multisystemischen Symptomen. Morbus Behcet ist weltweit verbreitet, tritt aber gehäuft in einem Gebiet von Ostasien bis in den Mittelmeerraum auf. HLA-B*51 ist starker Risikofaktor für die Krankheit und kann als diagnostisches Merkmal verwendet werden. [14]

1.3 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE Narcolepsy

Narkolepsie ist eine Schlafstörung mit Symptomen wie überhöhter Tagesschläfrigkeit, Schlaf lähmung oder Halluzinationen. 98% der kaukasischen Narkolepsie-Patienten tragen den DRB1*15:01 – DQA1*01:02 – DQB1*06:02 Haplotyp. Daher ist eine HLA Typisierung für die Bestätigung bzw. den Ausschluss einer Diagnose hilfreich. [15-17]

1.4 Kurzer Hintergrund HISTO TYPE B27 low

Die Assoziation von HLA-B27 mit dem Krankheitsbild der seronegativen Arthritiden (Morbus Bechterew, Morbus Reiter, reaktive Arthritiden) wird regelmäßig für die Diagnostik dieser Krankheiten genutzt. Ein positiver HLA-B27 Befund ist mit einem sehr hohen Krankheitsrisiko verbunden (siehe Tabelle 1) [18,19]. Vor allem bei unklarem Verdacht auf M. Bechterew liefert eine gesicherte HLA-B27 Diagnostik einen entscheidenden Beitrag für die Therapie eines Patienten.

Erkrankung	B27 Frequenz in Patienten	relatives Risiko
Ankylosierende Spondylitis (Morbus Bechterew)	90,2 %	91
Morbus Reiter	78,8 %	37,6
Postinfektiöse reaktive Arthritiden	70,2 %	

Tabelle 1: HLA-B27 Frequenzen und Risiken

2. Material

2.1 Inhalt der HISTO TYPE Kits

- ◆ HISTO TYPE Platten/Streifen für die HLA Typisierung. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten allelspezifische Primer, interne Kontroll-Primer (spezifisch für das humane G3PDH Gen) und Nukleotide. Der Reaktionsmix Nr. 1 ist markiert (Mix-Anordnung siehe Seite 7). Bei den meisten HISTO TYPE-Produkten befindet sich eine farblich erkennbare Kontaminationskontrolle (blauer Mix) in der ersten oder letzten Position. Die Lot-Nummer ist auf jede/n Platte/Streifen gedruckt.
- ◆ PCR-Streifen (á 8) Kontaminationskontrolle mit internen Kontrollprimern und amplifikationspezifischen Primern (liegen nicht extra bei, wenn die Kontaminationskontrolle in den Testplatten/-streifen integriert ist und bei HISTO TYPE B27 low).
- ◆ 10x PCR-Puffer
- ◆ 8er-Streifen Deckel oder PCR-Folie
- ◆ Informations-CD (enthält Gebrauchsinformationen für HISTO TYPE und HISTO MATCH**, Spezifitätstabelle*, Hit Table*, Worksheet, Liste „Untested Primers“, Batch Files für HISTO MATCH** und SCORE*, Qualitätskontrollzertifikat)

*nicht für HISTO TYPE B27 low / **nicht für HISTO TYPE B27 low und HISTO TYPE Narcolepsy

2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material

- ◆ Happy Taq (REF 70976) (oder eine andere vom Anwender mit den HISTO TYPE Kits validierte Taq Polymerase).
Die Happy Taq wird bei Bestellung eines HISTO TYPE Kits kostenlos mitgeliefert.
Bitte keine Hot-start Taq Polymerase verwenden !
- ◆ **BAG EXTRA GENE I** (REF 7059) zur DNA-Extraktion aus Blut / Lymphozyten / Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5 - 250 µl)
- ◆ sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- ◆ DNA-Cycler (Liste der validierten Cycler siehe Punkt 4.3)

Geräte und Material für die Gelelektrophorese

- ◆ DNA-Agarose
- ◆ 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris base, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- ◆ Ethidiumbromid (EtBr)
- ◆ Flachgelkammer mit Kämmen (mind. 25 Taschen)
- ◆ Spannungsgeber (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA Längenstandard (REF 7097)

Geräte zur Auswertung und Dokumentation

- ◆ UV-Leuchtplatte (220 - 310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System mit Filmen Polaroid Typ 667 oder Video-System mit Thermopapier Typ KP65HM-CE)
- ◆ PC, Auswertesoftware HISTO MATCH (BAG Health Care) oder SCORE Vollversion

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Die HISTO TYPE Kits werden ungekühlt versandt. Nach Erhalt die Kits bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt lagern. Die HISTO TYPE Platten/Streifen können auch bei $2...8^{\circ}\text{C}$ gelagert werden, ein häufiges Wechseln der Lagertemperatur sollte aber vermieden werden. Der 10x PCR-Puffer muss bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Die Happy Taq wird auf Trockeneis oder mit Kühlelementen versandt. Nach Erhalt die Happy Taq bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ lagern

Die Lagerung sollte in temperaturüberwachten Geräten erfolgen.

Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen und gilt auch nach dem ersten Öffnen. Die auf dem Kit-Außenetikett angegebene Haltbarkeit entspricht dem Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit.

3. Leistungsdaten

Die Zusammensetzung der Primermixe gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der in der Hit Table angegebenen HLA-Typen basierend auf den zur Zeit bekannten Sequenzdaten. Es werden regelmäßig Updates durchgeführt.

Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der einzelnen Mixe wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten HLA-Antigenen überprüft. Nicht erfasste Allele sind in den Auswerteunterlagen kenntlich gemacht.

Für die HISTO TYPE SSP Kits wurden Leistungsstudien mit vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Typisierungen wurden mit den Resultaten der Vortypisierung, die mit anderen HLA-SSP-Kits, Nukleinsäuresequenzierungen oder serologischen HLA-Testmethoden erzielt wurden, verglichen. Die Typisierungen ergaben eine 100% Übereinstimmung zum Vortypisierungsergebnis.

Für die Validierung und die Qualitätskontrollen der Mixe werden DNA Proben verwendet, die mit dem BAG EXTRA GENE I Kit (Aussalzungsmethode) oder den QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini und Maxi Kits (Säulenmethode) isoliert wurden. Bei Verwendung von anderen DNA-Extraktionskits muss vom Anwender validiert werden, ob die isolierte DNA für den Einsatz mit den HISTO TYPE Kits geeignet ist.

Die HISTO TYPE Kits sind mit der Happy Taq (REF 70976) validiert. Bei Verwendung einer anderen Taq-Polymerase muss diese vom Anwender für den Einsatz mit den HISTO TYPE Kits validiert werden.

Eine zuverlässige Typisierung ist bei einer Einsatzmenge von 25 – 50 ng DNA pro Reaktionsmix gewährleistet.

4. Testdurchführung

4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Bei der PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode, die von geschultem, in Molekular- und Histokompatibilitätstestung erfahrenem Personal durchgeführt werden sollte. Transplantationsrichtlinien und aktuelle EFI- / DGI-Standards sind zu beachten, um insbesondere bei diskrepanten Ergebnissen in serologischer und molekularbiologischer Testmethode, das Risiko von Fehlbestimmungen zu verringern.

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

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

4.2 DNA-Isolierung

Das Probenmaterial für die Isolation der genomischen DNA sollte in geeigneten Abnahmesystemen verschickt werden. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen [6], derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet. Es wird der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen.

Validierte DNA Extraktionsmethoden:

- EXTRA GENE I Kit (BAG)
- QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini und Maxi Kit

Soll die bereits im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden, ist diese vom Anwender zu validieren.

Für den Test wird eine DNA Konzentration von 25-50 ng/µl benötigt.

Die DNA sollte folgende Reinheitsindices aufweisen:

- $OD_{260} / OD_{280} = >1,5$ und $<2,0$ (Indikator für Kontamination mit RNA / Proteinen)
- $OD_{260} / OD_{230} = >1,8$ (Indikator für Kontamination mit Salzen, Kohlenhydraten oder organischen Lösungsmitteln)

4.3 Amplifikation

Alle vorpipettierten Reaktionsmische beinhalten bereits die allelspezifischen Primer, Nukleotide sowie die Primer der internen Amplifikationskontrolle und liegen in getrockneter Form vor. Die Amplifikationsparameter sind auf ein Endvolumen von 10 µl optimiert.

1. Den 10 x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen.
2. Die gewünschte Anzahl der HISTO TYPE–Platten/Streifen aus dem Kit entnehmen.
3. Den Master-Mix bestehend aus 10x PCR-Puffer, DNA-Lösung, Taq-Polymerase und Aqua dest. zusammenpipettieren und gründlich vortexen. Die verschiedenen HISTO TYPE Kits werden mit dem gleichen Master-Mix angesetzt und sind daher miteinander kombinierbar. Die Zusammensetzung des Master-Mixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmische ist in Tabelle 1 (s. unten) angegeben.

Beim **HISTO TYPE B27** Kit empfiehlt es sich ein **Taq-Puffer-H₂O Gemisch herzustellen:**

0,08 µl	Taq Polymerase (5 U/µl)	x Anzahl Bestimmungen +1
1,0 µl	10x PCR-Puffer	x Anzahl Bestimmungen +1
7,0 µl	H ₂ O	x Anzahl Bestimmungen +1

Dieses Gemisch bitte gründlich mischen und hiervon **8,0 µl** in jedes Reaktionsgefäß pipettieren.

Anschließend **2,0 µl DNA-Lösung** (12,5 - 25 ng/µl) in das jeweilige Reaktionsgefäß geben.

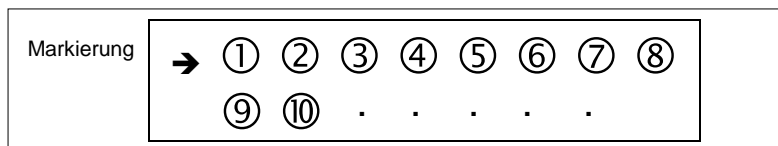
Wenn eine **Kontaminationskontrolle** mitgeführt werden soll, den Master-Mix zunächst ohne DNA-Lösung ansetzen und 10 µl von diesem Mix in den Reaktionsmix für die Kontaminationskontrolle (blau angefärbt) pipettieren. Anschließend die DNA-Lösung zum restlichen Master-Mix geben und gründlich vortexen.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Master-Mixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmische:

Anzahl Mixe	Aqua dest.	10x PCR-Puffer	DNA-Lsg. (25-50 ng/µl)	Happy Taq (5 U/µl)	Gesamt-volumen
1	8	1	1	0,08	10 µl
4	63	8	8	0,6	80 µl
8	79	10	10	0,8	100 µl
24	222	28	28	2,2	280 µl
30	269	34	34	2,7	340 µl
32	285	36	36	2,9	360 µl
48	412	52	52	4,2	520 µl
54	459	58	58	4,6	580 µl
56	475	60	60	4,8	600 µl
72	618	78	78	6,2	780 µl
80	681	86	86	6,9	860 µl
96	808	102	102	8,2	1020 µl

- ⇒ Die eingesetzte DNA-Menge muss 25-50 ng pro Mix betragen. Wenn die DNA-Konzentration außerhalb des angegebenen Bereichs liegt, müssen die eingesetzten Volumina entsprechend korrigiert werden (z.B. für 24 Mixe: 14 µl DNA (100 ng/µl) und 236 µl Aqua dest.)
- ⇒ Wenn eine andere Taq-Polymerase verwendet werden soll, so muss diese vom Anwender mit den HISTO TYPE Kits validiert werden.

4. Nach dem Vortexen werden von diesem Gemisch umgehend je **10 µl** zu den bereits in den Reaktionsgefäßen vorgelegten Reaktionsmischen pipettiert. Nach jedem Pipettierschritt muss die Spitze gewechselt werden. Die Gefäße werden mit den dafür vorgesehenen Deckeln bzw. Folie **dicht** verschlossen. Es ist darauf zu achten, dass die Deckelinnenseiten und die oberen Ränder nicht mit den Fingern berührt werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Bei Cyclern mit festdrehbarem Deckel können auch wiederverwendbare PCR-Matten zum Verschließen verwendet werden. Durch leichtes Schütteln der Platte / des Streifens sollte das Pellet am Gefäßboden etwas angelöst werden, und es sollte darauf geachtet werden, dass sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet. Gegebenenfalls sollte die Platte / der Streifen kurz anzentrifugiert werden.



Hinweis zu HISTO TYPE B*57:01/B*51

Wenn entweder nur B*57:01 oder nur B*51 nachgewiesen werden soll, den Mastermix nur in die entsprechenden Reaktionsmische pipettieren (Spezifität der Reaktionsmische s. Spezifitätstabelle auf Informations-CD).

5. Die Reaktionsgefäße in den Cyclern stellen (auf festen Sitz achten!) und das PCR-Programm starten.
Ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl ist bei Verwendung eines beheizten und justierbaren Deckels **nicht** nötig !

Amplifikationsprotokoll

Programm-Schritt	Temp.	Zeit	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	96°C	5 Min	1 Zyklus
Denaturierung	96°C	20 Sek	5 Zyklen
Annealing+Extension	68°C	1 Min	
Denaturierung	96°C	20 Sek	10 Zyklen
Annealing	64°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Denaturierung	96°C	20 Sek	15 Zyklen
Annealing	61°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Letzte Extension	72°C	5 Min	1 Zyklus

Validierte Cycler-Typen:

PTC 100 / 200 / C1000 (MJ Research/BioRad),
GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (bitte Heizrate vom 9600 verwenden), Veriti (ABI),
Mastercycler epGradient S (bitte Funktion „simulate Mastercycler gradient“ verwenden) (Eppendorf),
Tprofessional (Biometra)

Keine Aluminiumheizblöcke verwenden (z.B. GeneAmp PCR-System 9600 / 9700)!

Bei Cyclern mit sehr schnellen Heiz- und Kühlraten wird empfohlen eine etwas langsamere Heiz- und Kühlrate (~ 2,5°C/sec) zu wählen.

Da Cycler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Cycler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss bei Verwendung von anderen Cyclern ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert bzw. diese Geräte vom Anwender validiert werden.

Prinzipiell kann folgendermaßen vorgegangen werden:

Bei **falsch positiven** Reaktionen (unspezifische Banden, zusätzliche Typen):
Erhöhung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten.

Bei **falsch negativen** Reaktionen (fehlende Banden und/oder Amplifikationskontrollen):
Erniedrigung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten und / oder Erhöhung der Annealing-Zeiten in 5 Sekunden-Schritten und / oder Erhöhung der Denaturierungs-Zeiten in 5 Sekunden-Schritten.

Es wird empfohlen nur regelmäßig kalibrierte Cycler zu verwenden. Hierfür eignet sich gut der CYCLER CHECK (REF 7104, 71044).

Die Qualitätskontrollen wurde mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) und Tprofessional (Biometra) durchgeführt.

4.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Auswertung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Elektrophorese über ein (Horizontal-) Agarose-Gel. Als Laufpuffer wird 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)-Puffer empfohlen. Die Gelstärke sollte 2,0 - 2,5% Agarose betragen. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens 30 Minuten polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cycler entnommen und die kompletten Ansätze vorsichtig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Die Zugabe von Probenpuffer ist nicht mehr nötig. Zusätzlich sollte eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard für den Größenvergleich beladen werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10-12 V/cm (bei 20 cm Elektrodenabstand ca. 200-240 V) für 20-40 Minuten. Nach abgeschlossenem Lauf das komplette Gel für 30-45 Minuten in einer Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung (ca. 0,5 µg/ml EtBr in H₂O oder TBE-Puffer) färben. Alternativ kann EtBr (0,5 µg/ml) auch dem Elektrophorese-Puffer oder dem Agarose-Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall das Gel für ca. 20-30 Minuten in H₂O entfärben.

4.5 Dokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (220-310 nm) gelegt und mit einer geeigneten Kamera (z.B. Polaroid, Film Typ 667 oder Video-System, Typ KP65HM-CE) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben.

Unter Einbeziehung der Spezifitätstabelle und der Hit Table (s. Informations-CD) werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich des DNA-Längenstandards die richtige Größe besitzen.

Im HISTO TYPE B27 Kit haben die spezifischen Banden die Größe von 420 bp und/oder 85 bp.

Bei den anderen HISTO TYPE Produkten sind die korrekten Größen den Auswertunterlagen zu entnehmen. In allen Spuren ohne spezifische Amplifikation muss in jedem Fall die interne Kontrolle bei **1070 bp (bei HISTO TYPE Celiac Disease 1070bp/429bp)** erscheinen. In den Ansätzen mit spezifischer (und unspezifischer) Reaktion fällt die interne Kontrolle meist schwächer aus oder kann gänzlich verschwinden!

Wenn weder eine spezifische Bande noch eine Kontrollbande auftritt, ist das Ergebnis mit dem betroffenen Mix nicht auswertbar.

Mögliche Fehlerquellen bei nicht auswertbaren Ergebnissen siehe Punkt 6.

In der **Kontaminationskontrolle** darf keine Bande erscheinen. Beim Vorliegen einer Kontamination mit genomischer DNA erscheint eine Bande bei 282 bp. Zusätzlich können Banden bei 78 bp, 104 bp, 176 bp und ca. 580 bp zu sehen sein. Liegt eine Kontamination mit Amplifikaten vor, erscheint eine Bande bei 78 bp und/oder 104 bp und/oder 176 bp und/oder 282 bp und/oder 580 bp.

Für die Auswertung ist die HISTO MATCH Auswertesoftware (kostenlos bei BAG Diagnostics erhältlich) oder die SCORE Software (Vollversion) zu verwenden (außer für HISTO TYPE B27 low und HISTO TYPE Narcolepsy).

Dateien für die Auswertung mit HISTO MATCH und SCORE befinden sich auf der Informations-CD und sind erhältlich über den Download Server (<http://service.bag-diagnostics.com>) oder über unseren Customer Service (Tel.: +49 (0)6404-925-125).

5. Warn- und Entsorgungshinweise

Ethidiumbromid ist ein stark mutagenes Reagenz. Hautkontakt und Kontaminationen vermeiden! Die Gebrauchsinformation sowie die Warn- und Entsorgungshinweise des entsprechenden Herstellers sind zu beachten !

Der Transilluminator sendet sehr kurzwelliges UV-Licht aus, das Verbrennungen der Haut und der Netzhaut hervorrufen kann. UV-Gesichtsschutz tragen!

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut, sonstige Körperflüssigkeiten) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

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 regionalen Behörden erfolgen.

Eine Erklärung zum Sicherheitsdatenblatt (SDS) kann unter www.bag-diagnostics.com heruntergeladen werden.

6. Mögliche Fehlerquellen








Fehler	mögliche Ursache	Beseitigung
keine Amplifikation, Längenstandard sichtbar	DNA verunreinigt DNA degradiert	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch / zu niedrig	DNA-Konzentration ändern, DNA-Isolierung wiederholen
	Enzym fehlt oder Konzentration zu niedrig	Typisierung wiederholen, Enzym-Konzentration ändern
	DNA aus Heparin-Blut	Typisierung mit EDTA-Blut wiederholen
	falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.3) ☆
Wiederholte Ausfälle (keine Kontroll- Bande) in einzelnen Spuren	Deckel der Reaktionsgefäße schließen nicht dicht; dadurch Wasserverlust und Konzentra- tionsänderung während PCR	Deckel fest verschließen
unspezifische Amplifikation, Zusatzbanden (zusätzliche Banden falscher Größe sind zu vernachlässigen)	Kontamination mit Amplifikaten	Typisierung wiederholen auf sauberes Arbeiten achten
	DNA mit Salzen verunreinigt	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch	weniger DNA einsetzen
	Enzym-Konzentration zu hoch	weniger Enzym einsetzen
	falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.3) ☆
Auswertung ergibt mehr als 2 Spezifitäten	Kontamination mit Fremd-DNA (Amplifikat !) Neues Allel	Reaktionsmixe testen (ohne Zugabe von DNA) auf sauberes Arbeiten achten
keine oder sehr schwache Banden sichtbar, Längenstandard kaum sichtbar	Färbung zu schwach	Färbung wiederholen
Gel-Hintergrund leuchtet zu stark	Färbung zu lange, Farbstoff-Konzentration zu hoch	mit H ₂ O entfärben, Farbstoff niedriger konzentrieren
Verschmierte Banden im Gel	Laufpuffer zu heiß oder ver- braucht, falscher Laufpuffer, Gel nicht auspolymerisiert	Geringere Voltzahl wählen, 0,5x TBE Puffer verwenden Gel auspolymerisieren lassen

☆ Bei Verwendung der angegebenen Geräte und Materialien ist eine Optimierung der Amplifikationsparameter als letztes Hilfsmittel einzusetzen. In den meisten Fällen ist eine Auswertung durch die Eliminierung der Zusatzbanden aufgrund der Größenabweichung möglich.

7. Literatur

1. Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens **49**:297-321
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367
8. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem **43**:2204-2206
9. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology **128**:33.37
10. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition **54**:136-160
11. Deutsches Ärzteblatt vom 10.03.2008
12. Mallal et al., Lancet 2002; 359: 727-732
13. Mallal et al., New England Journal of Medicine 2008; 358: 568-579
14. Menthon et al., Arthritis & Rheumatism 2009; 61: 1287-1296; DOI 10.1002/art.24642
15. Nishino, S. et al., 2000. Sleep Medicine Reviews **4**:75-99
16. Mignot, E. et al., 2001. Am. J. Hum. Genet. **68**:686-699
17. Overeem, S. et al. 2008. Sleep Medicine Reviews **12**:95-107
18. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
19. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706

8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur / Temperaturbegrenzung
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Achtung
	Ausreichend für n Tests
	Hersteller
CONT	Inhalt, enthält
CONTROL CC	Kontaminationskontrolle
eIFU	Elektronische Gebrauchsinformation
HLA TYPING	Zweckbestimmung: HLA-Typisierung
HISTO TYPE INFORMATION CD	CD (enthält Gebrauchsinformationen, Dateien zur Auswertung, Qualitätskontrollzertifikat)
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nr.
OR	Oder
PCRBUFF 10x	PCR-Puffer, 10x konzentriert
PCRCAP	PCR-Deckel
PCRFOIL	PCR-Folie
PCRPLATE	PCR-Platten
PCRSTRIP	PCR-Streifen
REACTIONMIX	Reaktionsmische
REF	Bestell-Nr.
RTU	Gebrauchsfertig
TAQ POLYMERASE	Taq-Polymerase
WORKSHEET	Auswertungsbogen