

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)



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

Version: 8/2022 / Stand: 2022-06 Änderungen zu Version 6/2021 und 7/2022 sind orange markiert.

Wenn ein ganzes Kapitel neu oder geändert ist, wurde nur die Überschrift orange markiert.



BAG Diagnostics GmbH  
Amtsgerichtsstr. 1-5  
35423 Lich/Germany  
A BAG Group company

T. +49 (0) 6404/925-100  
F. +49 (0) 6404/925-460  
M. [Info@bag-diagnostics.com](mailto:Info@bag-diagnostics.com)  
W. [www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com)

Ordering:  
T. +49 (0) 6404 / 925 - 450  
F. +49 (0) 6404 / 925 - 460  
M. [order@bag-diagnostics.com](mailto:order@bag-diagnostics.com)

Customer Service:  
T. +49 (0) 6404 / 925 - 125  
F. +49 (0) 6404 / 925 - 421  
M. [service@bag-diagnostics.com](mailto:service@bag-diagnostics.com)

## INHALT

1.	ZWECKBESTIMMUNG.....	2
2.	PRODUKTBESCHREIBUNG.....	2
3.	TESTPRINZIP.....	2
4.	MATERIAL.....	2
4.1	Inhalt des FastQ® B*27 Kits.....	2
4.2	Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte.....	3
4.3	Validierte Cycler und Reaktionsgefäße.....	3
4.4	Empfehlungen für nicht validierte Cycler und Reaktionsgefäße.....	4
5.	LAGERUNG UND HALTBARKEIT.....	4
6.	TESTDURCHFÜHRUNG.....	4
6.1	Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise.....	4
6.2	DNA Isolation.....	5
6.3	Amplifikation.....	5
6.4	Setup der RT-PCR Cycler.....	6
6.4.1	CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System.....	7
6.4.2	LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System.....	8
6.4.3	QuantStudio™ 6 Flex System.....	9
7.	AUSWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	10
7.1	Auswertung mit der PlexTyper® Software.....	10
7.1.1	Export der Ergebnisse vom Cycler.....	11
7.1.1.1	CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System.....	11
7.1.1.2	LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System.....	11
7.1.1.3	QuantStudio™ 6 Flex System.....	12
7.1.2	Auswertung und Interpretation.....	12
7.1.2.1	Ergebnis-Histogramm.....	13
7.1.2.2	Werkzeuge zur Interpretation.....	15
7.1.2.3	Eine Zuordnung für eine Reaktion ändern.....	16
7.1.3	Darstellung der Ergebnisse.....	17
7.2	Manuelle Interpretation der Ergebnisse.....	18
7.3	Spezifität des Kits.....	20
8.	WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE.....	20
9.	LEISTUNGSMERKMALE.....	21
10.	GRENZEN DER METHODE.....	21
11.	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE.....	22
12.	PROBLEMBEHANDLUNG.....	22
13.	VERWENDETE MARKENNAMEN.....	23
14.	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN.....	23
15.	LITERATUR.....	24

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Die Zweckbestimmung des FastQ® B\*27 Kits ist die Bestimmung des Vorhandenseins des HLA-B\*27 Allels, das mit verschiedenen Formen der Axialen Spondyloarthritis assoziiert ist.

## 2. PRODUKTBESCHREIBUNG

Der **FastQ® B\*27** Kit wird zum molekulargenetischen Nachweis von HLA-B\*27 Allelen eingesetzt. Das HLA-B27 Protein ist eine Variante des Humanen Leukozyten Antigens-B (HLA-B). Das HLA-B27 Protein 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 (Brewerton et al. 1973, Schlosstien et al. 1973). Ein positiver HLA-B\*27 Befund ist mit einem sehr hohen Krankheitsrisiko verbunden. 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 differenziert, die beide nicht mit dem Auftreten der Spondylitis ankylosans assoziiert sind (Khan et al. 2007).

## 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 (enthält den Gefahrstoff 2-Methylisothiazol-3(2H)-on in einer Konzentration von < 0,05%, siehe Kapitel 7 und 13)
- Elektronische Gebrauchsinformation / Kit File, erhältlich vom Download-Server [www.service.bag-diagnostics.com](http://www.service.bag-diagnostics.com), weitere Informationen siehe Beileger im Kit

## 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 (REF 728259 RT CC Universal LC480 wird von BAG Diagnostics zur Verfügung gestellt)

## 4.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	RT-PCR Reaktionsgefäße	RT-PCR Verschlusssysteme
CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System, Fa. Bio-Rad	FrameStar® Breakable Vertically PCR Plate, Low Profile Product No. 4ti-1201  Removable 8 Well PCR Tube Strip, Product No. 4ti-0753  Fa. Azenta Life Sciences	Strip of 8 Flat Optical Caps Crystal Clear, Product No. 4ti-0755  qPCR Adhesive Seal Product No. 4ti-0560  Fa. Azenta Life Sciences
LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System, Fa. Roche Molecular Systems Inc.	Light Cycler® Multiwell Plate 96, white Product No. 04729692001 Fa. Roche Molecular Systems Inc.	qPCR Adhesive Seal Product No. 4ti-0560  Fa. Azenta Life Sciences
QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System, Fa. Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific	Removable 8 Well PCR Tube Strip, Product No. 4ti-0753 Fa. Azenta Life Sciences  Saphire PCR Microplate, 96 Well, semi skirted, ABI design Product No. 652260 Fa. Greiner BIO-ONE®	Strip of 8 Flat Optical Caps Crystal Clear, Product No. 4ti-0755  qPCR Adhesive Seal Product No. 4ti-0560  Fa. Azenta Life Sciences

**Hinweis:** Bei Verwendung von anderen Real-Time-Thermocyclern, Reaktionsgefäßen und Verschlusssystemen 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 Verschlusssystem
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.

Sollte die Schutzverpackung beschädigt sein, wenden Sie sich bitte an den Kundenservice.

Das pipettierte Reaktionsgemisch kann vor oder nach Zugabe der DNA-Probe bis zu 20 Stunden vor dem Start des PCR-Laufs lichtgeschützt bei  $2...8^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 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. Die Blutproben sollten maximal 9 Tage bei Raumtemperatur und anschließend 3 Tage bei 2...8 °C gelagert 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:

- $OD_{260} / OD_{280} = > 1,5 \text{ und } < 2,0$   
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 Amplifikation

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

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

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.

Für die **Negativkontrolle (NTC)** eine PCR Reaktion mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA ansetzen.

### Empfohlene Ausnahmen

#### Rotor-Gene Q Cycler

Bei Verwendung des Rotor-Gene Q Cyclers muss ein höheres Reaktionsvolumen verwendet werden. Das Reaktionsvolumen beim Cycler muss auf 20 µl eingestellt werden.

Es gibt drei mögliche Ansatzvarianten:

- a) Verdoppelung der oben angegebenen Volumina mit einem Endvolumen von 20 µl.
- b) Zugabe von weiteren 5 µl Aqua dest. (d.h. insgesamt 15 µl).
- c) Überschichten des Reaktionsansatzes mit 5 µl Mineralöl (d.h. insgesamt 15 µl).

#### Lightcycler 2.0

Bei der Verwendung des Roche LC 2.0 Cyclers ist für die Erkennung der Reaktionsgefäße (Kapillaren) ein Referenzfarbstoff (ROX) erforderlich.

Dabei muss die Endkonzentration 120 nM im RT-PCR-Ansatz (10 µl) betragen. Es wird empfohlen, das Teilvolumen an Aqua dest. (5 µl) durch eine entsprechende ROX-Vorverdünnung (240 nM) zu ersetzen.

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.

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.

## 6.4 Setup der RT-PCR Cycler

Die folgenden Fluorophore werden im **FastQ® B\*27** Kit verwendet:

Fluorophor	Wellenlänge in nm	
	Excitation	Emission
FAM	495	520
CAL Fluor® Orange 560	538	559
CAL Fluor® Red 610	590	610

### 6.4.1 CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System

**Hinweis:** Die Namen der Farben dürfen in der CFX Software nicht geändert werden. Die PlexTyper® Software benötigt die Standardnamen für die Auswertung und den korrekten Import.

Channel	Fluorophore	Selected
1	FAM	<input checked="" type="checkbox"/>
	SYBR	<input type="checkbox"/>
2	HEX	<input checked="" type="checkbox"/>
	TET	<input type="checkbox"/>
	Cal Orange 560	<input type="checkbox"/>
	Cal Gold 540	<input type="checkbox"/>
	VIC	<input type="checkbox"/>
3	ROX	<input type="checkbox"/>
	Texas Red	<input checked="" type="checkbox"/>
	Cal Red 610	<input type="checkbox"/>
4	Tex 615	<input type="checkbox"/>
	Cy5	<input checked="" type="checkbox"/>
	Quasar 670	<input type="checkbox"/>
5	Quasar 705	<input checked="" type="checkbox"/>
	Cy5-5	<input type="checkbox"/>

#### PCR-Programm

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	

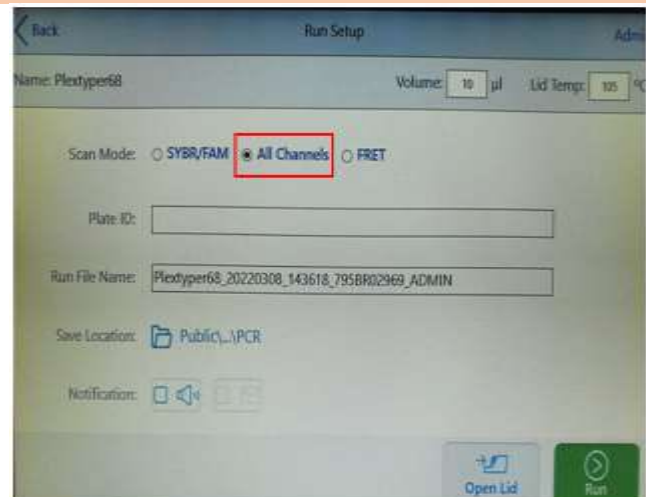
\* die Standard-Ramp rate für das CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System verwenden.

**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.

CFX96 Touch™



CFX Opus 96





### 6.4.2 LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

Bitte beachten Sie, dass die Lichtquelle für diesen Cycler geändert wurde. Ab Seriennummer 29001 ist es eine LED-Lampe, vorher war es eine Xenon-Lampe. Der Test wurde auf einem Gerät mit einer LED-Lampe validiert. Es wird erwartet, dass die älteren Versionen ebenfalls mit dem Test kompatibel sind, aber es ist wahrscheinlich, dass eine Farbkompensation notwendig ist. Bitte kontaktieren Sie BAG Diagnostics, wenn Sie ein Gerät mit einer Xenon-Lampe haben und Ihre Ergebnisse suboptimal sind.

#### PCR-Programm

Erstellen und speichern Sie gemäß der Bedienungsanleitung des LightCycler® 480 II ein PCR-Protokoll mit den folgenden Parametern:

Detection Format: FastQ® B\*27, Block size 96, Reaction volume 10 µl

Step	Cycles	Analysis Mode	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp rate (°C/s)
Hold	1	None	96	None	00:02:00	2.5
Cycle	13	None	98	None	00:00:05	2.5
			68	None	00:00:25	2.2
Cycle	37	Quantification	98	None	00:00:05	2.5
			68	Single	00:00:25	2.2

#### Kanäle für das LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

Verwenden Sie die folgende Kanaleinstellung im **Detection Format**:

Excitation	Emission					
	488	510	580	610	640	660
440						
465		✓				
498						
533			✓	✓		
618						

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

Es wird dringend empfohlen, die gerätespezifische Farbkompensation mit dem RT-CC Universal LC480 Kit (REF 728259) durchzuführen und in PlexTyper® zur Korrektur der Koeffizienten zu verwenden. Bei Fragen diesbezüglich wenden Sie sich bitte an den Kundenservice der BAG Diagnostics unter [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com) oder +49 6404 925125.

Bitte beachten Sie die Geräteeinstellungen für den Plattentyp: White Plates / Clear Plates

### 6.4.3 QuantStudio™ 6 Flex System

Experiment-Eigenschaften:

Instrument type:	QuantStudio™ 6 Flex System
Block type:	96-Well (0.2 mL) oder Fast 96-Well (0.1 mL)
Experiment type:	Comparative Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )
Reagent type:	TaqMan® Reagents
Run properties:	Standard

Targets definieren:

Target Name	Reporter	Quencher	Color
FAM	FAM	NFQ-MGB	Green
ORANGE560	VIC	NFQ-MGB	Orange
RED610	ROX	NFQ-MGB	Red

Passive Referenz: None  
 Zuweisung: Assign all targets to each well.  
 Reaktionsvolumen: 10 µl  
 Run Method:

Stage	Cycles	Data Collection	Target (°C)	Hold (mm:ss)	Ramp rate (°C/s)
Hold Stage	1	Off	96	00:02:00	2.5
PCR Stage	13	Off	98	00:00:05	2.5
			68	00:00:25	2.2
PCR Stage	37	Off	98	00:00:05	2.5
		On	68	00:00:25	2.2

## 7 AUSWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

### 7.1 Auswertung mit der PlexTyper® Software

Die Auswertung und Interpretation der Testergebnisse kann bei der Benutzung der validierten und nachfolgend aufgeführten RT-Cycler mit der PlexTyper® Software durchgeführt werden. Bitte beachten Sie dazu auch die Gebrauchsinformation für die PlexTyper® Software.

- CFX96 Touch™ und CFXOpus 96 Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad
- LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc.
- QuantStudio™ 6 Flex System, Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific

Das Erstellen von Tests und Arbeitslisten in PlexTyper® wird in der Gebrauchsinformation für die PlexTyper® Software ausführlich beschrieben.

Bei der Verwendung von anderen RT-Cyclersystemen muss eine manuelle Auswertung und Interpretation, wie unter Abschnitt 7.2 beschrieben, erfolgen.

Für die softwarebasierte Auswertung und Interpretation der Daten ist die PlexTyper® Software (kostenlos bei BAG Diagnostics erhältlich) in Verbindung mit den PlexTyper® spezifischen Kit Files erforderlich. Die zur Auswertung benötigten Kit Files stehen zum Herunterladen auf dem Download Server ([www.service.bag-diagnostics.com](http://www.service.bag-diagnostics.com)) zur Verfügung.

Produkt und Lotnummer des benutzten Kits notieren. Die Kit Files sind produkt- und lotspezifisch und auch spezifisch für den verwendeten RT-PCR-Cycler. Der Gebrauch von falschen Kit Files (falsches Kit, falsche Lot, falscher Cycler) kann zur inkorrekten Genotypisierung führen.

Zur Auswertung der Ergebnisse müssen die Daten vom Thermocycler auf einen Computer mit der PlexTyper® Software übertragen werden (z. B. mit einem passenden USB Stick). Bitte zur Auswertung der Daten die PlexTyper® Gebrauchsinformation beachten.

Es ist möglich, aber nicht notwendig, die Daten generell in der Thermocycler Software zu überprüfen. Zum Beispiel müssen valide Testansätze ausreichende Fluoreszenzsignale im FAM-Kanal der internen Kontrolle aufweisen. Positive Reaktionen zeigen ein positives Farbsignal im korrespondierenden Farbkanal.

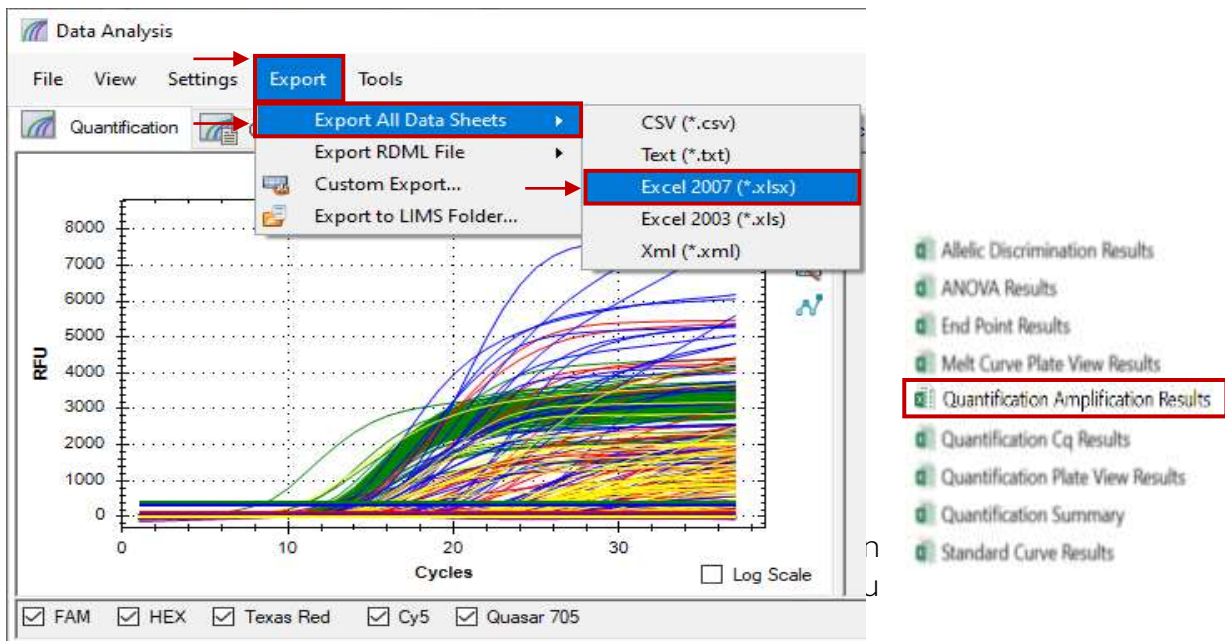
Eine Negativkontrolle (NTC) dient als Kontaminationskontrolle. Wenn DNA oder kontaminierende Amplifikate unbeabsichtigt in die NTC Reaktion hinzugefügt werden, führt dies zu einem positiven Signal. Liegt der Cq unter 36 deutet dies auf eine mögliche Kontamination hin. Amplifikationssignale mit einem höheren Cq als 36 in der NTC können als PCR Artefakte angesehen werden. Wird eine PCR Kontamination vermutet, wird empfohlen den PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Die von der cycler-spezifischen Software ermittelten Rohdaten werden in die PlexTyper® Software importiert. Hierfür muss vorab ein Export der cycler-spezifischen Rohdaten, wie unter Abschnitt 7.1.1 beschrieben, erfolgen. Die PlexTyper® Software ermittelt anhand der Cq Werte, RFUs (Relative Fluorescence Units) und dem Kurvenverlauf die positiven und negativen Reaktionen, aus denen die molekulargenetischen HLA B\*27-Merkmale der eingesetzten Proben bestimmt werden.

## 7.1.1 Export der Ergebnisse vom Cycler

### 7.1.1.1 CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System

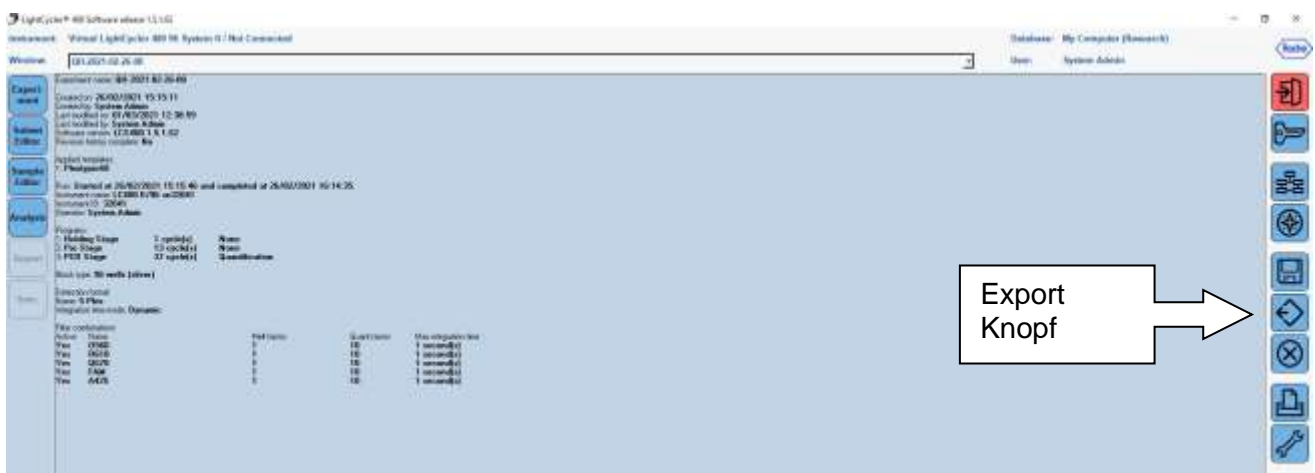
Öffnen Sie die Daten mit der CFX-Software und exportieren Sie dann die Excel 2007-Datei (.xlsx).



Hinweis: Es wird nur die Datei "Quantification Amplification Results" benötigt. Es ist sinnvoll, die anderen Dateien zu löschen.

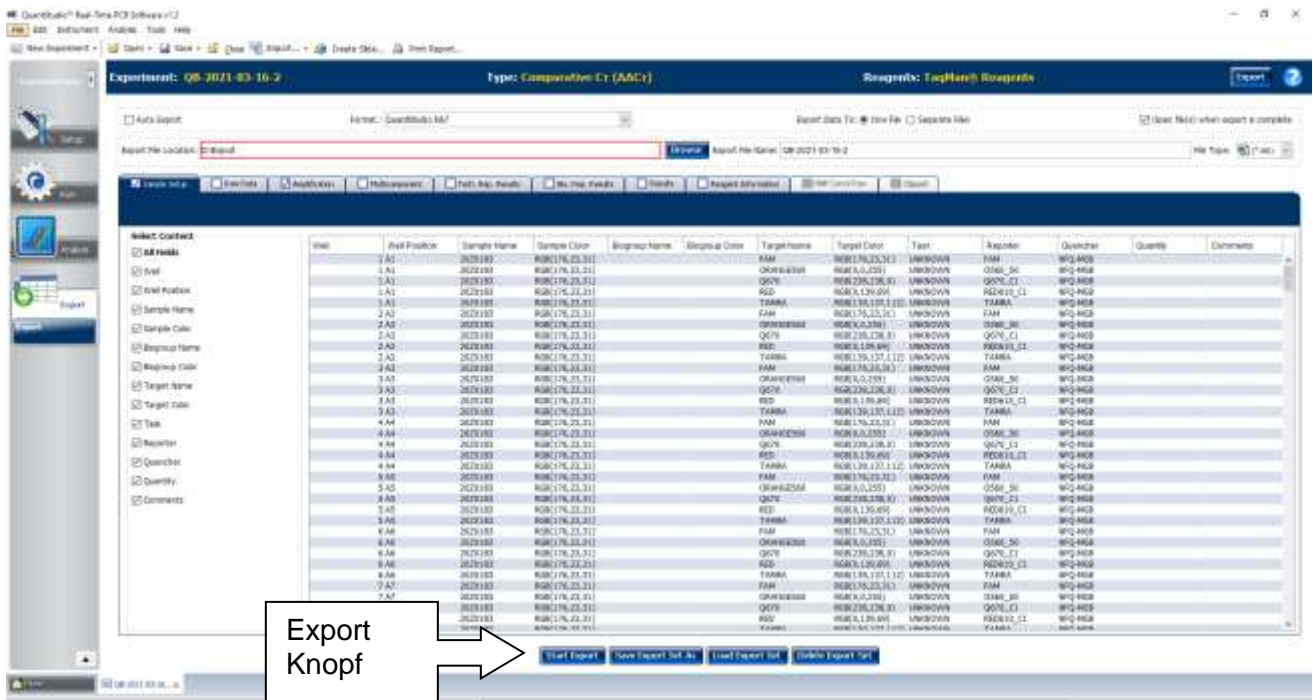
### 7.1.1.2 LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

PlexType® verwendet xml-Dateien von dem LightCycler® 480 II. Nach Abschluss des Laufs ist keine Analyse in der Roche-Software erforderlich. Exportieren Sie die Rohdaten in XML-Format.



### 7.1.1.3 QuantStudio™ 6 Flex System

Öffnen Sie das Export-Menü und starten Sie den Export des "Sample Setup" und der Registerkarte "Amplification" als (\*.xls)-Datei.



### 7.1.2 Auswertung und Interpretation

Die PlexTyper® Software erhält Rohdaten aus den Amplifikationsdateien von den unterstützten Real-Time-Geräten und berechnet daraus die Daten für den Cq-Wert. Außerdem wird die Qualität der Amplifikation analysiert und darauf basierend werden automatisch positive und negative Reaktionen zugeordnet.

Die PlexTyper® Kit Files enthalten die Schwellenwerte für die Reaktionen und die HLA-B\*27 Spezifitäten für jede Reaktion in jedem Farbkanal. Die möglichen HLA-B\*27 Genotypen werden aus dem Muster positiver und negativer Reaktionen berechnet. Die möglichen Genotypen werden dem Anwender angezeigt und der Anwender kann den Genotyp akzeptieren oder editieren.

Die HLA-B\*27 Genotypen können gefiltert dargestellt werden, so dass nur die häufigen (Common) oder die häufigen und gut dokumentierten Allele (Common and Well Documented = CWD) angezeigt werden. Alternativ können alle Allele der im Kit File verwendeten IMGT Datenbank dargestellt werden. Die empfohlene Standardeinstellung ist das CWD Format.



Häufige Allele (Common) sind in grün dargestellt, gut dokumentierten Allele (Well Documented) in blau und seltene (nur mit der All Option) in grau. Die CWD Liste basiert auf dem CWD 2.0.0 Katalog (Mack et al. 2013), aber einige Einträge wurden aufgrund neuerer Sequenzdaten geändert (siehe CWD 2.1.0 Liste im Download Bereich der BAG

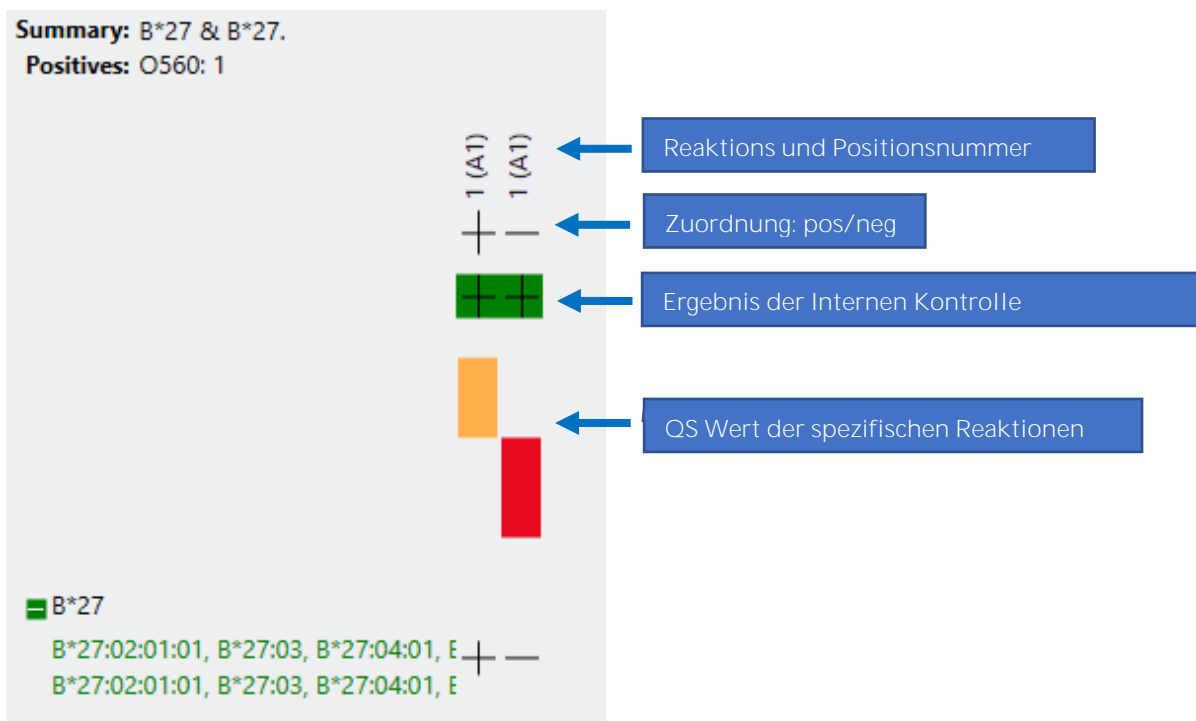
Diagnostics Website: [Downloads zu unseren BAG In-vitro Technologien und Produkten \(bag-diagnostics.com\)](https://www.bag-diagnostics.com). Der Common Filter reduziert die angezeigten Allele auf die häufigen Allele. Wenn All ausgewählt wird, werden alle Allele inklusive der seltenen (dargestellt in grau) angezeigt.

### 7.1.2.1 Ergebnis-Histogramm

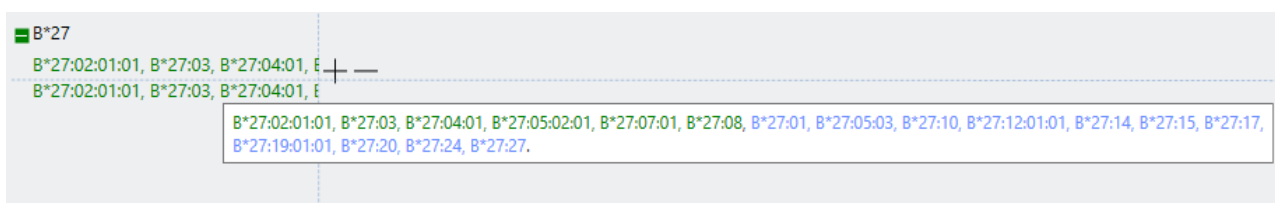
Das Ergebnis-Histogramm zeigt alle Reaktionen für einen Test. Die Farbe der Balken zeigt den Farbkanal an, in dem die Reaktion detektiert wird. Positive Reaktionen sind nach oben, negative nach unten gerichtet. Je höher der Balken, desto eindeutig positiver oder negativer wird eine Reaktion bewertet. Eine detaillierte Beschreibung der QS-Werte finden Sie in der Gebrauchsanweisung der PlexTyper®-Software. Das grüne Feld über dem Histogramm repräsentiert die interne Amplifikationskontrolle. Wenn diese ausfällt, wird das Feld weiß und enthält ein "-". Die   Schaltflächen in der rechten oberen Ecke können zum Vergrößern oder Verkleinern des Histogramms verwendet werden.

Grundsätzlich gibt es beim FastQ® B\*27 Kit nur drei Ergebnisoptionen: B\*27 positiv, B\*27:06/09 positiv (nicht assoziiert) oder B\*27 negativ:

B\*27 positiv:



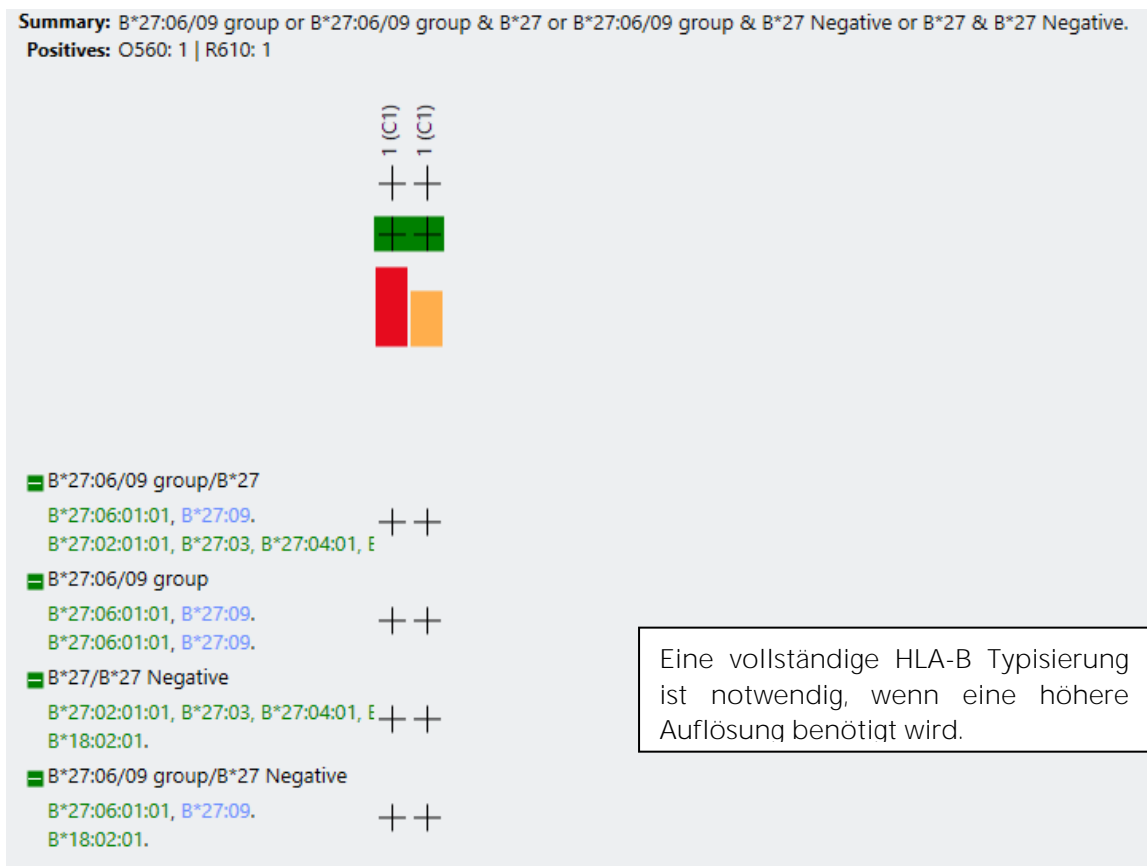
In der Standardeinstellung sind die Ergebnisse im Histogramm als B\*27 positive oder B\*27 negative zusammengefasst. Bei positiven Ergebnissen erweitert der  Knopf die Ergebnisse und zeigt die Allelkombinationen mit den jeweiligen Reaktionsmustern. Durch Bewegen der Maus über die Allelkombination wird eine vollständige Liste der Allele angezeigt, die sehr lang sein kann wenn der All Filter ausgewählt ist.



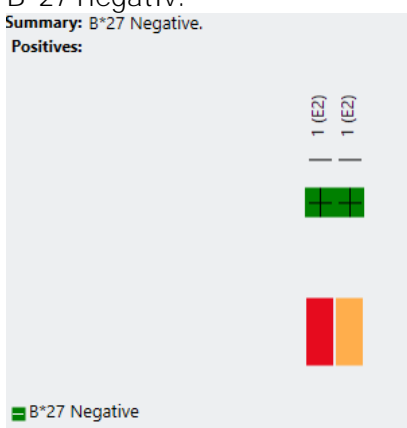
Über dem Histogramm befindet sich eine Zusammenfassung („Summary“) des Ergebnisses: B\*27 & B\*27 oder B\*27 negative und eine Nennung der positiven Reaktion („Positives“). Die Darstellung als B\*27 Positive & B\*27 Positive kommt aus der Auswertung kompletter HLA Typisierungen in der gleichen Software und ist nicht ganz korrekt, da es sich um ein homozygoten oder ein heterozygoten Ergebnis für B\*27 handeln kann. Mit der Concatenate alleles Funktion (nicht aktiviert) können Allele zusammengefasst werden. Diese Funktion kann hilfreich sein, wenn die All Option inklusive seltener Allele gewählt wurde.

B\*27:06/09 positiv:

Wenn beide Reaktionen positiv sind, liegt sehr wahrscheinlich eines der beiden nicht assoziierten Allele B\*27:06 oder B\*27:09 vor. Auf CWD Ebene gibt es vier verschiedenen mögliche Kombinationen:



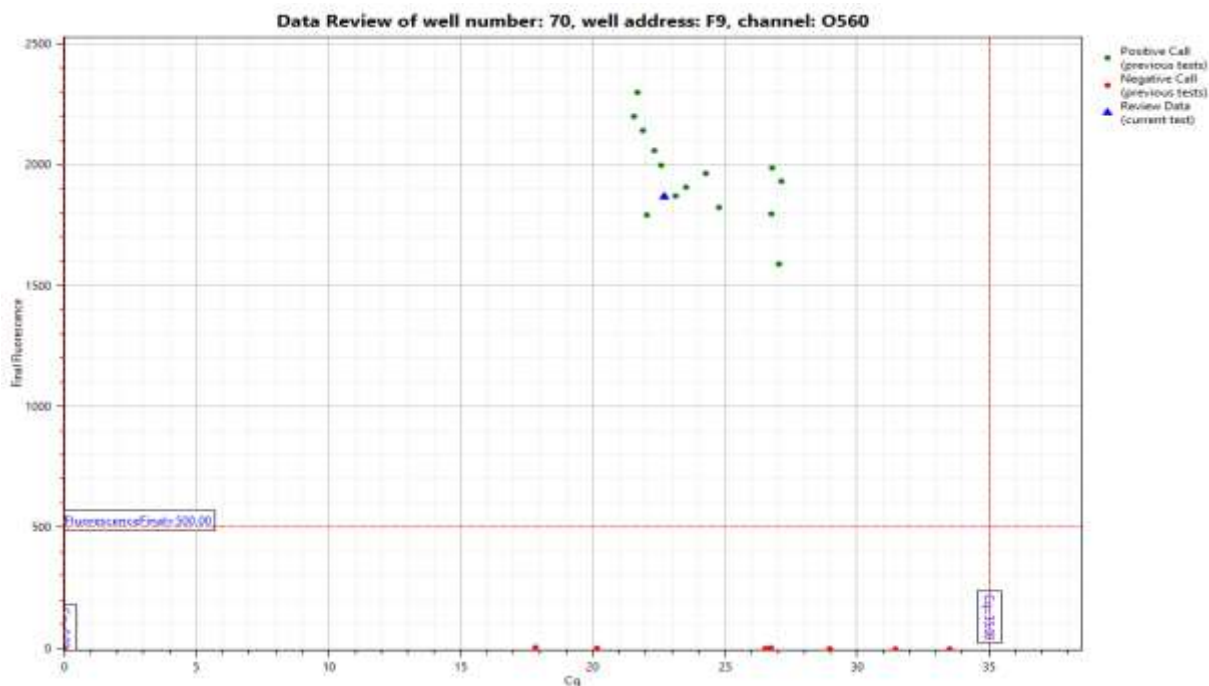
B\*27 negativ:



### 7.1.2.2 Werkzeuge zur Interpretation

In PlexTyper® stehen einige Werkzeuge zur Verfügung, die nützlich sein können, wenn die automatische Interpretation kein Ergebnis findet oder ein seltenes Ergebnis vorliegt, das überprüft werden sollte. Die meisten dieser Werkzeuge sind für eine komplette HLA Typisierung gedacht und für die Auswertung des FastQ® B\*27 Kits nicht sinnvoll. Eine genaue Beschreibung finden Sie in der Gebrauchsinformation für die PlexTyper® Software. Generell sollten Reaktionen mit einer schlechten Qualitätskennzahl (zwischen +3 und -3) überprüft werden.

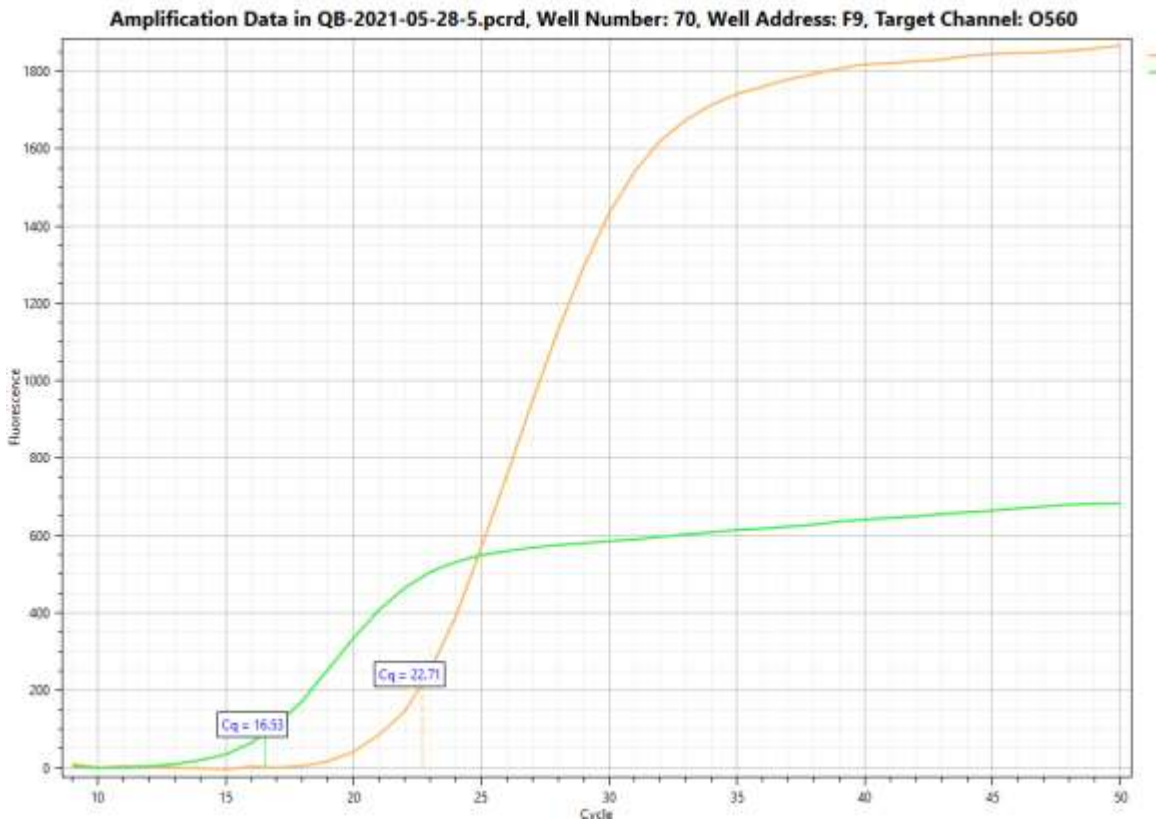
Durch Doppelklicken auf Balken für den QS-Wert öffnet sich ein Diagramm, in dem der Cq-Wert und die finale Fluoreszenz der Reaktion im Kontext weiterer Reaktionen mit der gleichen Kit-Lot dargestellt werden:



Die roten Linien geben die Schwellenwerte für positive Reaktionen an. Das blaue Dreieck repräsentiert den aktuell ausgewählten Test. Doppelklicken auf das blaue Dreieck öffnet ein Fenster mit den Amplifikationskurven für die interne Amplifikationskontrolle (grün) und die B\*27 spezifische Reaktion (orange):

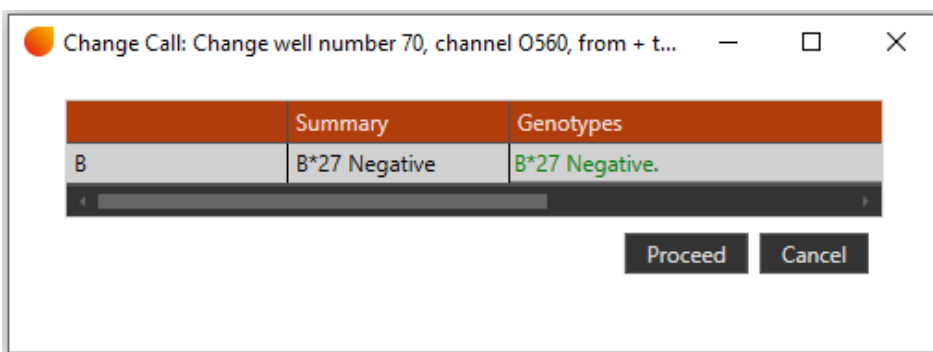
Im Falle eines schlechten QS Werts sollte geprüft werden, ob die Reaktion sich nahe an einem der Schwellenwerte befindet und ob die Amplifikationskurve eine sigmoidale Form hat.



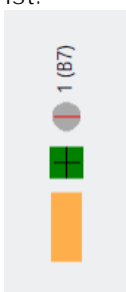


### 7.1.2.3 Eine Zuordnung für eine Reaktion ändern

Sollte die Software eine Reaktion mit einem schlechten QS-Wert falsch bewertet haben, so kann diese Bewertung manuell geändert werden. Alle Änderungen durch den Anwender werden protokolliert und im Audit Trail im Ergebnisbericht angezeigt. Mit einem rechten Mausklick auf den entsprechenden Balken im Histogramm kann eine Vorschau auf die Auswirkungen einer Änderung der Reaktion geöffnet werden (Preview effect of change from + to - oder in die andere Richtung). Dann entweder Proceed auswählen, um das Ergebnis zu ändern, oder Cancel um die Änderung zu verwerfen.

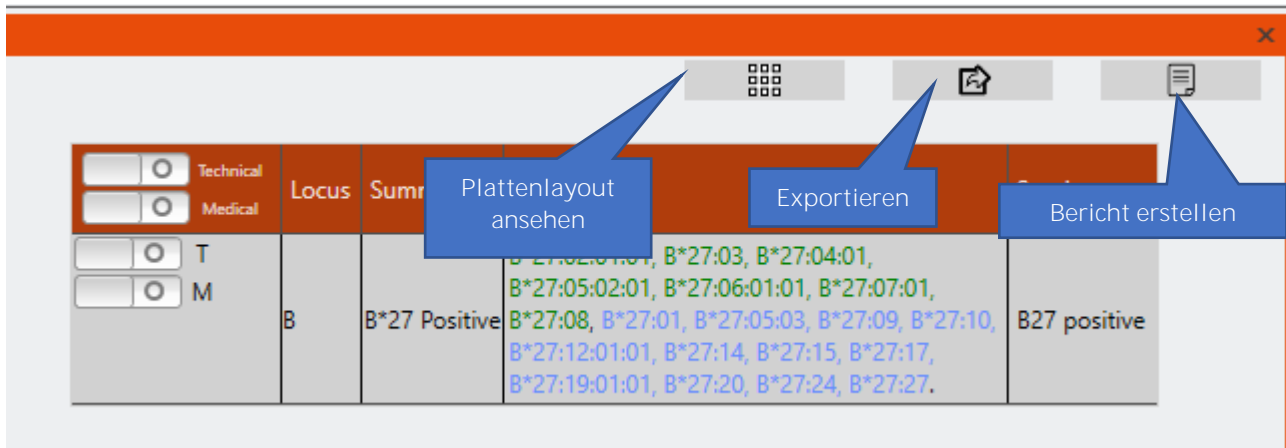


Eine geänderte Reaktion wird im Histogramm rot dargestellt wie in der Abbildung zu sehen ist.



### 7.1.3 Darstellung der Ergebnisse

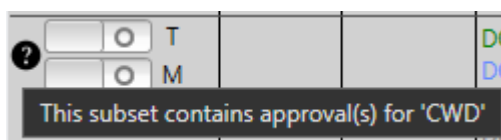
Auf der rechten Seite des Bildschirms werden die Ergebnisse in einer Tabelle angezeigt, die folgende Angaben enthält: Ergebniszusammenfassung, Genotyp als komplette Liste möglicher Allele (spiegelt den gewählten Filter wider), angenommener Phänotyp (serologische Äquivalent) und den Status der Bestätigung (Approval). Aus dieser Tabelle können die Ergebnisse mit dem Exportieren Knopf in eine Textdatei exportiert werden und es kann mit dem Bericht erstellen Knopf ein PDF-Bericht erstellt werden. Der View Plate Knopf zeigt das Plattenlayout als Bild an, das ins Clipboard kopiert werden kann.



Im Feld Reaktions-Kommentare Reaction Comments werden von der Software generierte Kommentare bezüglich der Effizienz des Tests angezeigt. In einem weiteren Feld unten im Fenster können Kommentare vom Anwender eingetragen werden (User annotation of result).

Ein zweistufiger Freigabeprozess ist in der Software implementiert. Die Technische Freigabe (Technical approval -T) kann entweder von einem Anwender mit der Rolle Technician oder Supervisor durchgeführt werden. Dafür wird der Knopf in der ersten Spalte gedrückt und dieser wird dann grün. In einem zweiten Schritt erfolgt die Medizinische Freigabe (Medical approval -M) ausschließlich durch einen Supervisor. Die Freigabe kann für alle Genorte zusammen in der Kopfzeile erfolgen oder einzeln in den jeweiligen Zeilen mit den Genorten.

Wenn ein Genort freigegeben wurde (entweder technisch oder medizinisch) und für dieses Ergebnis wird eine Reaktionsbewertung nachträglich verändert, so werden die Freigaben alle entfernt (zunächst wird eine Warnung angezeigt). Wenn der CWD Filter geändert wird, werden die Freigaben mit dem ursprünglich gewählten Filter beibehalten (ein "?" Symbol erscheint neben dem Genort, das anzeigt, dass eine Freigabe mit einem anderen Filter vorliegt). Wenn der Anwender versucht, diesen Genort mit einem anderen Filter freizugeben, werden die ursprünglichen Freigaben entfernt. Freigaben mit verschiedene Filtern für das gleiche Ergebnis sind nicht möglich, d.h. ein Ergebnis kann nur mit einem Filter freigegeben werden oder gar nicht.



Wenn beide Reaktionen positiv sind, wird im Ergebnisfenster eine Ambiguität auf CWD Ebene angezeigt (CWD ambiguity):

<input type="checkbox"/> Technical <input type="checkbox"/> Medical		Locus	Summary	Genotype	Serology
<input type="checkbox"/> T	<input type="checkbox"/> M	B	-	<b>CWD Ambiguity</b>	-

Anklicken des CWD Ambiguity Knopfs öffnet ein Fenster mit den verschiedenen Optionen. Es ist möglich, sich für eine der Optionen zu entscheiden, aber generell werden zusätzliche Informationen benötigt um dies zu tun.

● View Ambiguity and Select Option(s) - □ ×

	Summary		Genotypes	Serology
B	B*27:06/09 group	●	B*27:06:01:01, B*27:09. B*27:06:01:01, B*27:09.	B27:06/09 positive B27:06/09 positive
	B*27:06/09 group & B*27	●	B*27:06:01:01, B*27:09. B*27:02:01:01, B*27:03, B*27:04:01, B*27:05:02:01, B*27:07:01, B*27:08, B*27:01, B*27:05:03, B*27:10, B*27:12:01:01, B*27:14, B*27:15, B*27:17, B*27:19:01:01, B*27:20, B*27:24, B*27:27.	B27:06/09 positive B27 positive
	B*27:06/09 group & B*27 Negative	●	B*27:06:01:01, B*27:09. B*18:02:01.	B27:06/09 positive Not B27
	B*27 & B*27 Negative	●	B*27:02:01:01, B*27:03, B*27:04:01, B*27:05:02:01, B*27:07:01, B*27:08, B*27:01, B*27:05:03, B*27:10, B*27:12:01:01, B*27:14, B*27:15, B*27:17, B*27:19:01:01, B*27:20, B*27:24, B*27:27. B*18:02:01.	B27 positive Not B27

Change
Cancel

Die nicht selektierten Optionen erscheinen am Ende der Ergebnisberichts unabhängig davon, ob eine Option selektiert wurde oder nicht.

Im Kopf über dem Ergebnis-Histogramm werden Angaben zur Probe, zum verwendeten Kit und zum verwendeten Cycler gemacht. Unter KSI Comments findet sich die Angabe, dass bei einer positiven Reaktion das seltene Allel B\*44:97 nicht ausgeschlossen werden kann und dass einige seltene B\*27 Allele vom Kit nicht erfasst werden. Diese Angaben erscheinen auch im Ergebnisbericht.

Summary		
Name	Person id	
Sample id	79L	Sample Date
Test id	317	Kit Details
User id	Admin	Test Date
KSI Comments	0160+ve also B*44:97. B*27 not amplified = B*27:05:03, 07:18/23/29/15/05/02/118/157/189.	Cycler File
Sample Comments		Instrument id

## 7.2 Manuelle Interpretation der Ergebnisse

Alle Tests mit humaner gDNA müssen ein Fluoreszenzsignal im grünen Kanal (FAM) mit der internen Kontrolle zeigen. HLA B\*27 positive Proben zeigen ein positives Signal im Kanal für CAL Fluor® Orange 560. Der rote Kanal (CAL Fluor® Red 610) zeigt positive Signale bei den unabhängig voneinander detektierten Allelen B\*27:06 und B\*27:09 (siehe Kapitel 7.3 Spezifität des Kits).

Die Amplifikationssignale für **HLA B\*27 negative Proben** sollten außerhalb der definierten Cq-Werte für beide Kanäle liegen. Eine Negativkontrolle mit Aqua dest. sollte während des gesamten RT-PCR-Laufs kein Fluoreszenzsignal zeigen und stellt eine Kontaminationskontrolle dar. Fluoreszenzsignale innerhalb der definierten Cq-Werte bei der Negativkontrolle mit Aqua dest. weisen auf eine Kontamination hin. Fluoreszenzsignale außerhalb der definierten Cq-Werte können aufgrund der sehr empfindlichen Testmethode bei ungenauem Pipettieren auftreten. Tritt dies auf, sollte der Test wiederholt werden.

Außerdem wird eine detaillierte Ursachenanalyse empfohlen. Gegebenenfalls ist der PCR-Arbeitsplatz zu dekontaminieren und die Reagenzien sind auszutauschen.

Die folgenden Signale werden als positiv bewertet:

Spezifität	Fluorophor	Cq Wert	Wellenlänge (nm)
B*27	CAL Fluor® Orange 560 (HEX)	≤ 25	Excitation: 538 / Emission: 559
B*27:06/09 positiv	CAL Fluor® Red 610 (RED)	≤ 20	Excitation: 590 / Emission: 610
Interne Kontrolle	FAM	≤ 20	Excitation: 495 / Emission: 520

Der Cq-Wert definiert die letzte Cq-Zahl, bei der eine positive Reaktion (Fluoreszenz steigt über den Schwellenwert) im jeweiligen Kanal erwartet wird. Der Schwellenwert, der von der Cycloer-Software automatisch eingestellt wird, sollte als Basisschwelle verwendet werden. Es wird empfohlen, die Plausibilität der Reaktionen anhand der Amplifikationskurven zu überprüfen und fragliche Ergebnisse zu wiederholen. Bei Fragen zur Anpassung der Schwelle oder bei grenzwertigen Cq-Werten wenden Sie sich bitte an den technischen Support der BAG Diagnostics (Tel: +49 (0)6404 925125, E-Mail: [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com)).

**Bitte beachten:** Wenn auf dem CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 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.

### 7.3 Spezifität des Kits

Die folgenden Allele werden vom Kit erkannt:

HLA-B Allele	O560	R610
B*27:01, B*27:02:01:02, B*27:02:01:02-B*27:02:06, B*27:03, B*27:04:01, B*27:04:02-B*27:04:06, B*27:05:02:01, B*27:05:02:02-B*27:05:02:32; B*27:05:03, B*27:05:04 - B*27:05:22, B*27:05:24-B*27:05:56, B*27:07:01, B*27:07:02 - B*27:07:06, B*27:08, B*27:10, B*27:11, B*27:12:01:01, B*27:12:01:02 - B*27:13:02; B*27:14, B*27:15, B*27:16, B*27:17, B*27:19:01:01, B*27:19:01:02, B*27:20, B*27:21:01, B*27:21:02; B*27:24, B*27:25, B*27:26, B*27:27, B*27:28, B*27:30 - B*27:40, B*27:42 - B*27:74, B*27:76 - B*27:84, B*27:86 - B*27:90:04, B*27:93 - B*27:105, B*27:108-B*27:135, B*27:137 - B*27:153, B*27:155; B*27:156, B*27:158 - B*27:188, B*27:190, B*27:191; B*27:193 - B*27:207, B*27:209 - B*27:2014, B*27:216 - B*27:221, B*27:223N - B*27:226, B*27:228-B*27:255 / <b>B*44:97</b>	+	
B*27:06:01:01, B*27:06:01:02, B*27:09, B*27:41, B*27:91, B*27:106, B*27:107, B*27:136, B*27:154, B*27:192; B*27:208, B*27:222, B*27:227	+	+
B*15:129, B*15:395 / B*18:02:01, B*18:179 / C*07:05, C*07:538		+

Seltene B\*27 Allele, die nicht erkannt werden:: B\*27:05:23, B\*27:18, B\*27:23, B\*27:29, B\*27:75, B\*27:85, B\*27:92, B\*27:119, B\*27:157, B\*27:189

IMGT Database 3.47.0

Grün = Common, Blau = Well Documented Allel nach CWD 2.1.0 Katalog

## 8. 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.

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 14

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.

## 9. LEISTUNGSMERKMALE

Die Kombination der Primer und Sonden gewährleistet eine eindeutige Bestimmung der in Kapitel 7.3 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 vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen anderer CE zertifizierter Typisierungsreagenzien (u.a. Serologie, SSO, SSP) und/oder Sequenzierung verglichen. Die Interpretation wurde manuell und mit Hilfe des Kit Files in der PlexTyper® Software durchgeführt. Dabei sind keine Diskrepanzen bei der Bestimmung des Merkmals HLA-B27 aufgetreten.

DNA-Proben	Gesamtzahl Interne Studie- CFX	Gesamtzahl Interne Studie- QS6	Gesamtzahl Interne Studie- LC480II	Übereinstimmung in Prozent [%]
B*27 negativ	79	86	86	100
B*27 positiv	8	10	10	100
B*27:06/09 positiv	2	2	2	100
<b>Gesamt</b>	<b>89</b>	<b>98</b>	<b>98</b>	<b>100</b>

Zusammenfassung der Probenanzahl für die internen Leistungsstudien, der Ergebnisse mit Angabe der Übereinstimmung

## 10. GRENZEN DER METHODE

Da das RT-PCR-Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen mit 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. Als Kontaminationskontrolle dient die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. (NTC) bei jedem Testlauf.

In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden ( $C_q > N.A.$ ). **Im Fall einer Signalentwicklung mit der Negativkontrolle** ist der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und gegebenenfalls die Reagenzien auszutauschen.

Die regelmäßige Durchführung von Wischtests (z.B. BAG Wischtest, **REF** 7091) wird empfohlen.

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

## 11. 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 einer Negativkontrolle dient zum Nachweis möglicher Kontaminationen.** Zu diesem Zweck wird eine PCR Reaktion ohne DNA angesetzt (NTC).

## 12. 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 achten.
	Falsche Amplifikationsparameter.	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrata) 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.
Signal in Negativkontrolle	Kontamination der Negativkontrolle mit DNA	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.

### 13. VERWENDETE MARKENNAMEN

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

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

QuantStudio™ ist ein Markenname der Firma Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific.

CFX96 Touch™ ist ein Markenname der Firma Bio-Rad







LightCycler® ist ein registrierter Markenname der Firma Roche Molecular Systems Inc.

FrameStar® ist ein registrierter Markenname der Firma Azenta Life Sciences

QIAamp® ist ein registrierter Markenname der Firma QIAGEN

Chemagic™ ist ein Markenname der Firma PerkinElmer

### 14. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Oberer 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>eIFU</b>	Elektronische 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.
	Achtung (siehe Kapitel 8) H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. <u>Sicherheitshinweise</u> 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.



## 15. 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

Gebrauchsanweisungen in anderen Sprachen siehe: <http://www.bag-diagnostics.com>  
oder kontaktieren Sie uns direkt unter [info@bag-diagnostics.com](mailto:info@bag-diagnostics.com)  
oder Telefon: +49 (0)6404-925-125