

DE

Gebrauchsinformation

FastQ B*27 direct

Testkit zur Typisierung von HLA-B*27 auf molekulargenetischer Basis

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-diagnostics.com

IVD**REF 728201 FastQ B*27 direct****CE**

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. PRODUKTBESCHREIBUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. MATERIAL	2
4.1 Inhalt des FastQ B*27 direct Kits	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 Probenvorbereitung des Testmaterials	4
6.3 Amplifikation	4
6.4 Interpretation der Ergebnisse	5
6.5 Spezifität des Kits	5
7. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE	6
8. LEISTUNGSMERKMALE	6
9. GRENZEN DER METHODE	7
10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	7
11. PROBLEMBEHANDLUNG	7
12. VERWENDETE MARKENNAMEN	8
13. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN	8
14. LITERATUR	8

Änderungen zu Version 1/2019 sind gelb markiert.

Version: 2/2020 / Stand: 2020-04

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 direct Kit ist es die Bestimmung der mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziierten HLA-B*27 Allele (s.a. Produktbeschreibung).

2. PRODUKTBESCHREIBUNG

Der **FastQ B*27 direct** Kit wird zum molekulargenetischen Nachweis von HLA-B*27 Allelen eingesetzt. Das HLA-B27 Protein ist eine Variante des Humanen Leukozyten 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 direct** Kit werden alle häufigen HLA-B*27-Allele erfasst. **Der Test kann ohne DNA Isolation direkt aus Blut oder Buffy Coat durchgeführt werden.**

3. TESTPRINZIP

Der Test wird mit EDTA-Vollblut bzw. Buffy Coat als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die aus den Lymphozyten im Blut freigesetzte DNA wird mit sequenz-spezifischen Primern (SSP) auf dem Exon 2 des HLA-B*27 Gens amplifiziert, die nur die B*27 Subtypen erfassen. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen fluoreszenzmarkierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan[®]-Sonden) nachgewiesen (RT-PCR), wodurch die 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 Positiv-Kontrolle (*human growth hormon*) und die assoziierten Subtypen nachgewiesen werden.

4. MATERIAL

4.1 Inhalt des FastQ B*27 direct Kits

- **260 µl Q Primermix B27-d**, gebrauchsfertig, enthält Primer und Sonden
- **600 µl Q Mastermix**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
- **130 µl Blood Booster**, gebrauchsfertig, separat verpackt*, nicht Einfrieren!
- **Gebrauchsinformation**

***) Bei Bestellung eines FastQ B*27 direct Kits wird der Blood Booster, REF 728209, mitgeliefert.**

4.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Real-Time PCR-Cycler (Biorad CFX96™ und passende Reaktionsgefäße)
- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen

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 qPCR Seal (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

Der Q Primermix B27-d und der Q Mastermix werden bei ≤ -20 °C versandt. Nach Erhalt müssen diese Reagenzien bei ≤ -20 °C gelagert werden. Der Blood Booster wird bei Raumtemperatur versandt und bei 2...8°C gelagert – **der Blood Booster sollte nicht eingefroren 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 bis zu 15 Zyklen für den Q Primermix B27-d und den Q Mastermix keinen nachteiligen Effekt auf die Qualität des Kits haben.

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
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (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 Probenvorbereitung des Testmaterials

Als Ausgangsmaterial wird EDTA-Vollblut (whole blood = WB) oder Buffy Coat (BC) verwendet. Die Proben müssen **gut durchmischt** und wie folgt verdünnt werden:

→ Verdünnungsstufe 1:50: **5 µl** WB/BC + **245 µl** A. dest.

6.3 Amplifikation

Es sollten die vom Hersteller des Realtime PCR-Geräts empfohlenen Reaktionsgefäße verwendet werden.

Für jede Probe werden die folgenden Reagenzien in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

2 µl Q Primermix B27-d
5 µl Q Mastermix
1 µl Blood Booster
1 µl Testmaterial (verdünnt 1:50 in A.dest)
1 µl A. dest.

Das Testmaterial muss vor dem Ansatz gut durchmischt werden!

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

Wenn ein Prä-Mix aus Q Primermix B27-d, Q Mastermix, Blood Booster 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 mit Testmaterial 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	-	18
Annealing + Extension	25	64	2,2	-	
Denaturierung	5	98	2,5	-	42
Annealing + Extension	25	64	-	ja	

6.4 Interpretation der Ergebnisse

Alle Testansätze mit freigesetzter humaner gDNA müssen Fluoreszenzsignale im FAM- Kanal der internen Kontrolle aufweisen. Spezifisch positive Proben zeigen ein positives Farbsignal im korrespondierenden Farbkanal für CAL Fluor Orange 560.

Die Amplifikationssignale von Negativkontrollen (bekannte B*27 negative Proben) sollten sich für den CAL Fluor Orange 560 Farbkanal außerhalb des definierten Cq-Wertes befinden. Eine Negativkontrolle (NTC) mit Aqua dest. entwickelt über den gesamten RT-PCR Lauf keine Fluoreszenzsignale 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. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden. Darüber hinaus wird eine Detailanalyse empfohlen; ggf. ist der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Es gelten die folgenden Werte für positive Signale:

Spezifität	Fluorophor	Cq-Level	Wellenlänge [nm]
B*27	CAL Fluor Orange 560	< 30	Excitation: 538 / Emission: 559
Interne Kontrolle (IAC)	FAM	< 20	Excitation: 495 / Emission: 520

Der Cq-Level gibt an bis zu welchem Cq eine positive Reaktion (Fluoreszenzanstieg über den Threshold) im entsprechenden Kanal erwartet wird. Als Baseline Threshold (Schwellenwert) sollte der von der CFX 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).

6.5 Spezifität des Kits

Im Einzelnen werden die folgenden Allele vom Kit erkannt:

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

IMGT Database 3.38.0

* Common und well documented Allele nach CWD 2.0.0 Katalog (3)

7. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

Der **FastQ B*27 direct** 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 (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.

Ein Sicherheitsdatenblatt bzw. eine Erklärung zu Sicherheitsdatenblättern (SDB) kann unter www.baq-diagnostics.com heruntergeladen werden.

8. LEISTUNGSMERKMALE

Die Kombination der Primer und Sonden gewährleistet eine eindeutige Bestimmung der in Kapitel 6.5 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 direct** Kit wurden für die Bestimmung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität **des Q Primermix B27-d in Kombination mit dem Q Mastermix** Leistungsstudien mit insgesamt 120 vortypisierten Blutproben 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 (100% Übereinstimmung).

Blut-Proben	Gesamtzahl (interne u. externe Studie)	Übereinstimmung in Prozent [%]
B27 negativ	101	100
B27 positiv	19	100
Gesamt	120	100

Tabelle: Zusammenfassung der Probenanzahl für die interne und externe Leistungsstudie für den Q-Primermix B27-d, der Ergebnisse mit Angabe der Übereinstimmung in Prozent zur Referenztypisierung und Nachweis von HLA-B*27

Zusätzlich wurde die stabilisierende Wirkung des Blood Booster insbesondere bei frischen Blutproben in einer weiteren Studie mit 6 vortypisierten Blutproben nachgewiesen. Es gab keine Diskrepanzen bei der Bestimmung des HLA-B*27 Merkmals und die Varianz der Cq Werte wurde signifikant verringert.

9. GRENZEN DER METHODE

Da das RT-PCR-Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen von DNA reagiert, ist bei der Probenvorbereitung hierauf zu achten. Validierungstests innerhalb der Leistungsbewertungsstudie des **FastQ B*27 direct** Kits haben gezeigt, dass eine Probenvorverdünnung (WB/BC) zwischen 1:100 und 1:25 keinen signifikanten Einfluss auf den spezifischen Nachweis des Gewebemerkmals HLA B*27 hat. Es ist darauf zu achten, dass das Probenmaterial gut durchmischt wird, damit genügend kernhaltige Zellen für die PCR Reaktion zur Verfügung stehen. Das Nichtbeachten kann ggf. zu falsch negativen Ergebnissen im B*27 spezifischen Farbkanal führen.

Des Weiteren sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons, DNA oder Blutproben (WB/BC) 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 (Cq > N.A.).

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

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

10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots des FastQ B*27 direct Kits können mit einer Kombination von 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 Probenmaterial angesetzt (NTC).

11. PROBLEMBEHANDLUNG







Fehler	mögliche Ursache	mögliche Lösung
Schlechtes bzw. kein Signal	Vorhandensein eines Inhibitors	Frische Reagenzien verwenden
	Keine gDNA im Reaktionsansatz	Test wiederholen. Auf richtiges Pipettieren und Verdünnen des Blutes achten
	Falsche Amplifikationsparameter	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrate) überprüfen
	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
Signal in Negativkontrolle	Kontamination der Negativkontrolle mit Blut bzw. 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
	Lagertemperatur / Temperaturbegrenzung
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
BLOOD BOOST	Blood Booster, Reagenz für RT-PCR Kits für Nachweis direkt aus Vollblut oder Buffy Coat
CONT	Inhalt, enthält
GENOTYPING	Zweckbestimmung: Bestimmung von humangenetischen Merkmalen, die mit Krankheiten oder pharmakogenetischen Reaktionen assoziiert sind
IFU	Gebrauchsinformation
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nr.
Q MASTERMIX	Mastermix für RT-PCR Kits für Nachweis direkt aus Vollblut oder Buffy Coat
Q PRIMERMIX B27-d	Primermix zur Bestimmung von HLA-B*27 mit dem FastQ B*27 direct Kit
REF	Bestell-Nr.

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. Mack et al., 2003, Tissue Antigens 81:194-203