

DE

GEBRAUCHSINFORMATION

FastQ[®] CD

Testkit zur Bestimmung von mit Zöliakie assoziierten HLA-DQ Allelen
auf molekulargenetischer Basis

Elektronische Gebrauchsanweisung siehe www.bag-diagnostics.com

CE **IVD**

REF 728202 FastQ[®] CD

Version: 4/2022 / Stand: 2022-04 Änderungen zu Version 3/2021 sind orange markiert.

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



INHALT

1	ZWECKBESTIMMUNG.....	2
2	PRODUKTBESCHREIBUNG.....	2
3	TESTPRINZIP.....	3
4	MATERIAL.....	3
4.1	Inhalt des FastQ® CD Kits (48 Tests).....	3
4.2	Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte.....	3
4.3	Validierte Cyclers 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 des RT-PCR Cyclers.....	6
6.4.1	CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System.....	6
6.4.2	LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System.....	7
6.4.3	QuantStudio™ 6 Flex System.....	8
7	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE MIT DER PlexTyper® SOFTWARE.....	9
7.1	Export der Ergebnisse vom Cycler.....	10
7.1.1	CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System.....	10
7.1.2	LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System.....	10
7.1.3	QuantStudio™ 6 Flex System.....	11
7.2	Evaluation and interpretation.....	11
7.2.1	Ergebnis-Histogramm.....	12
7.2.2	Zöliakie-assoziierte Allel-Gruppen.....	13
7.2.3	Werkzeuge zur Interpretation.....	14
7.2.4	Eine Zuordnung für eine Reaktion ändern.....	15
7.3	Darstellung der Ergebnisse.....	16
7.4	Risikobewertung für Zöliakie.....	17
7.5	Spezifität des Kits.....	18
8	WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE.....	20
9	LEISTUNGSMERKMALE.....	20
10	GENZEN DER METHODE.....	21
11	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE.....	22
12	PROBLEMBEHANDLUNG.....	22
13	VERWENDETE MARKENNAMEN.....	22
14	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN.....	23
15	LITERATUR.....	24

1 ZWECKBESTIMMUNG

Die Zweckbestimmung des FastQ® CD-Kits ist die molekulargenetische Bestimmung des Vorhandenseins der folgenden mit Zöliakie assoziierten HLA-DQ-Allele:

- DQA1*02:01, DQA1*05:01, DQA1*05:05
- DQB1*02:01, DQB1*02:02, DQB1*03:02

2 PRODUKTBESCHREIBUNG

Zöliakie (CD) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Dünndarms, die durch eine fehlgeleitete Immunreaktion auf die in der Nahrung enthaltenen Glutenproteine aus Weizen, Roggen und Gerste verursacht wird. Bei der Diagnose der Zöliakie werden vier Aspekte berücksichtigt: Symptome, Zöliakie-Antikörper im Serum (TG2-IgA), Duodenalhistologie und das Vorhandensein von HLA-DQ2 und/oder DQ8. Die Zöliakie ist eine der Krankheiten mit der stärksten HLA-Assoziation (Sollid, L M et al. 1989, Sollid L M und E Thorsby, 1990). Der diagnostische Wert dieses Parameters beruht auf seinem negativen Vorhersagewert, insbesondere bei Patienten, die trotz histologischer Veränderungen seronegativ sind, oder in Fällen, in denen zum Zeitpunkt der CD-Diagnose keine serologische Bestätigung vorliegt (Husby et al. 2019). Diese starke HLA-Assoziation gilt für definierte Heterodimere der HLA-DQA- und DQB-Antigene. Die stärkste Assoziation (90-95% CD) besteht mit DQ2.5 (DQA1*05:01, DQB1*02:01) und schwächere Assoziationen (5-10% CD) mit DQ8 (DQA1*03, DQB1*03:02) und DQ2.2 (DQA1*02:01, DQB1*02:02) (Sollid und Lie 2005). Bei einer kleinen Gruppe von Patienten, die nicht Träger von DQ2.5, DQ2.2 oder DQ8 sind, haben fast alle DQ7.5 (DQA1*05, DQB1*03:01) (Karell et al. 2003, Bergseng, Elin et al. 2015).

Der Nachweis des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von HLA-DQ2 und/oder DQ8 ist ein wesentlicher Labortest für den Ausschluss von CD, zusätzlich zu den serologischen Differentialdiagnoseverfahren (Anti-TG2 und/oder Anti-EMA). Bei Patienten mit einem negativen Testergebnis kann die Zöliakie mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Der Nachweis von HLA-DQ2 und/oder DQ8 ist Teil des Algorithmus für die Zöliakie-Diagnose (siehe Abbildung 1 unten, Al-Toma et al., 2019).

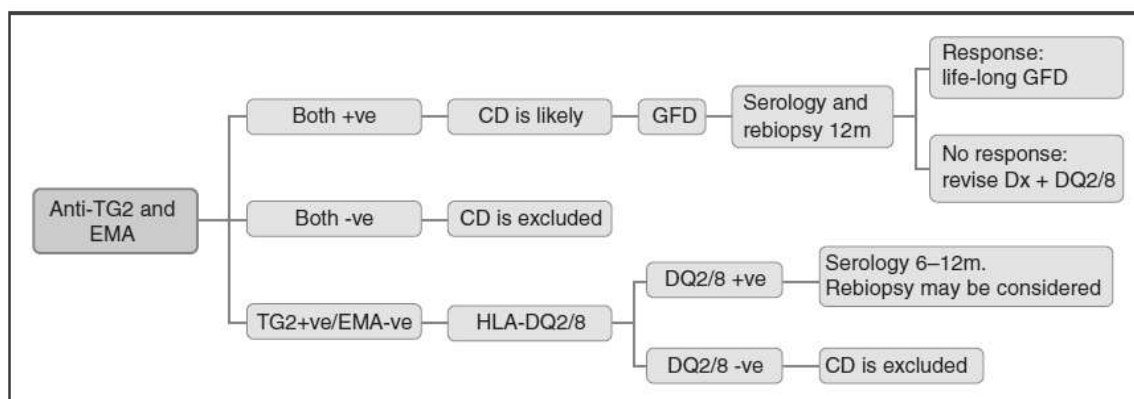


Abbildung 1: Algorithmus für die Diagnose von Zöliakie. Beachten Sie, dass nach der aktuellen Leitlinie die Differentialdiagnose der Zöliakie nur über HLA-DQ2/DQ8 gestellt wird, wenn der serologische Befund unsicher ist. (GFD = glutenfreie Diät) – aus: Al-Toma, Abdulbaqi et al. "European Society for the Study of Coeliac Disease (ESSCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders." United European gastroenterology journal vol. 7,5 (2019): 583-613. doi:10.1177/2050640619844125

3 TESTPRINZIP

Der Test wird mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die DNA wird mit sequenz-spezifischen 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 (enthält den Gefahrstoff 2-Methylisothiazol-3(2H)-on in einer Konzentration von < 0,05%, siehe Kapitel 8 und 14)
- Elektronische Gebrauchsinformation / Kit File, erhältlich vom Download-Server www.service.bag-diagnostics.com, weitere Informationen siehe Beileger im Kit

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 (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 Verschlusssystem
CFX96™ / CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System, Fa. Bio-Rad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate 96 white wells, black frame Product No. 4ti-1201 Fa. Azenta Life Sciences	Crystal Strips Product No. 4ti-0755 Fa. Azenta Life Sciences qPCRSeal (Optically clear adhesive film) Product No. 4ti-0560 Fa. Azenta Life Sciences
LightCycler® 480 II Real- Time PCR Detection System, Roche Molecular Systems Inc.	Roche Multiwell Plate 96, white Product No. 04729692001 Fa. Roche	qPCRSeal (Optically clear adhesive film) Product No. 4ti-0560 Fa. Azenta Life Sciences
QuantStudio™ 6 Flex System, Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific	Removable 8 Well PCR Tube Strip, Product No. 4ti-0753, Fa. Azenta Life Sciences	Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Fa. Azenta 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 ≤ -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.

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

Die Q Primermixe und den Plex Mix direkt vor dem Ansatz der PCR auftauen. Die fertig angesetzten PCR-Platten/-streifen sofort in den Real-Time Thermocycler stellen und den PCR-Lauf starten.

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 diagnostische und/oder 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 (Beutler et al. 1990), 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)

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/µl erforderlich.

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 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	
2 µl	Q Primermix CD I	2 µl	Q Primermix CD II
2 µl	Plex Mix	2 µl	Plex Mix
1 µl	Proben DNA (10-50 ng/µl)	1 µl	Proben DNA (10-50 ng/µl)
5 µl	Aqua dest. (DNase frei)	5 µl	Aqua dest. (DNase frei)

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

Hinweis: Eine vertikal alternierende Plattenbelegung der Probe mit dem Primermix CD I und II ist für die Auswertung mit der PlexTyper® Software obligatorisch.

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.

6.4 Setup des RT-PCR Cyclers

Die folgenden Fluorophore werden im **FastQ® CD** Kit verwendet:

Fluorophor	Wellenlänge in nm	
FAM	Excitation: 494	Emission: 520
CAL Fluor® Orange 560	Excitation: 538	Emission: 559
CAL Fluor® Red 610	Excitation: 590	Emission: 610
Cyanine 5	Excitation: 649	Emission: 670

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

Hinweis: Die Farbnamen dürfen in der CFX Software nicht verändert werden. Die PlexTyper® Software benötigt die Standardbezeichnungen für die Interpretation 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"/>
	Tex 615	<input type="checkbox"/>
4	Cy5	<input checked="" type="checkbox"/>
	Quasar 670	<input type="checkbox"/>
5	Quasar 705	<input checked="" type="checkbox"/>
	Cy5-5	<input type="checkbox"/>

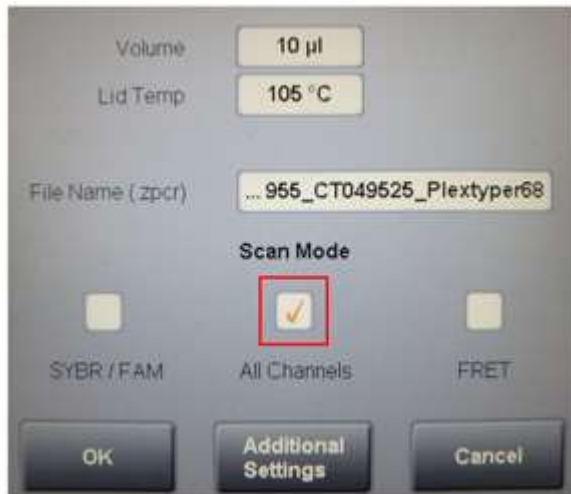
PCR Programm:

Programm-Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Ramp rate [°C/s]	Plate read	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	
Kühlen	120	37	2,2	-	1

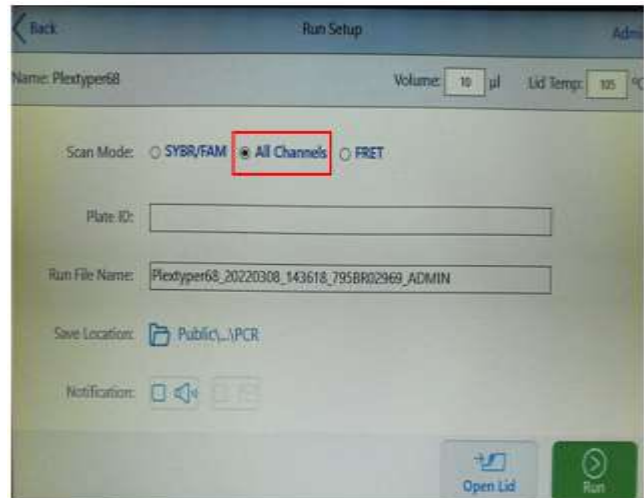
* die Standard- Ramp rate für das CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System verwenden.

Anmerkung: 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 handelt es sich um eine LED-Lampe, vorher war es eine Xenon-Lampe. Der Test wurde an 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 erforderlich sein wird. Bitte wenden Sie sich an BAG Diagnostics, wenn Sie ein Gerät mit einer Xenon-Lampe haben und Ihre Ergebnisse suboptimal sind.

PCR-Programm

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

Detection Format: FastQ® CD, 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
Hold	1	None	37	None	00:02:00	2.2

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

Bitte die folgenden Farbkanal-Einstellungen im **Detection Format** auswählen:

		Emission					
		488	510	580	610	640	660
Excitation	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
618	660	Q670 (Quasar670)	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 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
Cy5	Cy5	NFQ-MGB	Yellow

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 On	98	00:00:05	2.5
			68	00:00:25	2.2
Hold Stage	1	Off	37	00:02:00	2.2

7 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE MIT DER PlexTyper® SOFTWARE

Die Auswertung und Interpretation der Testergebnisse muss mit der PlexTyper® Software unter Verwendung der unten aufgeführten validierten RT-Cycler durchgeführt werden. Bitte beachten Sie auch die Gebrauchsanweisung für die PlexTyper® Software.

- CFX96 Touch™ und CFX Opus 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

Die Erstellung von Tests und Arbeitslisten in PlexTyper® wird in der Gebrauchsanweisung für die PlexTyper® Software ausführlich beschrieben.

Für die softwarebasierte Auswertung und Interpretation der Daten wird die PlexTyper® Software (kostenlos bei BAG Diagnostics erhältlich) in Verbindung mit den PlexTyper® spezifischen Kit-Dateien (Kit Files) benötigt. Die für die Auswertung benötigten Kit-Dateien stehen auf dem Download-Server (www.service.bag-diagnostics.com) zum Herunterladen bereit.

Beachten Sie die Produkt- und Chargennummer des verwendeten Kits. Die Kit-Dateien sind produkt- und chargenspezifisch und auch spezifisch für den verwendeten RT-PCR-Cycler. Die Verwendung falscher Kit-Dateien (falsches Kit, falsche Charge, falscher Cycler) kann zu einer falschen Genotypisierung führen.

Zur Auswertung der Ergebnisse müssen die Daten vom Thermocycler auf einen Computer mit der PlexTyper® Software übertragen werden (z.B. mit einem geeigneten USB-Stick). Bitte beachten Sie für die Datenauswertung die Gebrauchsanweisung von PlexTyper®.

Es ist möglich, aber nicht notwendig, die Daten generell in der Thermocycler-Software zu überprüfen. Gültige Tests müssen z.B. ausreichende Fluoreszenzsignale im FAM-Kanal der internen Kontrolle zeigen. Positive Reaktionen zeigen ein positives Farbsignal in dem entsprechenden 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

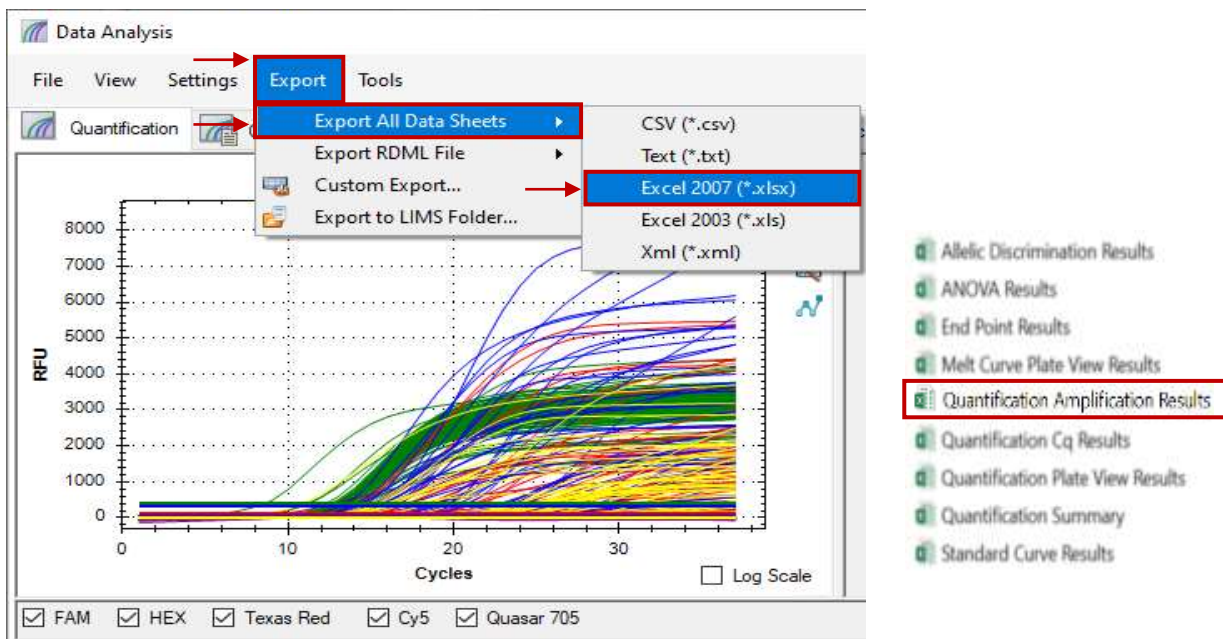
Kontamination hin. Amplifikationssignale mit einem höheren Cq als 36 im NTC gelten als PCR-Artefakte und werden nicht berücksichtigt. Bei Verdacht auf eine PCR-Kontamination wird empfohlen, das PCR-Labor von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Die von der Cyclus-spezifischen Software ermittelten Rohdaten werden in die PlexTyper® Software importiert. Dazu muss vorab ein Export der cyclus-spezifischen Rohdaten durchgeführt werden, wie in Abschnitt 7.1 beschrieben. Die PlexTyper® Software ermittelt anhand der Cq-Werte, RFUs (Relative Fluorescence Units) und der Form der Amplifikationskurve die positiven und negativen Reaktionen, aus denen die molekulargenetischen HLA-DQ-Merkmale der verwendeten Proben bestimmt werden.

7.1 Export der Ergebnisse vom Cyclus

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

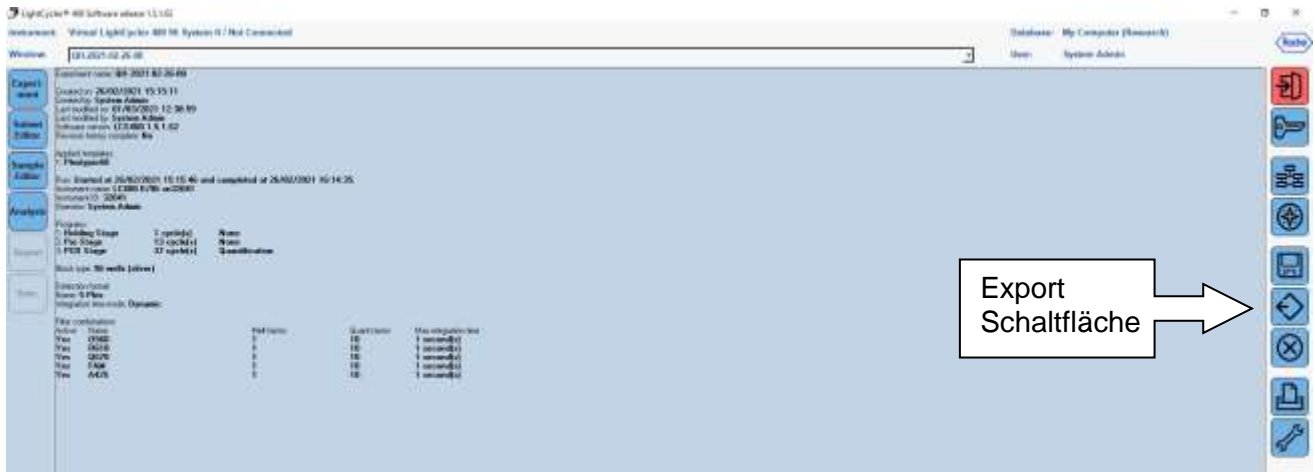
Die Datei mit den Daten mit der CFX Software öffnen und die Excel 2007 Datei (.xlsx) exportieren.



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

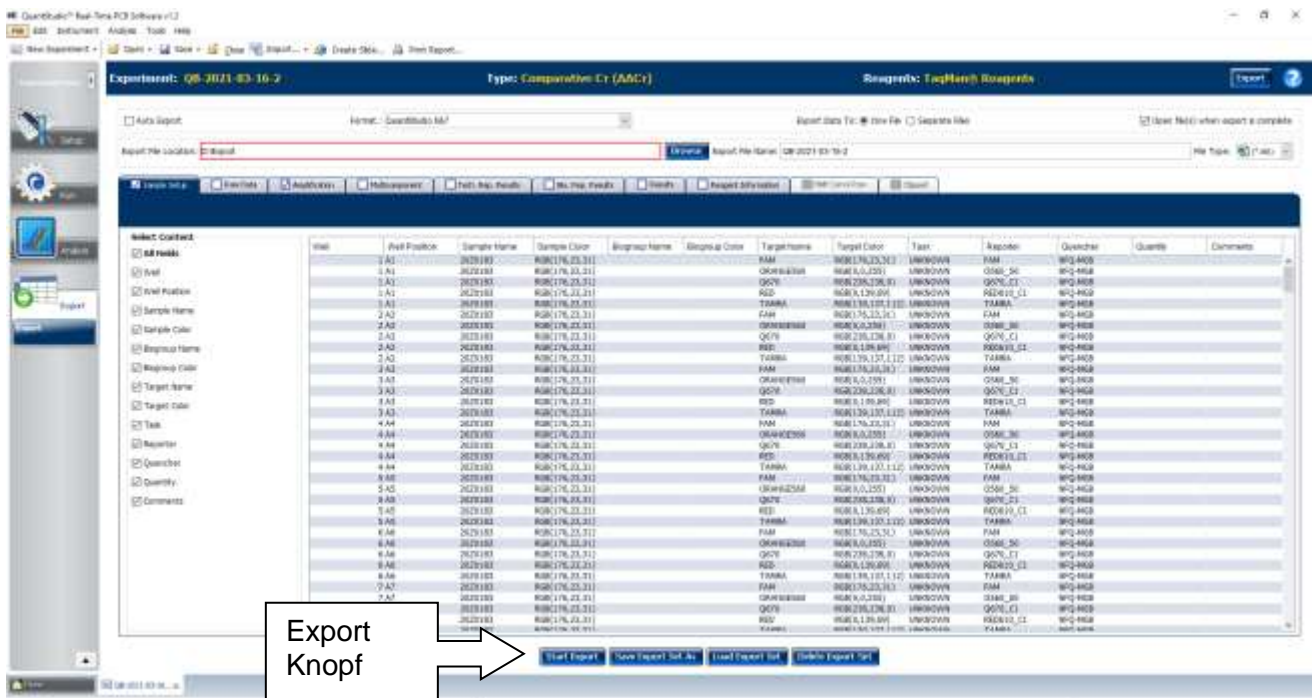
7.1.2 LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

PlexTyper® verwendet xml Dateien vom LightCycler® 480 II. Nach dem Lauf ist keine Analyse in der Roche Software erforderlich. Die Rohdaten im XML Format exportieren:



7.1.3 QuantStudio™ 6 Flex System

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

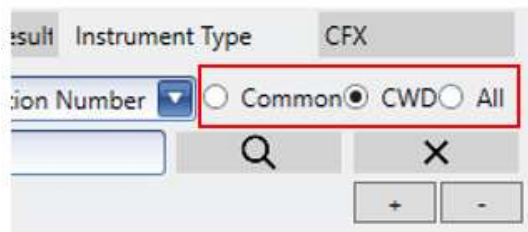


7.2 Evaluation and interpretation

Die PlexTyper® Software empfängt Rohdaten aus den Amplifikationsdateien der unterstützten Real-Time Cyler und berechnet die Daten für den Cq-Wert. Sie analysiert auch die Qualität der Amplifikation und ordnet auf dieser Grundlage automatisch positive und negative Reaktionen zu.


Die PlexTyper® Kit-Dateien enthalten die Schwellenwerte für die Reaktionen und die HLA-DQ-Spezifitäten für jede Reaktion in jedem Farbkanal. Die möglichen HLA-DQ-Genotypen werden aus dem Muster der positiven und negativen Reaktionen berechnet. Die möglichen Genotypen werden dem Benutzer angezeigt, und der Benutzer kann den Genotyp akzeptieren oder bearbeiten.

Die HLA-DQ-Genotypen sind in krankheitsassoziierten Allelstrings gruppiert (siehe unten) und die Allelfilter haben für dieses Kit keine Auswirkungen (häufige und gut dokumentierte Allele =CWD (Mack et al 2013)).





7.2.1 Ergebnis-Histogramm

Das Ergebnis-Histogramm zeigt alle Reaktionen für einen Test an. Die Farbe der Balken zeigt den Farbkanal an, in dem die Reaktion erkannt wurde. Positive Reaktionen sind nach oben, negative nach unten gerichtet. Je höher der Balken, desto deutlicher wird eine Reaktion als positiv oder negativ bewertet. Eine detaillierte Beschreibung der QS-Werte (QS= Quality Score) finden Sie in der Gebrauchsanweisung der PlexTyper®-Software.

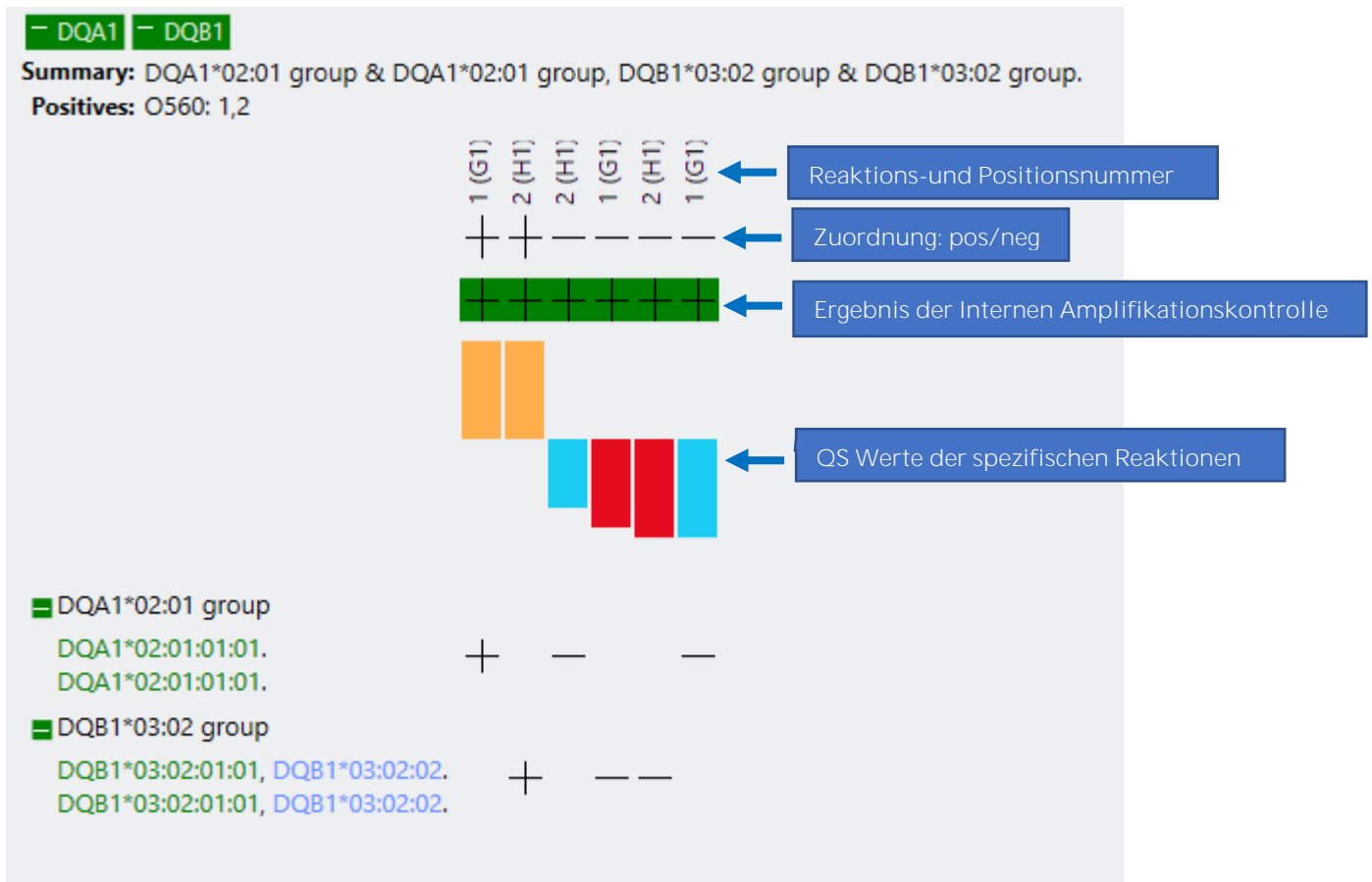
Das grüne Feld oberhalb des Histogramms stellt die interne Amplifikationskontrolle dar. Wenn diese ausfällt, wird das Feld weiß und enthält ein "-". Mit den Schaltflächen  in der oberen rechten Ecke können Sie das Histogramm vergrößern oder verkleinern.

Das FastQ® CD-Kit konzentriert sich auf die Differenzierung der Zöliakie-assoziierten Allelen DQA1*02:01, DQA1*05:01, DQA1*05:05 und DQB1*02:01, DQB1*02:02, DQB1*03:02 von anderen nicht-assoziierten Allelen. Daher wird kein vollständiger HLA-DQ-Genotyp erstellt.

In der Standardansicht des Ergebnis-Histogramms wird nur der DQA1-Locus angezeigt. Durch Drücken der grauen DQB1-Schaltfläche wird auch dieser Locus angezeigt: 

Standardmäßig werden die Ergebnisse im Histogramm zusammengefasst. Bei positiven Ergebnissen erweitert die Schaltfläche  die Ergebnisse und zeigt die Allelgruppenstrings mit den entsprechenden Reaktionsmustern an.

Oberhalb des Histogramms befindet sich eine Zusammenfassung des Ergebnisses, z.B. DQA1*02:01 group & DQA1*02:01 group und ein Hinweis auf die positiven Reaktionen ("Positives"). Die Darstellung als DQA1*02:01 group & DQA1*02:01 group stammt aus der Auswertung kompletter HLA-Typisierungen in derselben Software und ist nicht ganz korrekt, da es sich um ein homozygotes oder heterozygotes Ergebnis für DQA1 handeln kann.



7.2.2 Zöliakie-assoziierte Allel-Gruppen

Die Reaktionsmixe erkennen sowohl häufige und gut dokumentierte Allele als auch seltene Allele (siehe 7.5 Kitspezifität). Um die Darstellung zu vereinfachen, wurden CWD-Gruppen definiert, die im Wesentlichen nur die CWD-Allele enthalten:

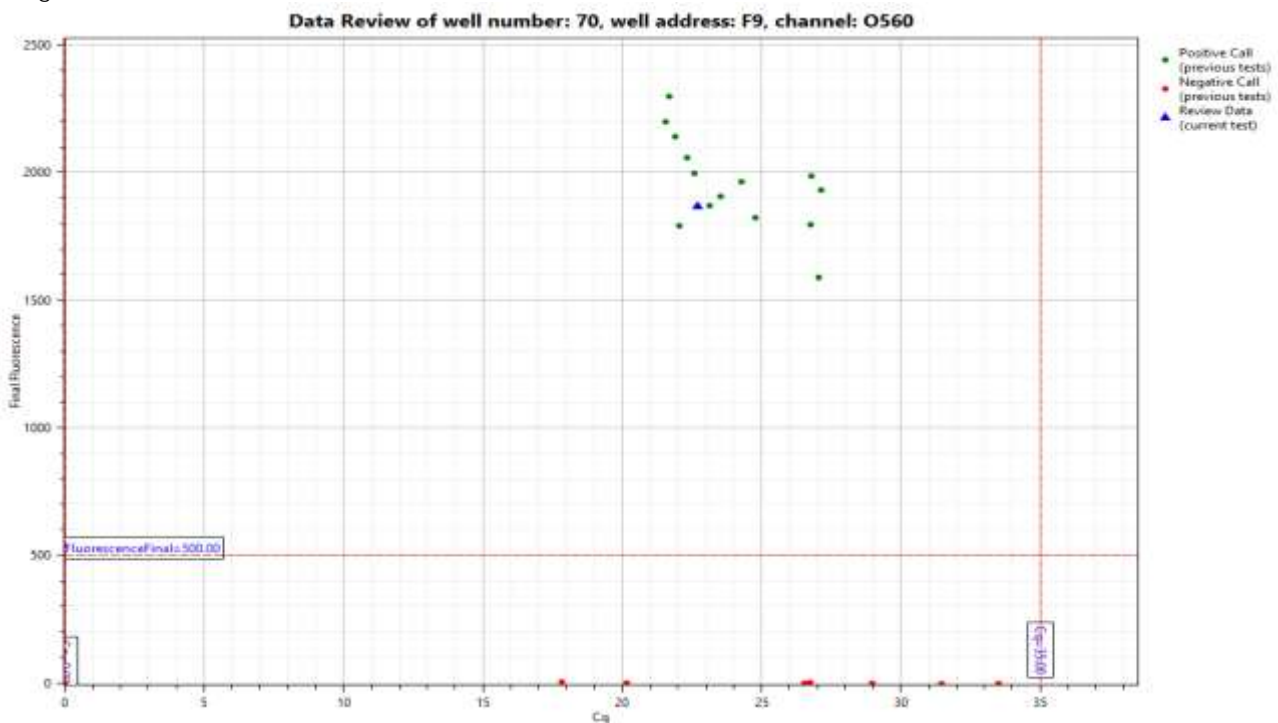
- DQA1*05:05/08/09 group:
DQA1*05:05:01:01 (C)
DQA1*05:08 (C)
DQA1*05:09:01:01 (WD)
aufgrund unbekannter Sequenz im Exon 3 nicht enthalten: DQA1*05:02 (WD)
- DQA1*05:01/03 group:
DQA1*05:01:01:01 (C)
DQA1*05:03:01:01 (C)
aufgrund unbekannter Sequenz im Exon 3 nicht enthalten: DQA1*05:02 (WD)
- DQA1*02:01 group:
DQA1*02:01:01:01 (C)
- DQB1*02:01 group:
DQB1*02:01:01:01 (C)
- DQB1*02:02 group:
DQB1*02:02:01:01 (C)
DQB1*02:180 (C) – früher bekannt als DQB1*02:03

- DQB1*03:02 group:
DQB1*03:02:01:01 (C)
DQB1*03:02:02 (WD)

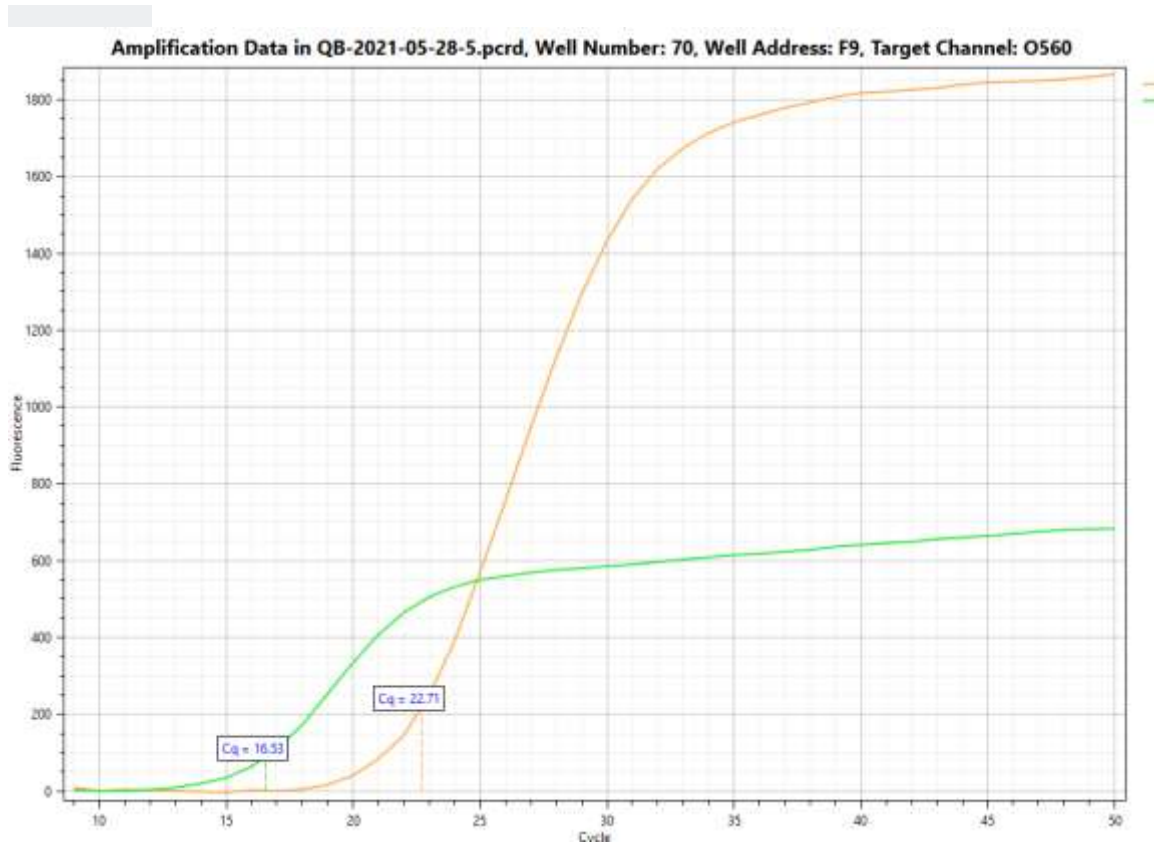
7.2.3 Werkzeuge zur Interpretation

In PlexTyper® sind einige Werkzeuge verfügbar, die nützlich sein können, wenn die automatische Interpretation kein Ergebnis findet oder wenn es ein seltenes Ergebnis gibt, das überprüft werden sollte. Die meisten dieser Werkzeuge sind für eine vollständige HLA-Typisierung gedacht und sind für die Auswertung des FastQ® CD-Kits nicht geeignet. Eine detaillierte Beschreibung finden Sie in der Gebrauchsanweisung für die PlexTyper® Software. Im Allgemeinen sollten Reaktionen mit einem schlechten Quality Score (QS-Wert zwischen +3 und -3) überprüft werden.

Ein Doppelklick auf die Balken für den QS-Wert öffnet ein Diagramm, das den Cq-Wert und die Endfluoreszenz der Reaktion im Kontext anderer Reaktionen mit demselben Kit-Lot zeigt:



Die roten Linien zeigen die Schwellenwerte für positive Reaktionen an. Das blaue Dreieck stellt den aktuell ausgewählten Test dar. Ein Doppelklick auf das blaue Dreieck öffnet ein Fenster mit den Amplifikationskurven für die interne Amplifikationskontrolle (grün) und die HLA-DQ spezifische Reaktion (orange). Prüfen Sie bei einem schlechten QS-Wert, ob die Reaktion in der Nähe eines der Schwellenwerte liegt und ob die Amplifikationskurve eine sigmoidale Form aufweist.



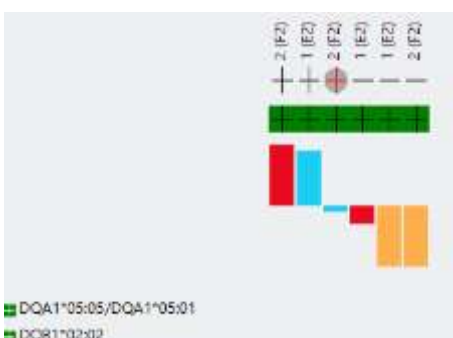
7.2.4 Eine Zuordnung für eine Reaktion ändern

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.

Change Call: Change well number 13, channel R610, from - to +

	Summary	Genotypes	Serology
DQB1	DQB1*02:01 & DQ...	DQB1*02:01 group.	DQ2
		DQB1*02:02/02:180 group.	DQ2

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



7.3 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 Export 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.

The screenshot shows the software interface with three callout boxes: 'Plattenlayout ansehen' (View Plate Layout), 'Exportieren' (Export), and 'Bericht erstellen' (Create Report). Below these are three icons: a grid for the plate layout, a document for export, and a report icon for creating a report.

Technical		Locus	Summary	Genotype	Serology
Medical					
<input type="checkbox"/>	T	DQA1	DQA1*02:01 group	DQA1*02:01:01:01.	DQA1*02
<input type="checkbox"/>	M				
<input type="checkbox"/>	T	DQB1	DQB1*03:02 group	DQB1*03:02:01:01, DQB1*03:02:02.	DQ8
<input type="checkbox"/>	M				

Reaction Comments

Coeliac risk allele detected; see IFU for details.
Coeliac risk allele detected; see IFU for details

User annotation of result

[Empty text box for user annotation]

Im Feld Reaction Comments werden die von der Software generierten Kommentare zum Vorhandensein von Zöliakie-assoziierten Allelen angezeigt. Wenn keines der aufgelisteten assoziierten Allele gefunden wird, lautet die Zusammenfassung "DQA1* No DQA Coeliac alleles identified " oder "DQB1* No DQB Coeliac alleles identified ".

In einem weiteren Feld am unteren Rand des Fensters kann der Benutzer Kommentare eingeben (User annotation of result).

In der Software ist ein zweistufiges Genehmigungsverfahren implementiert. Die technische Freigabe (Technical approval -T) kann entweder von einem Benutzer mit der Rolle Technician oder Supervisor durchgeführt werden. Dazu wird die Schaltfläche in der ersten Spalte gedrückt, die dann grün leuchtet. In einem zweiten Schritt wird die medizinische Freigabe (Medical approval -M) ausschließlich von einem Supervisor durchgeführt.

Die Freigabe kann für alle Genorte zusammen in der Kopfzeile oder einzeln in den jeweiligen Zeilen mit den Genorten erfolgen.

Wurde ein Genort genehmigt (entweder technisch oder medizinisch) und wird nachträglich ein Reaktionswert für dieses Ergebnis geändert, werden alle Genehmigungen entfernt (zunächst wird eine Warnung angezeigt).

Wenn als Allel-Filter All ausgewählt ist, werden unter Genotype auch die seltenen Allele angezeigt:

<input type="checkbox"/> Technical <input type="checkbox"/> Medical	Locus	Summary	Genotype	Serology
<input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> M	DQA1	DQA1*02:01 group	DQA1*02:01:01:01, DQA1*02:01:01:02~03, DQA1*02:01:02~06, DQA1*02:02N/03/04/05/07/08/09/10/11/12/13/14/15/16/17/18/19/20/21/22/23.	DQA1*02
<input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> M	DQB1	DQB1*03:02 group	DQB1*03:02:01:01, DQB1*03:02:02, DQB1*03:02:01:02~12, DQB1*03:02:03~09/11~35, DQB1*03:07/08/11/18/32/37/45:01~02/62~64/66N~68/70/81/85/106/107/125/146/153/161/174/175/178/179/184/185/189/190/199/203~205/210/211/213N~215/220/221/224/225/228/229/233/237N/240/245/247/251/261/263:01:01~02/265/269N/273/274/277~279/287/289/295/296/298~301/308/310N/315/320~324/333/334N/339N/343~345/348/349/352/362/364/367~369/379/383/386/388/392/403N/409/410/412/413/415/416/422N/429/433/437/440N~442/444/446/447/450/452/456/457/459/462~464/466/471, DQB1*06:29/63/123/139/320/337.	DQ8

In der Kopfzeile oberhalb des Ergebnis-Histogramms werden Informationen zur Probe, zum verwendeten Kit und zum verwendeten Cycler angegeben.

Summary			
Name		Person Id	
Sample Id	1920067	Sample Date	
Test Id	325	Kit Details	FastQ CD-728202-LC KSI-127CDQ-20201
User Id	Admin	Test Date	17 Mar 2022
KSI Comments	Celiac risk depends on the combination of DQ alleles; see IFU for details		Cycler File
Sample Comments		Instrument Id	LC480 I/96 sn32041 /Default CC/

7.4 Risikobewertung für Zöliakie

Die folgende Tabelle zeigt das Risiko für Zöliakie in Verbindung mit den erwarteten Ergebnissen des FastQ® CD-Kits. Die Risikozuordnung basiert auf den in Megiorni und Pizzuti (2012) und Sollid und Lie (2005) dargestellten Daten.

1	DQB1*02:01	DQA1*05:05	Höchstes Risiko
	DQB1*03:02	-	
2	DQB1*02:01	DQA1*05:05	Hohes Risiko
3	DQB1*02:01	DQA1*05:05	Hohes Risiko
	-	DQA1*05:01	
4	DQB1*02:01	DQA1*05:05	Hohes Risiko
	DQB1*02:02	DQA1*02:01	

5	DQB1*02:02	DQA1*02:01	Hohes Risiko
	DQB1*03:02	-	
6	DQB1*03:02	-	Hohes Risiko
7	DQB1*03:02	DQA1*05:01	Hohes Risiko
8	DQB1*03:02	DQA1*05:05	Hohes Risiko
9	DQB1*02:02	DQA1*05:01	Niedriges Risiko
10	DQB1*02:02	DQA1*05:05	Niedriges Risiko
11	DQB1*02:02	DQA1*02:01	Niedriges Risiko
12	DQB1*02:02	-	Niedriges Risiko
13		DQA1*05:01	Sehr niedriges Risiko
		DQA1*05:05	
14		DQA1*05:01	Sehr niedriges Risiko
15		DQA1*05:05	Sehr niedriges Risiko
16	-	-	Zöliakie unwahrscheinlich

7.5 Spezifität des Kits

Die folgenden Allele werden vom Kit erkannt:

Primermix I	Common & well documented*	Selten*
CAL Fluor® Red 610	DQB1*02:01:01:01	<i>DQB1*02:01:01:02-13, *02:01:04-08, *02:01:24-42, *02:03:02, *02:07:01, *02:08, *02:09, *02:14:01:01-02, *02:27, *02:48, *02:53Q, *02:57, *02:59, *02:63, *02:72, *02:79, *02:81, *02:82, *02:83, *02:93, *02:96N, *02:98, *02:99, *02:102, *02:105-109, *02:111, *02:112, *02:114, *02:115, *02:118, *02:119, *02:123, *02:125, *02:128, *02:130, *02:132N, *02:133, *02:134N, *02:135, *02:136, *02:148, *02:149, *02:152, *02:154, *02:155, *02:157, *02:158-160, *02:163N, *02:164, *02:166, *02:170, *02:174, *02:178, *02:182, *02:184-186, *02:188-193, *02:196-198.</i>
Cyanine 5	DQA1*05:05:01:01 DQA1*05:08 DQA1*05:09 DQA1*05:02	<i>DQA1*05:05:01:02-30, *05:05:02 ~10, *05:09:01:02, *05:10-14, *05:17N, *05:20, *05:21, *05:24-26, *05:28, *05:29Q, *05:39, *05:42-46, *05:48, *05:50, *05:51.</i>
CAL Fluor® Orange 560	DQA1*02:01:01:01	<i>DQA1*02:01:01:02- *02:23.</i>

Primermix II	Common & well documented*	Selten*
CAL Fluor® Red 610	DQB1*02:02:01:01, DQB1*02:180.	<i>DQB1*02:02:01:02-12, *02:02:02, *02:02:06:02, *02:02:07-17, *02:06, *02:10, *02:11, *02:12, *02:20N, *02:26, *02:50, *02:62, *02:64, *02:65, *02:71, *02:80, *02:84, *02:89:01, *02:89:02, *02:95, *02:97, *02:110, *02:113, *02:116, *02:117, *02:120-122, *02:124, *02:126, *02:127, *02:131, *02:137, *02:138, *02:141, *02:142:01:01-147, *02:150, *02:153, *02:156, *02:161, *02:162N, *02:165, *02:167N, *02:169, *02:171Q, *02:172, *02:175, *02:176N, *02:179, *02:183N, *02:187, *02:194N, *02:195, DQB1*03:01:01:26.</i>
Cyanine 5	DQA1*05:01:01:01, DQA1*05:03:01:01	<i>DQA1*05:01:01:02-07, *05:03:01:02, *05:03:02, *05:06:01:01-03, *05:07, *05:15N, *05:18, *05:19, *05:22, *05:23, *05:27, *05:31, *05:33, *05:35, *05:36N, *05:38, *05:40, *05:41, *05:47, *05:49.</i>
CAL Fluor® Orange 560	DQB1*03:02:01:01 DQB1*03:02:02.	<i>DQB1*03:02:01:02-12, *03:02:03-09, *03:02:11-35, *03:07, *03:08, *03:11, *03:18, *03:32, *03:37, *03:45:01, *03:45:02, *03:62-68, *03:70, *03:81, *03:85, *03:106, *03:107, *03:125, *03:146, *03:153, *03:161, *03:174, *03:175, *03:178, *03:179, *03:184, *03:185, *03:189, *03:190, *03:199, *03:203-205, *03:210, *03:211, *03:213N, *03:214, *03:215, *03:220, *03:221, *03:224, *03:225, *03:228, *03:229, *03:233, *03:237N, *03:240, *03:245, *03:247, *03:251, *03:261, *03:263:01:01, *03:263:01:02, *03:265, *03:269N, *03:273, *03:274, *03:277, *03:278, *03:279, *03:287, *03:289, *03:295, *03:296, *03:298-301, *03:308, *03:310N, *03:315, *03:320-324, *03:333, *03:334N, *03:339N, *03:343-345, *03:348, *03:349, *03:352, *03:362, *03:364, *03:367-369, *03:379, *03:383, *03:386, *03:388, *03:392, *03:403N, *03:409, *03:410, *03:412, *03:413, *03:415, *03:416, *03:422N, *03:429, *03:433, *03:437, *03:440N, *03:441, *03:442, *03:444, *03:446, *03:447, *03:450, *03:452, *03:456, *03:457, *03:459, *03:462-464, *03:466, *03:471, DQB1*06:29, *06:63, *06:123, *06:139, *06:320, *06:337.</i>

Seltene Allele mit unbekannter Reaktivität aufgrund unvollständiger Sequenzen

DQA1*05 Allele, die im Exon 3 nicht vollständig sequenziert sind, können entweder in Reaktion eins oder in Reaktion zwei amplifiziert werden, roter Kanal 610.	<i>DQA1*05:01:02, *05:02 (DQA1*05:02 is listed as CWD), *05:04, *05:16, *05:30, *05:32, *05:34, *05:37.</i>
DQB1*02 Allele, die im Exon 3 nicht vollständig sequenziert sind, können entweder in Reaktion eins oder in Reaktion zwei amplifiziert werden, roter Kanal 610.	<i>DQB1*02:01:02-03, *02:01:09, *02:01:11-13, *02:01:15-23, *02:05, *02:07:02, *02:13, *02:14:02, *02:15-02:19, *02:21-25, *02:28-47, *02:49, *02:51, *02:52, *02:54-56, *02:58N, *02:60, *02:61, *02:66-02:70, *02:73-78, *02:85-88, *02:90, *02:91, *02:92, *02:94, *02:100, *02:101, *02:103, *02:104, *02:129N, *02:139, *02:140, *02:151, *02:168, *02:173, *02:177N, *02:181.</i>
DQB1*02 Allele, die in diesem Kit nicht erkannt werden.	<i>DQB1*02:04.</i>

IMGT Database 3.47.0

* Common und Well Documented Allele basieren auf dem CWD 2.0.0 Katalog (Mack et al 2013) mit Anpassungen aufgrund späterer Sequenz-Updates

8 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.

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 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

Für das **FastQ® CD**-Kit wurde eine interne Leistungsbewertungsstudie mit 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

Genotypen	Anzahl Proben CFX	Anzahl Proben LC 480 II	Anzahl Proben QS 6	Übereinstimmung mit Vortypisierung
DQB1*02:01 positiv	11	11	11	100%
DQA1*05:05, DQA1*05:08, DQA1*05:09, DQA1*05:02 positiv	28	28	28	100%
DQA1*02:01 positiv	22	22	22	100%
DQB1*02:01, DQA1*05:05, DQA1*05:08, DQA1*05:09, DQA1*05:02, DQA1*02:01 negativ	200	200	200	100%
Total	261	261	261	100%

Q Primermix II

Genotypen	Anzahl Proben CFX	Anzahl Proben LC 480 II	Anzahl Proben QS 6	Übereinstimmung mit Vortypisierung
DQB1*02:02, DQB1*02:180	21	21	21	100
DQA1*05:01, DQA1*05:03	14	14	14	100
DQB1*03:02	12	12	12	100
DQB1*02:02, DQB1*02:180, DQA1*05:01, DQA1*05:03, DQB1*03:02 negativ	214	214	214	100
Total	261	261	261	100

10 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.

11 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).

12 PROBLEMBEHANDLUNG

Fehler	mögliche Ursache	mögliche Lösung
Schlechtes bzw. kein Signal	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 Plastik-ware	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!
Signal in Negativkontrolle	Kontamination der Negativkontrolle mit DNA	Wiederholung der Negativkontrolle Dekontamination des Arbeitsplatzes

13 VERWENDETE MARKENNAMEN

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







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

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

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

FrameStar® ist ein eingetragener Markenname der Firma Azenta Life Sciences

14 ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Oberer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
CONT	Inhalt, enthält
GENOTYPING	Zweckbestimmung: Bestimmung von humangenetischen Merkmalen, die mit Krankheiten oder pharmakogenetischen Reaktionen assoziiert sind
eIFU	Elektronische Gebrauchsinformation
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nr.
PLEX MIX	Mastermix für RT-PCR
Q Primermix CD I	Primermix Nummer I für den Nachweis von HLA-DQ-Attributen mit dem FastQ® CD Kit
Q Primermix CD II	Primermix Nummer II für den Nachweis von HLA-DQ-Attributen mit dem FastQ® CD Kit
REF	Bestell-Nr.
	<p>Achtung (siehe Kapitel 8)</p> <p>H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Sicherheitshinweise</p> <p>P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.</p> <p>P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.</p> <p>P103 Lesen Sie sämtliche Anweisungen aufmerksam und befolgen Sie diese.</p> <p>P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.</p> <p>P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen.</p> <p>P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.</p> <p>P501 Inhalt/Behälter gemäß lokalen/nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.</p>

15 LITERATUR

Al-Toma, Abdulbaqi et al. "European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders." *United European gastroenterology journal* vol. 7,5 (2019): 583-613. doi:10.1177/2050640619844125

Bergseng, Elin et al. "Different binding motifs of the celiac disease-associated HLA molecules DQ2.5, DQ2.2, and DQ7.5 revealed by relative quantitative proteomics of endogenous peptide repertoires." *Immunogenetics* vol. 67,2 (2015): 73-84. doi:10.1007/s00251-014-0819-9.

Beutler, E, Gelbart, T.; Kuhl, W. (1990) Interference of heparin with the polymerase chain reaction, *Biotechniques* 1990 Aug;9(2):166

Husby, Steffen et al. "AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease-Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review." *Gastroenterology* vol. 156,4 (2019): 885-889. doi:10.1053/j.gastro.2018.12.010

Husby, S.*; Koletzko, S.†; Korponay-Szabó, I.R.‡; Mearin, M.L.§; Phillips, A.||; Shamir, R.¶; Troncone, R.#; Giersiepen, K.**; Branski, D.††; Catassi, C.‡‡; Leigeman, M.§§; Mäki, M.||||; Ribes-Koninckx, C.¶¶; Ventura, A.###; Zimmer, K.P.**** for the ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis, on behalf of the ESPGHAN Gastroenterology Committee European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*: January 2012 - Volume 54 - Issue 1 - p 136-160 doi: 10.1097/MPG.0b013e31821a23d0

Karell, Kati et al. "HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease." *Human immunology* vol. 64,4 (2003): 469-77. doi:10.1016/s0198-8859(03)00027-2

Ludvigsson, Jonas F et al. "Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology." *Gut* vol. 63,8 (2014): 1210-28. doi:10.1136/gutjnl-2013-306578

Mack, S.J., Cano, P., Hollenbach, J.A., He, J., Hurley, C.K., Middleton, D., Moraes, M.E., Pereira, S.E., Kempenich, J.H., Reed, E.F., Setterholm, M., Smith, A.G., Tilanus, M.G., Torres, M., Varney, M.D., Voorter, C.E.M., Fischer, G.F., Fleischhauer, K., Goodridge, D., Klitz, W., Little, A.-M., Maiers, M., Marsh, S.G.E., Müller, C.R., Noreen, H., Rozemuller, E.H., Sanchez-Mazas, A., Senitzer, D., Trachtenberg, E. and Fernandez-Vina, M. (2013), Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens*, 81: 194-203. <https://doi.org/10.1111/tan.12093>

Megiorni, F., Pizzuti, A. "HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing" *Journal of Biomedical Science* (2012), 19:88, <http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/88>

Sollid, L M et al. "Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer." *The Journal of experimental medicine* vol. 169,1 (1989): 345-50. doi:10.1084/jem.169.1.345

Sollid, L M, and E Thorsby. "The primary association of celiac disease to a given HLA-DQ alpha/beta heterodimer explains the divergent HLA-DR associations observed in various Caucasian populations." *Tissue antigens* vol. 36,3 (1990): 136-7. doi:10.1111/j.1399-0039.1990.tb01816.x

Sollid, Ludvig M, and Benedicte A Lie. "Celiac disease genetics: current concepts and practical applications." *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* vol. 3,9 (2005): 843-51. doi:10.1016/s1542-3565(05)00532-x

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