

**DE**

## Gebrauchsinformation

# FastQ<sup>®</sup> CD

Testkit zur Bestimmung von HLA-DQ Allelen, die mit Zöliakie assoziiert sind, auf molekulargenetischer Basis

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

**IVD**

**REF 728202 FastQ<sup>®</sup> CD**

**CE**

### Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG.....	2
2. PRODUKTBESCHREIBUNG .....	2
3. TESTPRINZIP .....	2
4. MATERIAL.....	2
4.1 Inhalt des FastQ <sup>®</sup> CD Kits (48 Tests).....	2
4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte .....	3
4.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße .....	3
5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	3
6. TESTDURCHFÜHRUNG .....	3
6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise .....	3
6.2 DNA Isolation.....	4
6.3 Amplifikation .....	4
6.4 Interpretation der Ergebnisse.....	6
6.5 Spezifität des Kits .....	8
7. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE .....	9
8. LEISTUNGSMERKMALE.....	10
9. GENZEN DER METHODE.....	10
10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE .....	11
11. PROBLEMBEHANDLUNG.....	11
12. VERWENDETE MARKENNAMEN.....	12
13. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN .....	12
14. LITERATUR.....	12

Änderungen zu Version 2/2020 sind gelb markiert.

**Version: 3/2021 / 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® CD-Kit** ist es die Bestimmung des Vorhandenseins von HLA-DQ-Allelen, die mit der Zöliakie assoziiert sind (s. a. Produktbeschreibung).

## 2. PRODUKTBESCHREIBUNG

Das **FastQ® CD Kit** wird zum molekulargenetischen Nachweis von HLA-DQ Allelen eingesetzt, die mit Zöliakie assoziiert sind. Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, die hauptsächlich den Dünndarm betrifft und durch eine Reaktion mit Gluten verursacht wird. Gluten ist Bestandteil verschiedener Getreidearten. Eine Gluten-Unverträglichkeit führt bei genetisch vorbelasteten Menschen zu einer abnormen Immunreaktion. Wenn die Krankheit nicht frühzeitig diagnostiziert wird, führt sie zu einer chronischen Entzündung und zur Zerstörung des Dünndarms. Das Auftreten einer Zöliakie ist stark mit den DQ-Genotypen HLA-DQA1\*02:01, HLA-DQA1\*05:05, HLA-DQA1\*05:01, HLA-DQB1\*03:02, HLA-DQB1\*02:01, HLA-DQB1\*02:02 assoziiert. Träger von HLA-Prädispositionsallelen haben vermutlich ein bis zu 40-mal höheres Risiko an Zöliakie zu erkranken, daher wird der Nachweis dieser Haplotypen in der Diagnostik eingesetzt (1-3). Die bestätigten diagnostischen Ergebnisse der HLA-DQ-Haplotypen leisten einen wichtigen Beitrag zur Therapie eines Patienten (glutenfreie Ernährung). Der **FastQ® CD Kit** weist alle DQ2/DQ8-Haplotypen nach, die mit dem Auftreten der Zöliakie assoziiert sind.

## 3. TESTPRINZIP

Der Test wird mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die DNA wird mit sequenzspezifischen Primern (SSP) amplifiziert. Die Primer wurden speziell für die selektive Amplifikation spezifischer Abschnitte des HLA-DQ-Gens entwickelt. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen fluoreszenzmarkierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) nachgewiesen, wodurch die Spezifität des Tests 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 zwei PCR-Ansätzen durchgeführt, in der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen die interne Positiv-Kontrolle (*human growth hormon*) und die krankheitsassoziierten Haplotypen nachgewiesen werden.

## 4. MATERIAL

### 4.1 Inhalt des FastQ® CD Kits (48 Tests)

- **130 µl Q Primermix CD I**, gebrauchsfertig, enthält Primer und Sonden
- **130 µl Q Primermix CD II**, 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 DNA Isolationskits 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. (DNase frei)
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- Zentrifuge (e.g. PlateFuge – MicroCentrifuge von Benchmark Scientific)
- 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 Verschlusssystem
CFX96™ 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	Crystal Strips Product No. 4ti-0755 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences  qPCRSeal (Optically clear adhesive film) Product No. 4ti-0560 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences
LightCycler® 480 II Fa. Roche	Roche Multiwell Plate 96, white Product No. 04729692001 Fa. Roche	qPCRSeal (Optically clear adhesive film) Product No. 4ti-0560 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences

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

## 5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Die Kits werden **mit Trockeneis** versandt. Nach Erhalt müssen alle Reagenzien bei  $\leq -20$  °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 die Q Primermixe bis zu 15 Zyklen keinen nachteiligen Effekt auf die Qualität des Kits haben. Für mehr Zyklen liegen noch keine Daten vor. Es wird daher 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) verwenden.
- ◆ wenn möglich, zwei getrennte Arbeitsbereiche für den Prä-Ansatz (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (PCR, 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  $\text{CE IVD}$  zugelassene Extraktionskits zu verwenden.

Validierte DNA Extraktionskits:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (Säulen)

Wenn die im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden soll, und dafür nicht das oben genannte Kit verwendet wird, muss diese vom Anwender validiert werden.

Für die Durchführung des **FastQ® CD** Tests ist eine DNA-Konzentration von 10-50 ng/ $\mu\text{l}$  erforderlich.

Die Reinheitsindizes müssen sich im folgenden Bereich befinden:

- $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = > 1.5$  und  $< 2.0$   
Höhere Werte deuten auf das Vorhandensein von RNA hin, niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen.
- $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} = > 1.8$   
Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination mit Salz, Kohlenhydraten oder organischen Lösungsmitteln hin.

## 6.3 Amplifikation

Es sollten die vom Hersteller des Real-Time-Cyclers empfohlenen Reaktionsgefäße oder die in Kapitel 4.3 empfohlenen Materialien verwendet werden.

Für jede Probe die folgenden Reagenzien in ein Reaktionsgefäß pipettieren:

Reaktion I		Reaktion II	
<b>2 <math>\mu\text{l}</math></b>	Q Primermix CD I	<b>2 <math>\mu\text{l}</math></b>	Q Primermix CD II
<b>2 <math>\mu\text{l}</math></b>	Plex Mix	<b>2 <math>\mu\text{l}</math></b>	Plex Mix
<b>1 <math>\mu\text{l}</math></b>	Proben DNA (10-50 ng/ $\mu\text{l}$ )	<b>1 <math>\mu\text{l}</math></b>	Proben DNA (10-50 ng/ $\mu\text{l}$ )
<b>5 <math>\mu\text{l}</math></b>	Aqua dest. (DNase frei)	<b>5 <math>\mu\text{l}</math></b>	Aqua dest. (DNase frei)

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

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 **Negativ-Kontrolle (NTC)** mitgeführt werden soll, eine PCR Reaktion mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA ansetzen.

Die Reaktionsgefäße verschließen und die Flüssigkeit kurz zentrifugieren. Sicherstellen, dass sich keine Blasen in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen auftreten, die Gefäße vorsichtig auf den Labortisch klopfen, um diese zu entfernen. Dann das PCR-Programm 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.

Die folgenden Real-Time-Cycler wurden für den **FastQ® CD** Kit validiert:

Bio-Rad: CFX96™ Real-Time PCR Detection System

Roche: LightCycler® 480 II

### Anmerkung

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System: 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.



- Bei Verwendung des LightCycler® 480 II Systems ist eine Farbkompensation (wird von BAG Diagnostics zur Verfügung gestellt) erforderlich.

Verwenden Sie die folgende Kanaleinstellung:

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
465	510	FAM	1	10	1
533	580	O560 (CalFluor Orange560)	1	10	1
533	610	R610 (CalFluor Red610)	1	10	1
618	660	Q670 (Quasar670)	1	10	1

#### 6.4 Interpretation der Ergebnisse

Alle Tests mit humaner gDNA müssen ein Fluoreszenzsignal im grünen Kanal (FAM) mit der internen Kontrolle aufweisen.

Die Amplifikationssignale von Proben, die für die nachgewiesenen DQ-Allele negativ sind, sollten sich für die drei 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. Wenn dies der Fall ist, sollte der Test wiederholt werden.

Proben mit den unten aufgeführten HLA-DQ-Allelen zeigen ein positives Signal mit den folgenden Fluorophoren für den CFX-Cycler:

Q Primermix CD I	Fluorophor / Farbkanal	Cq-Level	Wellenlänge [nm]
DQB1*02:01	CAL Fluor Red 610 / Texas Red	< 20	Excitation: 590 / Emission: 610
DQA1*05:05	Quasar 670 / Cy5	< 20	Excitation: 647 / Emission: 670
DQA1*02:01	CAL Fluor Orange 560 / HEX	< 15	Excitation: 538 / Emission: 559
IAC	FAM	< 18	Excitation: 495 / Emission: 520

Q Primermix CD II	Fluorophor / Farbkanal	Cq-Level	Wellenlänge [nm]
DQB1*02:02	CAL Fluor Red 610 / Texas Red	< 16	Excitation: 590 / Emission: 610
DQA1*05:01	Quasar 670 / Cy5	< 16	Excitation: 647 / Emission: 670
DQB1*03:02	CAL Fluor Orange 560 / HEX	< 17	Excitation: 538 / Emission: 559
IAC	FAM	< 18	Excitation: 495 / Emission: 520

Der Cq-Level ist der Cq-Bereich in dem für eine positive Reaktion die Fluoreszenz im entsprechenden Kanal detektiert wird. Als Baseline Threshold sollte der von der **Cycler-Software** automatisch gesetzte Threshold verwendet werden.

Es wird empfohlen die Plausibilität der Reaktionen anhand der Kurvenverläufe zu überprüfen und fragliche Ergebnisse zu wiederholen. Bei Fragen zur Anpassung des Thresholds oder grenzwertigen Cq-Werten wenden Sie sich bitte an den Service der BAG Diagnostics (Tel.: +49 (0)6404 925125, Email: [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com))

## 6.5 Spezifität des Kits

Im Einzelnen werden die folgenden Allele vom Kit erkannt:

Primermix I	Common*	Well documented*	Rare*
CAL Fluor® Red 610	DQB1*02:01:01:01, *02:03:01		DQB1*02:01:04-08, 15-37, *02:03:01/02, *02:07:01/02, *02:08, *02:09, *02:14:01/02, *02:27, *02:28?-*02:47?, *02:48, *02:49?-*02:52?, *02:53Q, *02:54?-*02:56?, *02:57, *02:48N?, *02:59, *02:60?, *02:61?, *02:63, *02:66?-*02:71?, *02:72, *02:73?-*02:78?, *02:79, *02:81- *02:83, *02:85?-*02:88?, *02:90?-*02:94?, *02:96N, *02:98, *02:99, *02:100?, *02:101?, *02:102, *02:103?, *02:104?, *02:105- *02:109, *02:111, *02:112, *02:114, *02:115, *02:118, *02:119, *02:123, *02:125, *02:128, *02:129N?, *02:130, *02:132N- *02:136, *02:139?, *02:140?, *02:148, *02:149, *02:151?, *02:152, *02:154, *02:155, *02:157- *02:160, *02:163N, *02:164, *02:166
Quasar® 670	DQA1*05:05:01:01, *05:08	DQA1*05:02?, *05:09	DQA1*05:04?, *05:05:01:02-22, *05:05:02-04, *05:10?, *05:11, *05:12?, *05:13, *05:14, *05:15N?, *05:16?, *05:17N?, *05:20, *05:21?, *05:22?,
CAL Fluor® Orange 560	DQA1*02:01:01:01		DQA1*02:01:01:02, *02:01:02, **02:02N- *02:10

Primermix II	Common*	*Well documented	*Rare
CAL Fluor® Red 610	DQB1*02:02:01:01		DQB1*02:02:01:02-04, *02:02:02-12, *02:05?, *02:06, *02:10- *02:12, *02:13?, *02:15?-*02:25?, *02:26, *02:28- *02:47?, *02:49, *02:50, *02:51?, *02:52?, *02:54?- *02:46?, *02:58N?, *02:60?, *02:61?, *02:62, *02:64, *02:65, *02:66?- *02:71?, *02:73?-78?, *02:80, *02:84, *02:85?- *02:88?, *02:89:01/02, *02:90?-*02:94?, *02:95, *02:97, *02:100?, *02:101?, *02:103?, *02:104?, *02:110, *02:113, *02:116, *02:117, *02:120- *02:122, , *02:124, *02:126, *02:127, *02:129N?, *02:131, *02:137, *02:138, *02:139?, *02:140?, *02:141- *02:147, *02:150, *02:151?, *02:153, *02:156, *02:161, *02:162N, *02:163N?, *02:165, *02:167N
Quasar® 670	DQA1*05:01:01:01, *05:03:01:01	DQA1*05:02	DQA1*05:01:01:02-04, *05:01:02/04/05/06, *0503:01:02, *05:03:02, *05:04, *05:07, *05:15N, *05:16, *05:18, *05:22
CAL Fluor® Orange 560	DQB1*03:02:01:01	DQB1*03:02:02	DQB1*03:02:01:02-08, *03:02:04-06/08/09/11/12/15-31, *03:07, *0308, *0311, *03:18, *03:32, *03:45:01/02, , *03:62, *03:63, *03:64, *03:66N, *03:67, *03:68, *03:70, *03:81, *03:85, *03:106, *03:107, *03:125, *03:146, *03:287, *03:289, *03:295, *03:296, *03:298, *03:299, *03:308, *03:310N, *03:315, *03:320- *03:324, *03:333, *03:334N, *03:339N, *03:343, *03:344, *03:345, *03:348, *03:349, *03:362, *03:364, *03:367, *03:368, *03:369, *03:379, *03:383, *03:386, *03:388, *03:392, *03:403N, *03:409, *03:410, *03:412

IMGT Database 3.38.0

? keine Sequenzinformationen für die Primerbindungsstelle verfügbar

\* Common und well documented Allele nach CWD 2.0.0 Katalog (5)

## 7. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

Der **FastQ® CD** Kit 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, Einweghandschuhe 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

Für das **FastQ® CD**-Kit wurde eine Leistungsbewertungsstudie mit insgesamt 90 vortypisierten DNA-Proben durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie wurden mit den Ergebnissen verglichen, die mit anderen CE-zertifizierten Typisierungsreagenzien (u.a. Serologie, SSO, SSP) und/oder Sequenzierung erzielt wurden. Es wurden keine Diskrepanzen bei der Erkennung der HLA DQ-Merkmale beobachtet (100 %ige Übereinstimmung).

### Q Primermix I

DNA Proben	Gesamtzahl (Interne Studie)	Übereinstimmung in Prozent [%]
DQA1*02:01	26	100
DQA1*05:05	28	100
DQB1*02:01	14	100
DQA1*02:01, DQA1*05:05, DQB1*02:01 negativ	22	100
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>100</b>

### Q Primermix II

DNA Proben	Gesamtzahl (Interne Studie)	Übereinstimmung in Prozent [%]
DQB1*03:02	17	100
DQA1*05:01	13	100
DQB1*03:02	20	100
DQB1*03:02, DQA1*05:01, DQB1*03:02 negativ	40	100
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>100</b>

## 9. GENZEN DER METHODE

Da das RT-PCR-Verfahren sehr empfindlich auf Kreuzkontaminationen reagiert, ist bei der DNA-Isolation hierauf zu achten. Validierungstests im Rahmen der Leistungsbewertungsstudie des **FastQ® CD**-Kits haben gezeigt, dass eine Variation der für die **Amplifikation** verwendeten DNA-Menge zwischen 5 ng und 50 ng keinen signifikanten Einfluss auf den Nachweis der HLA-DQ-Allele hat. 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 (Cq > N.A.).

Im Fall einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle (FAM-Kanal) ist der PCR-Laborplatz zu dekontaminieren, und die Reagenzien sind gegebenenfalls 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® CD** Kits können mit einer Kombination von DNA-Proben mit bekanntem HLA-Typ durchgeführt werden. Eine interne Positivkontrolle für eine erfolgreiche Amplifikation ist in den Q Primermixen I und II enthalten. Negativkontrollen zum Nachweis von möglichen Kontaminationen werden 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>	Vorhandener Inhibitor in der PCR-Reaktion	Frische Reagenzien verwenden
	Unzureichende Menge an DNA in der Reaktion	Wiederholen Sie den Test mit der richtigen Menge an DNA.
	Falsche Amplifikationsparameter	PCR-Programm überprüfen
	Verunreinigte oder degradierte DNA	DNA-Konzentration/Qualität überprüfen DNA mit 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
	Falsche Signalverrechnung durch abnormale Amplifikationssignale in den initialen Zyklen eines Laufs	Anwendung von Korrekturmaßnahmen in der Software (z.B. "apply fluorescence drift correction"-Funktion von Bio-Rad oder Ausschluss der ersten fünf Zyklen 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 & Quasar 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>PLEX MIX</b>	Mastermix für RT-PCR
<b>Q Primermix   CD I</b>	Primermix Nummer I für den Nachweis von HLA-DQ-Attributen mit dem FastQ CD Kit
<b>Q Primermix   CD II</b>	Primermix Nummer II für den Nachweis von HLA-DQ-Attributen mit dem FastQ CD Kit
<b>REF</b>	Bestell-Nr.
	<b>Warnung (siehe Kapitel 7)</b>

## 14. LITERATUR

1. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem **43**:2204-2206
2. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology **128**:33.37
3. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition **54**:136-160
4. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
5. Mack et al., 2003, Tissue Antigens **81**:194-203