

**DE**

## Gebrauchsinformation

# FastQ<sup>®</sup> B\*27

Testkit zur Bestimmung von HLA-B\*27 auf molekulargenetischer Basis

Elektronische Gebrauchsinformation siehe [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)

**IVD****REF 728208 FastQ<sup>®</sup> B\*27****CE**

### Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG.....	2
2. PRODUKTBESCHREIBUNG .....	2
3. TESTPRINZIP .....	2
4. MATERIAL .....	2
4.1 Inhalt des FastQ <sup>®</sup> B*27 Kits .....	2
4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte .....	2
4.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße .....	3
4.4 Empfehlungen für nicht validierte Cycler und Reaktionsgefäße .....	3
5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	3
6. TESTDURCHFÜHRUNG .....	4
6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise .....	4
6.2 DNA Isolation.....	4
6.3 Amplifikation .....	4
6.4 Interpretation der Ergebnisse.....	6
7. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE .....	7
8. LEISTUNGSMERKMALE.....	8
9. GRENZEN DER METHODE .....	8
10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE .....	9
11. PROBLEMBEHANDLUNG.....	9
12. VERWENDETE MARKENNAMEN.....	9
13. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN .....	10
14. LITERATUR.....	10

Änderungen zu Version 5/2021 sind gelb markiert.

Version: 6/2021 / Stand: 2021-08

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Die Zweckbestimmung der FastQ® Produktlinie ist die Bestimmung von humangenetischen Merkmalen, die mit Krankheiten oder pharmakogenetischen Reaktionen assoziiert sind. Für den FastQ® B\*27 Kit ist es die Bestimmung der mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziierten HLA-B\*27 Allelen (s.a. Produktbeschreibung).

## 2. PRODUKTBESCHREIBUNG

Der **FastQ® B\*27** Kit wird zum molekulargenetischen Nachweis von HLA-B\*27 Allelen eingesetzt. Das HLA-B\*27 Protein ist eine Variante des Human Leucocyte Antigen-B (HLA-B) und ist mit dem Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen (Morbus Bechterew bzw. Spondylitis ankylosans, Morbus Reiter, reaktive Arthritiden) assoziiert. Der Nachweis von HLA-B\*27 wird daher für die Diagnostik genutzt (1, 2). Ein positiver HLA-B\*27 Befund ist mit einem sehr hohen Krankheitsrisiko verbunden. Vor allem bei unklarem Verdacht auf M. Bechterew liefert eine gesicherte HLA-B\*27 Diagnostik einen entscheidenden Beitrag für die Therapie eines Patienten. Etwa 3 bis 6% der Träger des HLA-B\*27-Gens erkranken an Spondylitis ankylosans und mehr als 90% aller Patienten mit seronegativen Arthritiden sind Träger dieses Gens.

Im **FastQ® B\*27** Kit werden alle häufigen HLA-B\*27-Subtypen erfasst. Außerdem wird zwischen den krankheitsassoziierten Allelen und den Subtypen HLA-B\*27:06 oder HLA-B\*27:09, die beide nicht mit dem Auftreten der Spondylitis ankylosans assoziiert sind (3), differenziert.

## 3. TESTPRINZIP

Der Test wird mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die DNA wird mit sequenz-spezifischen Primern (SSP) auf dem Exon 2 und 3 des HLA-B\*27 Gens amplifiziert, die nur die B\*27 Subtypen erfassen. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) nachgewiesen (RT-PCR), wodurch die diagnostische Sensitivität und Spezifität des Test im Vergleich zur klassischen SSP erhöht wird.

Wenn Amplifikate vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq Polymerase hydrolysiert und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge des PCR-Produkts ansteigt. Die Fluoreszenzsignale werden von der optischen Detektionseinheit des RT-PCR-Cyclers gemessen. Der Test wird in einer einzigen PCR-Reaktion durchgeführt, in der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen die interne Kontrolle (humanes HBB Gen), die krankheitsassoziierten Subtypen und die nicht krankheitsassoziierten Subtypen nachgewiesen werden.

## 4. MATERIAL

### 4.1 Inhalt des FastQ® B\*27 Kits

- **260 µl Q Primermix B27**, gebrauchsfertig, enthält Primer und Sonden
- **260 µl Plex Mix**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
- **Gebrauchsinformation**

### 4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur DNA Isolation (validierte Extraktionskits siehe 6.2)
- Real-Time PCR-Cycler (validierte Cycler siehe 4.3)
- RT-PCR Reaktionsgefäße mit Deckeln oder Abdeckfolien (validierte Produkte siehe 4.3)

- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- Colour Compensation Kit für den LightCycler® 480 II (wird von BAG Diagnostics zur Verfügung gestellt)

#### 4.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	RT PCR Reaktionsgefäße	RT PCR Verschlussystem
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Fa. Bio-Rad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate 96 white wells, black frame Product No. 4ti-1201 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences	4titude Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Optically clear adhesive film, Product No. 4ti-0560 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences

**Hinweis:** Bei Verwendung von anderen Real-Time-Thermocyclern, Reaktionsgefäßen und Verschlussystemen müssen diese vom Anwender validiert werden.

#### 4.4 Empfehlungen für nicht validierte Cycler und Reaktionsgefäße

Für die unten genannten Cycler liegen erfolgreiche initiale Testungen vor, aber keine vollständige Validierung. Die Tabelle enthält die empfohlenen Spezifikationen.

Cycler	RT-PCR Reaktionsgefäße	RT-PCR Verschlussystem
LightCycler® 480 System Fa. Roche	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white Product No. 04729692001 Fa. Roche	LightCycler® 480 Sealing Foil, Product No. 04729757001 Fa. Roche
MIC (Magnetic Induction Cycler) Fa. Bio Molecular Systems	Tubes and caps: MIC-TUBES No. 68MIC-60653 Exklusiver Vertrieb (D/A): Fa. Biozyme	
Rotor-Gene Q Fa. Qiagen	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, Cat No./ID 981103 oder 981106, Fa. Qiagen	
Lightcycler 2.0 Fa. Roche	n.a.	

### 5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Die Kits werden **mit Trockeneis** versandt. Nach Erhalt müssen alle Reagenzien bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  in temperaturüberwachten Geräten gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der jeweiligen Reagenzien angegeben. Das auf dem Außenetikett angegebene Verfallsdatum bezieht sich auf den Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Die Testung der Auftau-Gefrierzyklen hat ergeben, dass für den Plex Mix bis zu 12 Zyklen und für den Q Primermix B27 bis zu 15 Zyklen keinen nachteiligen Effekt auf die Qualität des Kits haben. Für mehr Gefrierzyklen liegen noch keine Daten vor. Daher wird empfohlen, die Reagenzien ggf. zu aliquotieren.

## 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. Die Ergebnisse dieser Tests dürfen nicht als alleinige Grundlage für klinische Entscheidungen verwendet werden.

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
- ◆ wenn möglich zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion) einrichten
- ◆ 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 (4), derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet und dürfen nicht verwendet werden.

Es wird empfohlen, für die DNA-Isolation **CE** IVD zugelassene Extraktionskits zu verwenden.

#### Validierte DNA Extraktionskits:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (Säulen)
- Chemagic™ 360 (chemagic DNA Blood Kit, Beads)

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 Test wird eine DNA-Konzentration von 10 – 20 ng/µl benötigt.

Die Reinheitsindices müssen sich im folgenden Bereich befinden:

- $OD_{260}/OD_{280} = > 1,5$  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 Amplifikation

Es sollten die vom Hersteller des Real-Time PCR-Geräts empfohlenen Reaktionsgefäße verwendet werden bzw. die empfohlenen Materialien (siehe Punkt 4.3).

Für jede Probe die folgenden Reagenzien in ein Reaktionsgefäß pipettieren:

- 2 µl Q Primermix
- 2 µl Plex Mix
- 1 µl Proben DNA (10 – 20 ng/µl)
- 5 µl Aqua dest.

Das Reaktionsvolumen für jeden RT-PCR-Ansatz beträgt 10 µl.

<b>Empfohlene Ausnahmen</b>
<p><b><u>Rotor-Gene Q Cyclers</u></b></p> <p><b>Bei Verwendung des Rotor-Gene Q Cyclers muss ein höheres Reaktionsvolumen verwendet werden. Das Reaktionsvolumen beim Cyclers muss auf 20 µl eingestellt werden.</b></p> <p><b>Es gibt drei mögliche Ansatzvarianten:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Verdoppelung der oben angegebenen Volumina mit einem Endvolumen von 20 µl.</li> <li>b) Zugabe von weiteren 5 µl Aqua dest. (d.h. insgesamt 15 µl).</li> <li>c) Überschichten des Reaktionsansatzes mit 5 µl Mineralöl (d.h. insgesamt 15 µl).</li> </ul>
<p><b><u>Lightcycler 2.0</u></b></p> <p><b>Bei der Verwendung des Roche LC 2.0 Cyclers ist für die Erkennung der Reaktionsgefäße (Kapillaren) ein Referenzfarbstoff (ROX) erforderlich.</b></p> <p>Dabei muss die Endkonzentration 120 nM im RT-PCR-Ansatz (10 µl) betragen. Es wird empfohlen, dass Teilvolumen an Aqua dest. (5 µl) durch eine entsprechende ROX-Vorverdünnung (240 nM) zu ersetzen.</p>

Wenn ein Prä-Mix aus Q Primermix, Plex Mix und Aqua dest. für mehr als eine Probe hergestellt wird, bitte ein angemessenes Zusatzvolumen für Pipettierverluste einrechnen. Wenn eine **Negativkontrolle (NTC)** mitgeführt werden soll, eine PCR Reaktion mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA ansetzen.

Die Reaktionsgefäße verschließen und die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugieren. Sicherstellen, dass sich keine Blasen in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen auftreten, die Gefäße vorsichtig auf den Labortisch klopfen, um diese zu entfernen. Dann die PCR-Reaktion mit den folgenden Parametern durchführen.

Programm-Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	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	

\* die Standard- Ramp rate für das CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System verwenden.

**Bitte beachten:** Vor dem Starten des Programms den korrekten Scan Mode auswählen: All Channels. Wenn der falsche Scan Mode verwendet wird, kann der Test nicht ausgewertet werden und muss wiederholt werden. Die Deckeltemperatur muss auf 105°C eingestellt sein.



**Empfehlungen für nicht validierte, aber getestete Real-Time Thermocycler:**

- Für den LightCycler 480 II muss eine „Colour Compensation“ durchgeführt werden (Kit wird von BAG Diagnostics zur Verfügung gestellt).
- Bei Verwendung des Rotor-Gene Q Cyclers muss beim Cyler das Reaktionsvolumen auf 20 µl eingestellt werden. Bei der Analyse der Daten kann die Funktion „Use noise slop correction“ verwendet werden.

**6.4 Interpretation der Ergebnisse**

Alle Testansätze mit humaner gDNA müssen Fluoreszenzsignale im grünen Kanal (FAM) der internen Kontrolle aufweisen. HLA B\*27 positive Proben zeigen ein positives Farbsignal im Kanal für CAL Fluor® Orange 560. Im roten Farbkanal (CAL Fluor® Red 610) werden die unabhängig detektierten B\*27:06, B\*27:09 Allele nachgewiesen.

Fluorophor	Common	Well documented	Rare
CAL Fluor® Orange 560 (B*27 positiv)	B*27:02:01:01, *27:03, *27:04:01, *27:05:02:01, *27:06:01:01, *27:07:01, *27:08,	B*27:01, *27:05:03, *27:09, *27:10, *27:12, *27:14, *27:15, *27:17, *27:19:01:01, *27:20, *27:24, *27:27	B*27:02:01:02-*27:02:01:05, *27:04:02-*27:04:06, *27:05:02:02- *27:05:02:20, *27:05:04-*27:05:46, *27:06:01:02, *27:07:02-*27:07:06, *27:11, *27:13, , *27:19:01:02, *27:21, *27:25, *27:26, *27:28 , *27:30-*27:74, *27:76, *27:79-*27:84, *27:86-*27:91, *27:93 -*27:118, *27:120-*27:128, *27:130-*27:152, *27:154-*27:156, *27:158-*27:188, *27:190-*27:203, *27:205-*27:221 / B*44:97
CAL Fluor® Red 610 (B*27:06, *27:09 positiv)	B*27:06:01:01	B*27:09	B*27:06:01:02, *27:41, *27:91, *27:106, *27:136, *27:154, *27:192, *27:208 / B*15:129, B*15:395 / B*18:02:01, B*18:179

(IMGT Database 3.38.0).

Die Amplifikationssignale von Negativkontrollen (B\*27 negativ) sollten sich für die zwei Farbkanäle jeweils außerhalb der definierten Cq-Werte befinden. Eine Negativkontrolle mit Aqua dest. darf über den gesamten RT-PCR-Lauf keine Fluoreszenzsignale entwickeln und dient als Kontaminationskontrolle. Wenn bei der Negativkontrolle mit Aqua dest. Fluoreszenzsignale innerhalb der definierten Cq-Bereiche auftreten, weist dies auf eine Kontamination hin. Fluoreszenzsignale außerhalb der definierten Cq-Bereiche können aufgrund der sehr sensitiven Testmethode bei ungenauem Pipettieren auftreten. Eine Detailanalyse wird empfohlen; ggf. ist der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Es gelten die folgenden Werte für positive Signale:

	Fluorophor	Cq-Wert	Wellenlänge in nm
Interne Positivkontrolle	FAM	$\leq 20$	Excitation: 495 Emission: 520
B*27 positiv	CAL Fluor® Orange 560 (HEX)	$\leq 25$	Excitation: 538 Emission: 559
B*27:06 positiv B*27:09 positiv	CAL Fluor® Red 610 (RED)	$\leq 20$	Excitation: 590 Emission: 610

**Bitte beachten:** Wenn auf dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System der "Auto Calculated Baseline Threshold" verwendet wird, können kleine Schwankungen des Fluoreszenzsignals von der Software als positives Signal gewertet werden und ein Cq Wert wird angegeben. Die sigmoide Form der Kurve muss geprüft und ggf. der farbspezifische Threshold angepasst werden.

## 7. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

FastQ® B\*27 ist für den Gebrauch als In vitro Diagnostikum konzipiert und 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. 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 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.

**Für den Plex Mix gilt folgende Gefahrstoffkennzeichnung:****Symbol: Warnung****Gefahrenhinweise**

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

**Sicherheitshinweise**

P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.

P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.

P103 Lesen Sie sämtliche Anweisungen aufmerksam und befolgen Sie diese.

P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen.

P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P501 Inhalt/Behälter gemäß lokalen/nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

Ein Sicherheitsdatenblatt für den Plex Mix kann unter [www.bag-diagnostics.com](http://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 sind nicht erforderlich.

**8. LEISTUNGSMERKMALE**

Die Kombination der Primer und Sonden gewährleistet eine eindeutige Bestimmung der in Kapitel 6.4 spezifizierten B\*27 Allele. Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität des Testkits wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten HLA-Allelen überprüft.

Für den FastQ® B\*27 Kit wurden Leistungsstudien mit insgesamt 95 vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen anderer CE zertifizierter Typisierungsreagenzien (u.a. Serologie, SSO, SSP) und/oder Sequenzierung verglichen. Dabei sind keine Diskrepanzen bei der Bestimmung des Merkmals HLA-B27 aufgetreten.

DNA-Proben	Gesamtzahl (Interne Studie)	Übereinstimmung in Prozent [%]
B27 negativ	84	100
B27 positiv	11	100
<b>Gesamt</b>	<b>95</b>	<b>100</b>

Zusammenfassung der Probenanzahl für die interne Leistungsstudie, der Ergebnisse mit Angabe der Übereinstimmung in Prozent zur Referenztypisierung und Nachweis von HLA-B27

**9. GRENZEN DER METHODE**

Da das RT-PCR-Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen von DNA reagiert, ist bei der Isolation hierauf zu achten. Validierungstests innerhalb der Leistungsbewertungsstudie des FastQ® B\*27 Kits haben gezeigt, dass DNA Mengen von 2 ng bis 50 ng pro Reaktion keinen signifikanten Einfluss auf den spezifischen Nachweis des Gewebemerkmals HLA B\*27 haben.



Es sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons oder DNA zu vermeiden. Die regelmäßige Durchführung von Wischtests (z.B. BAG Wischtest, REF 7091) und die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. bei jedem Testlauf werden empfohlen.

In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden ( $C_q > N.A.$ ).

Im Fall einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle (FAM-Kanal) ist der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und gegebenenfalls die Reagenzien auszutauschen.

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

## 10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots des FastQ® B\*27 Kits können mit einer Kombination von DNA Proben mit bekanntem HLA Typ durchgeführt werden. Eine interne Kontrolle zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation ist im Q Primermix enthalten.

Die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird eine PCR Reaktion ohne DNA angesetzt (NTC).

## 11. PROBLEMBEHANDLUNG







Fehler	mögliche Ursache	mögliche Lösung
<b>Schlechtes bzw. kein Signal</b>	Vorhandensein eines Inhibitors.	FrISChe Reagenzien verwenden.
	Keine gDNA im Reaktionsansatz.	Test wiederholen. Auf richtiges Pipettieren achten.
	Falsche Amplifikationsparameter.	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrate) überprüfen.
	Verunreinigte oder degradierte DNA.	DNA-Konzentration/Qualität überprüfen. DNA auf einem Gel überprüfen. DNA-Isolierung wiederholen.
	Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert.	Neuen Primermix verwenden. Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/Auftauen vermeiden. Lagerungsbedingungen beachten!
	Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand.	Vorsichtiges Pipettieren. Abzentrifugieren der PCR Platte.
	Nicht kompatible bzw. qualitativ minderwertige RT-PCR Plastikware.	Verwendung von kompatibler und hochwertiger Plastikware. Siehe Punkt 4.3.
	Falsche Signalverrechnung durch abnormale Amplifikationssignale in den initialen Zyklen eines Laufes.	Anwendung von Korrekturmaßnahmen durch Software (z.B. "apply fluorescence drift correction"-Funktion von Bio-Rad oder Ausschluss der ersten fünf Cyclen aus der Analyse).
	Verdunstung der Reagenzien durch unsachgemäßes Verschließen der PCR Gefäße	Prüfung auf korrektes Verschließen. Vorsicht bei Klebefolien im Randbereich.
<b>Signal in Negativkontrolle</b>	Kontamination der Negativkontrolle mit DNA	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.

## 12. VERWENDETE MARKENNAMEN

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

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

**13. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN**

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
<b>CONT</b>	Inhalt, enthält
<b>GENOTYPING</b>	Zweckbestimmung: Bestimmung von humangenetischen Merkmalen, die mit Krankheiten oder pharmakogenetischen Reaktionen assoziiert sind
<b>IFU</b>	Gebrauchsinformation
<b>IVD</b>	In-vitro-Diagnostikum
<b>LOT</b>	Lot-Nr.
<b>Q PRIMERMIX   B27</b>	Primermix zur Bestimmung von HLA-B*27 mit dem FastQ® B27* Kit
<b>PLEX MIX</b>	Mastermix für RT-PCR
<b>REF</b>	Bestell-Nr.
	<b>Warnung (siehe Kapitel 7)</b>

**14. LITERATUR**

1. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet i:904-907
2. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706
3. Khan, MA et al., 2007. Autoimmunity Reviews 6: 183–189
4. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166