

DE

GEBRAUCHSINFORMATION

FastQ[®] B*27 direct

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

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-diagnostics.com



REF 728201 FastQ[®] B*27 direct

Version: 5/2022 / Stand: 2022-06 Änderungen zu Version 3/2021 und 4/2022 sind orange markiert.

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



INHALT

1	ZWECKBESTIMMUNG.....	2
2	PRODUKTBESCHREIBUNG.....	2
3	TESTPRINZIP	2
4	MATERIAL.....	2
4.1	Inhalt des FastQ® B*27 direct Kits.....	2
4.2	Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte	3
4.3	Validierte Cycler und Reaktionsgefäße.....	3
5	LAGERUNG UND HALTBARKEIT	3
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	4
6.1	Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	4
6.2	Probenvorbereitung des Testmaterials.....	4
6.3	Amplifikation.....	4
6.4	Setup der RT-PCR Cycler.....	5
6.4.1	CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System.....	5
6.4.2	LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System	6
6.4.3	QuantStudio™ 6 Flex System	7
7	AUSWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	8
7.1	Auswertung mit der PlexTyper® Software.....	8
7.1.1	Export der Ergebnisse vom Cycler	9
7.1.1.1	CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System.....	9
7.1.1.2	LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System	9
7.1.1.3	QuantStudio™ 6 Flex System.....	10
7.1.2	Auswertung und Interpretation	10
7.1.2.1	Ergebnis-Histogramm	11
7.1.2.2	Werkzeuge zur Interpretation	12
7.1.2.3	Eine Zuordnung für eine Reaktion ändern	14
7.1.3	Darstellung der Ergebnisse.....	14
7.2	Manuelle Auswertung und Interpretation	15
7.3	Spezifität des Kits	16
8	WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE.....	16
9	LEISTUNGSMERKMALE	17
10	GRENZEN DER METHODE	17
11	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	18
12	PROBLEMBEHANDLUNG	18
13	VERWENDETE MARKENNAMEN.....	19
14	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN	19
15	LITERATUR.....	19

1 ZWECKBESTIMMUNG

Die Zweckbestimmung des FastQ® B*27 direct Kits ist die Bestimmung des Vorhandenseins von HLA-B*27-Allelen, die mit verschiedenen Formen der Axialen Spondyloarthritis assoziiert sind.

2 PRODUKTBESCHREIBUNG

Der **FastQ® B*27 direct** Kit wird zum molekulargenetischen Nachweis von HLA-B*27 Allelen eingesetzt. Das HLA-B27 Protein ist eine Variante des Humanen Leukozyten Antigen-B (HLA-B) und ist mit dem Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen (Morbus Bechterew bzw. Spondylitis ankylosans, Morbus Reiter, reaktive Arthritiden) assoziiert. Der Nachweis von HLA-B*27 wird daher für die Diagnostik genutzt (1, 2). Ein positiver HLA-B*27 Befund ist mit einem sehr hohen Krankheitsrisiko verbunden. Vor allem bei unklarem Verdacht auf M. Bechterew liefert eine gesicherte HLA-B*27 Diagnostik einen entscheidenden Beitrag für die Therapie eines Patienten. Etwa 3% bis 6% der Träger des HLA-B*27-Gens erkranken an Spondylitis ankylosans und mehr als 90% aller Patienten mit seronegativen Arthritiden sind Träger dieses Gens.

Im **FastQ® B*27 direct** Kit werden alle häufigen HLA-B*27-Allele erfasst. Der Test kann ohne DNA Isolation direkt aus Blut oder Buffy Coat durchgeführt werden.

3 TESTPRINZIP

Der Test wird mit EDTA-Vollblut bzw. Buffy Coat als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die aus den Lymphozyten im Blut freigesetzte DNA wird mit sequenz-spezifischen Primern (SSP) auf dem Exon 2 des HLA-B*27 Gens amplifiziert, die nur die B*27 Subtypen erfassen. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen fluoreszenzmarkierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®- Sonden) nachgewiesen (RT-PCR), wodurch die Spezifität des Test im Vergleich zur klassischen SSP erhöht wird. Wenn Amplifikate vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq Polymerase hydrolisiert und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge des PCR-Produkts ansteigt. Die Fluoreszenzsignale werden von der optischen Detektionseinheit des RT-PCR-Cyclers gemessen. Der Test wird in einer einzigen PCR-Reaktion durchgeführt, in der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen die interne Positiv-Kontrolle (humanes HBB-Gen) und die assoziierten Subtypen nachgewiesen werden.

4 MATERIAL

4.1 Inhalt des FastQ® B*27 direct Kits

- 1 x 260 µl Q Primermix B27-d, gebrauchsfertig, enthält Primer und Sonden
- 1 x 600 µl Q Mastermix, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
- 2 x 130 µl Blood Booster, gebrauchsfertig
- 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

- Validierter Real-Time PCR-Cycler und passende Reaktionsgefäße
- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen
- Colour Compensation Kit für den LightCycler® 480 II (REF 728259 RT CC Universal LC480, erhältlich bei BAG Diagnostics)

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.

5 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Das FastQ® B*27 direct Kit wird mit Trockeneis versandt. Nach Erhalt müssen alle Reagenzien bei ≤ -20 °C 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 bis zu 15 Zyklen für den Q Primermix B27-d und den Q Mastermix und bis zu 12 Zyklen für den Blood Booster keinen nachteiligen Effekt auf die Qualität des Kits haben.

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

Der pipettierte Reaktionsansatz vor oder nach Zugabe der verdünnten Blutprobe kann bis zu 20 Stunden bei 2...8°C lichtgeschützt gelagert werden, bevor der PCR-Lauf gestartet wird.

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 oder integriertem Stempel) verwenden.
- zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion); möglichst zwei getrennte Räume nutzen.
- Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen.

6.2 Probenvorbereitung des Testmaterials

Als Ausgangsmaterial wird EDTA-Vollblut (whole blood = WB) oder Buffy Coat (BC) verwendet. Die Blutproben sollten maximal 9 Tage bei Raumtemperatur und anschließend 3 Tage bei 2...8°C gelagert werden.

Die Proben müssen **gut durchmischt** und wie folgt verdünnt werden:

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

6.3 Amplifikation

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

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

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

2 µl	○ Primermix B27-d
5 µl	○ Mastermix
1 µl	Blood Booster
1-2 µl	Testmaterial (verdünnt 1:50 in Aqua dest.)
0-1 µl	Aqua dest. (abhängig von der Menge Testmaterial)

Das Testmaterial muss vor dem Ansatz gut durchmischt werden!

Für die **Negativkontrolle (NTC)** eine PCR Reaktion mit Aqua dest. anstatt dem Testmaterial ansetzen.

Wenn ein Prä-Mix aus Q Primermix B27-d, Q Mastermix, Blood Booster und Aqua dest. für mehr als eine Probe hergestellt wird, bitte ein angemessenes Zusatzvolumen für Pipettierverluste einrechnen.

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

Folgende Fluorophore werden bei **FastQ® B*27 direct** eingesetzt:

Fluorophor	Wave length in nm	
FAM	Excitation: 495	Emission: 520
CAL Fluor® Orange 560	Excitation: 538	Emission: 559

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"/>
	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	Anzahl Zyklen
Initiale Aktivierung	120	96	2,5	-	1
Denaturierung	5	98	2,5	-	18
Annealing + Extension	25	64	2,2	-	
Denaturierung	5	98	2,5	-	42
Annealing + Extension	25	64	*-	ja	

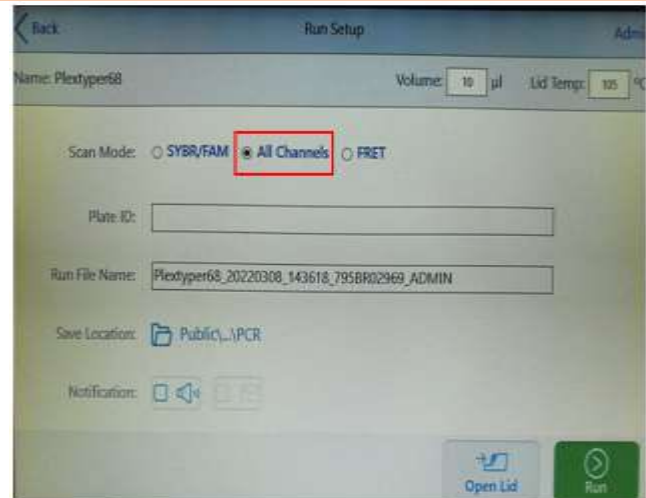
* die Standard-Ramp rate für das CFX96 Touch™ & CFX Opus 96 Real-Time PCR Detection System verwenden.

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 direct, 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	18	None	98	None	00:00:05	2.5
			64	None	00:00:25	2.2
Cycle	42	Quantification	98	None	00:00:05	2.5
			64	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**:

		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

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 dieszüglich 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

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	18	Off	98	00:00:05	2.5
			64	00:00:25	2.2
PCR Stage	42	Off	98	00:00:05	2.5
		On	64	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 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

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) 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

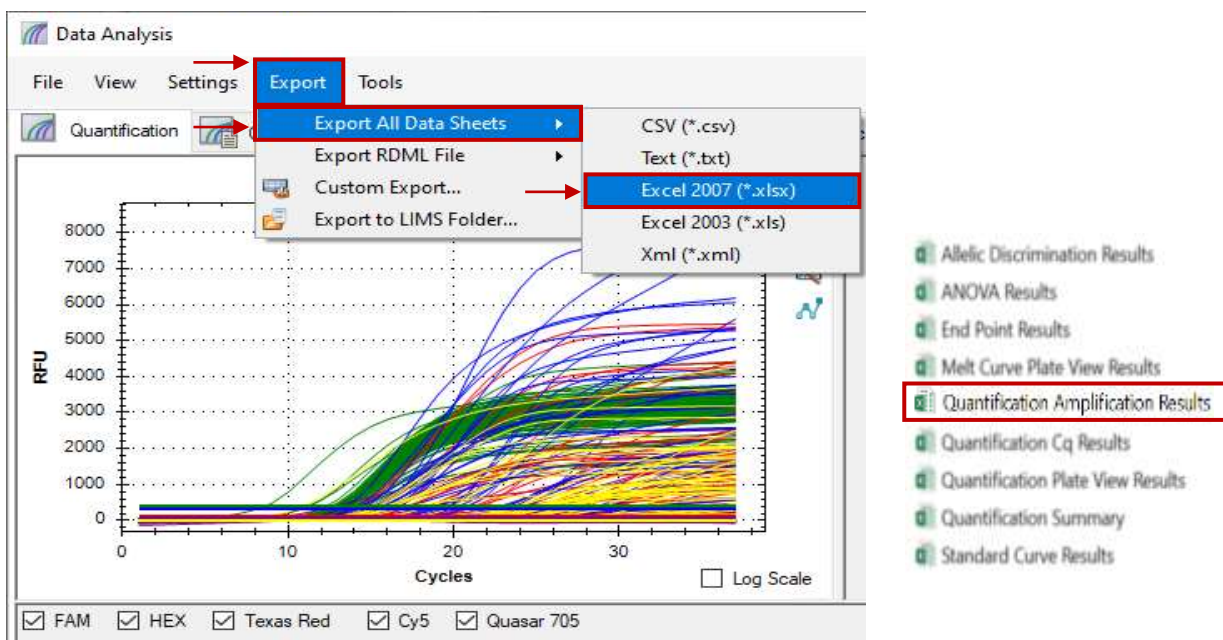
dies zu einem positiven Signal. Liegt der Cq unter 36 deutet dies auf eine mögliche Kontamination hin. Amplifikationssignale mit einem höheren Cq als 36 in der NTC können als PCR Artefakte angesehen werden. Wird eine PCR Kontamination vermutet, wird empfohlen den PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Die von der cyclor-spezifischen Software ermittelten Rohdaten werden in die PlexTyper® Software importiert. Hierfür muss vorab ein Export der cyclor-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 Cyclor

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

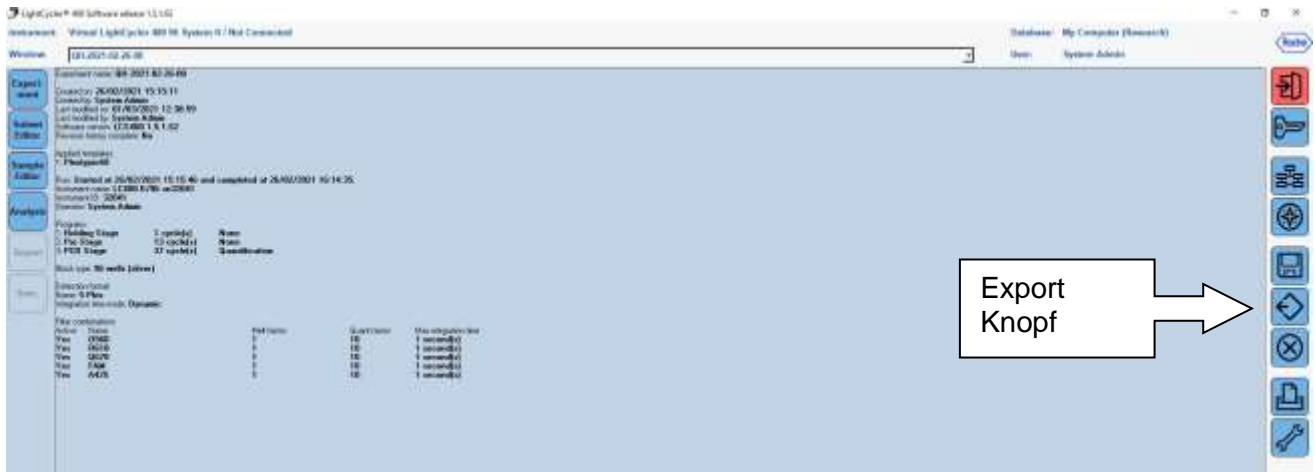
Öffnen Sie die Daten mit der CFX-Software und exportieren Sie dann die Excel 2007-Datei (.xlsx).



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

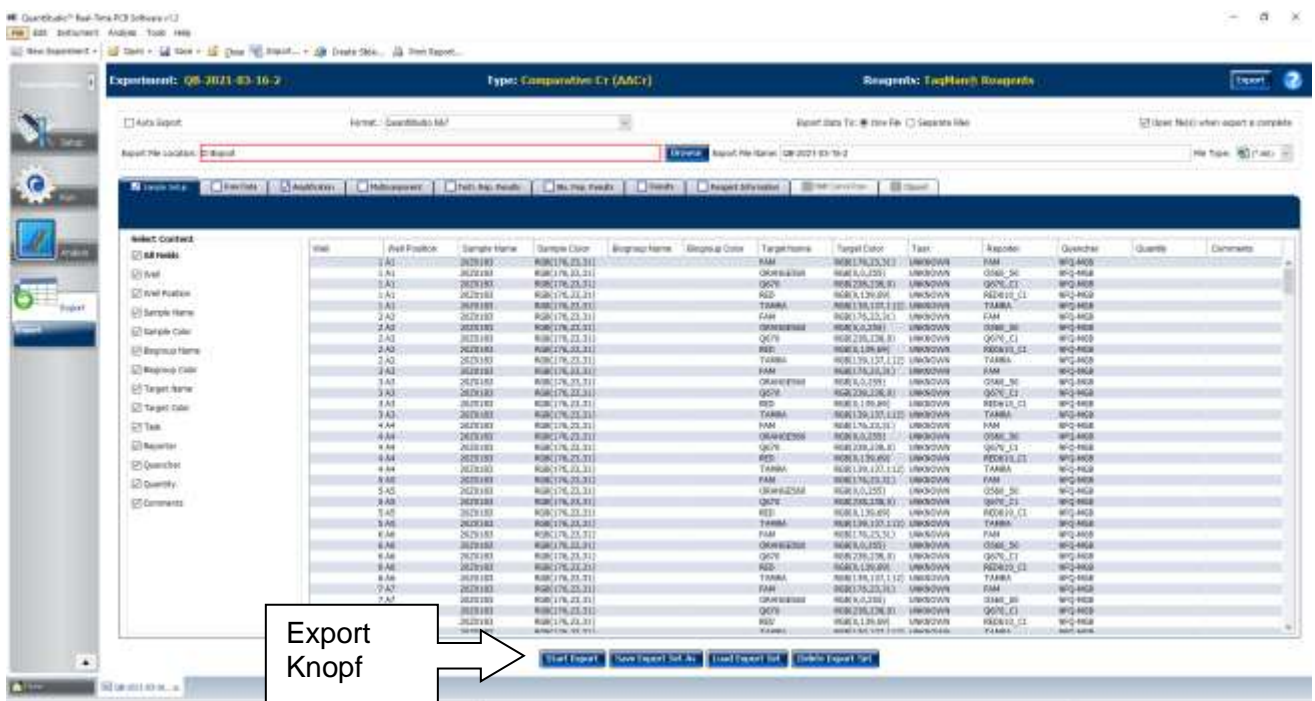
7.1.1.2 LightCycler® 480 II Real-Time PCR Detection System

PlexTyper® 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.



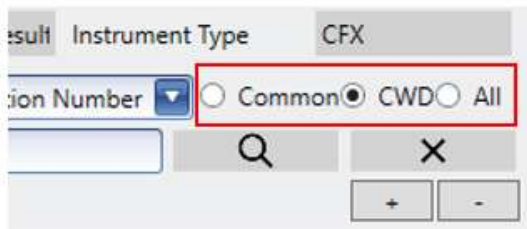
7.1.2 Auswertung und Interpretation

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.

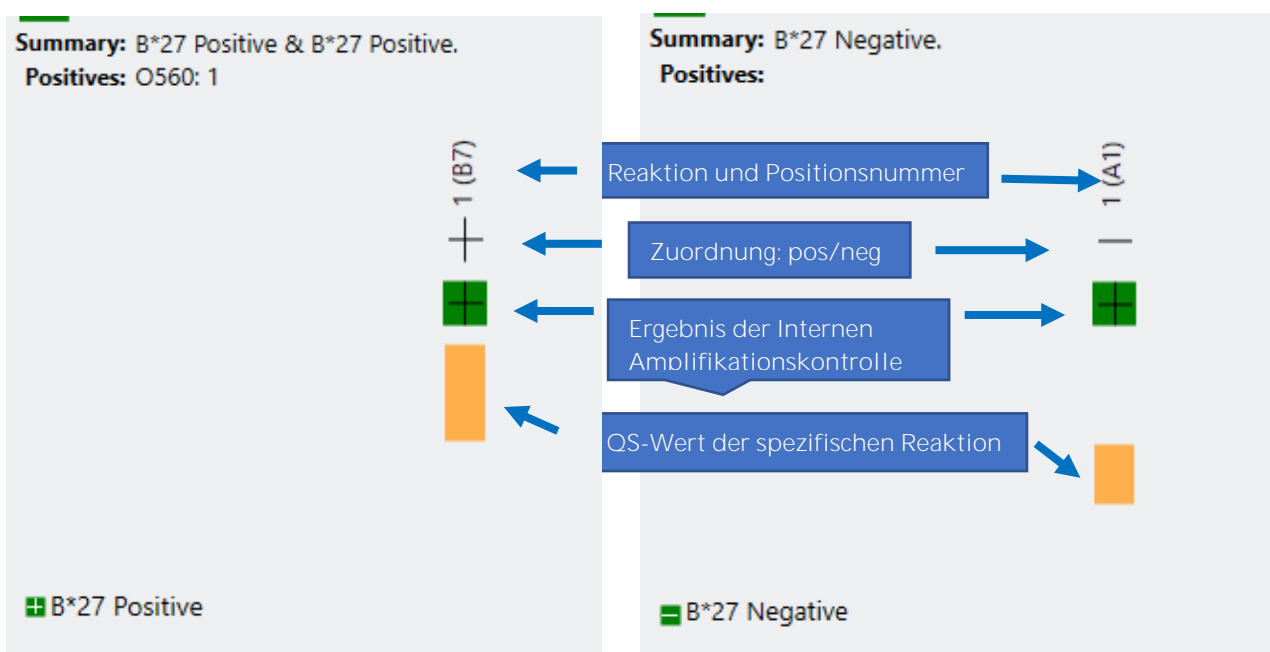


Häufige Allele (Common) sind in grün dargestellt, gut dokumentierten Allele (Well Documented) in blau und seltene (nur mit der All Option) in grau. Die CWD Liste basiert auf dem CWD 2.0.0 Katalog (Mack et al. 2013), aber einige Einträge wurden aufgrund neuerer Sequenzdaten geändert (siehe CWD 2.1.0 Liste im Download Bereich der BAG Diagnostics Website: [Downloads zu unseren BAG In-vitro Technologien und Produkten \(bag-diagnostics.com\)](http://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. 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.

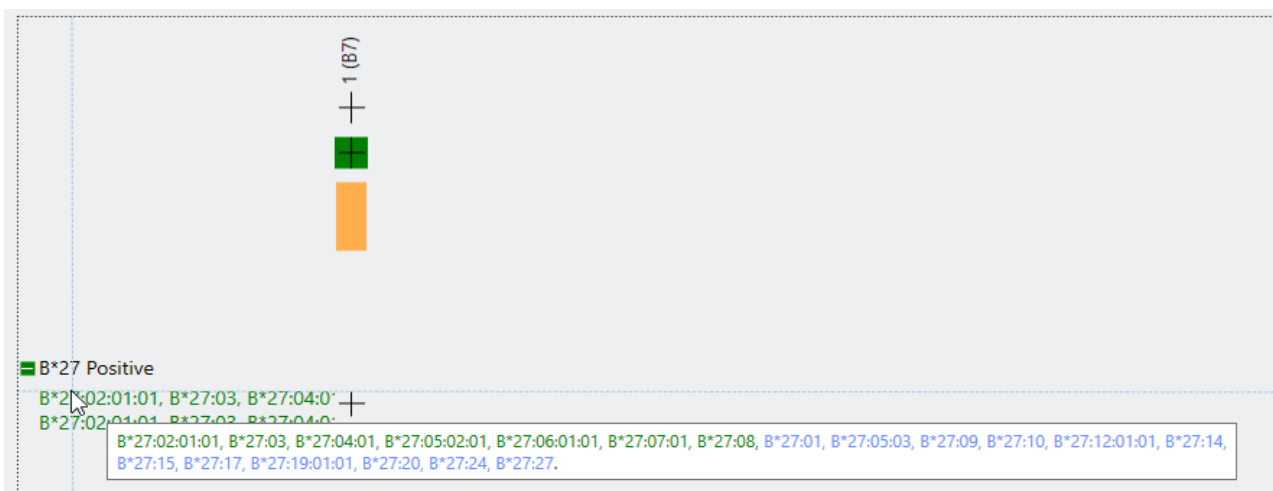
Grundsätzlich gibt es für den FastQ® B*27 direct Kit nur die zwei Optionen B*27 positiv oder B*27 negativ:



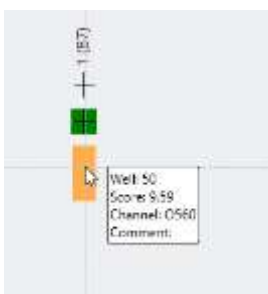
Wenn die Maus über das Histogramm bewegt wird, öffnet sich ein Fenster mit zusätzlichen Informationen, z.B. dem QS-Wert. Die Höhe des Balkens entspricht dem Qualitätswert (Quality Score = QS Wert) der Reaktion. Positive Reaktionen sind nach oben gerichtet, negative nach unten. Je höher der Balken desto eindeutiger positiv oder negativ wird eine Reaktion bewertet. Eine genaue Beschreibung der QS Werte finden Sie in der Gebrauchsinformation für die PlexTyper® Software.

Über dem Histogramm befindet sich eine Zusammenfassung („Summary“) des Ergebnisses: B*27 Positive & B*27 Positive 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 homozygotes oder ein heterozygotes 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.

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.

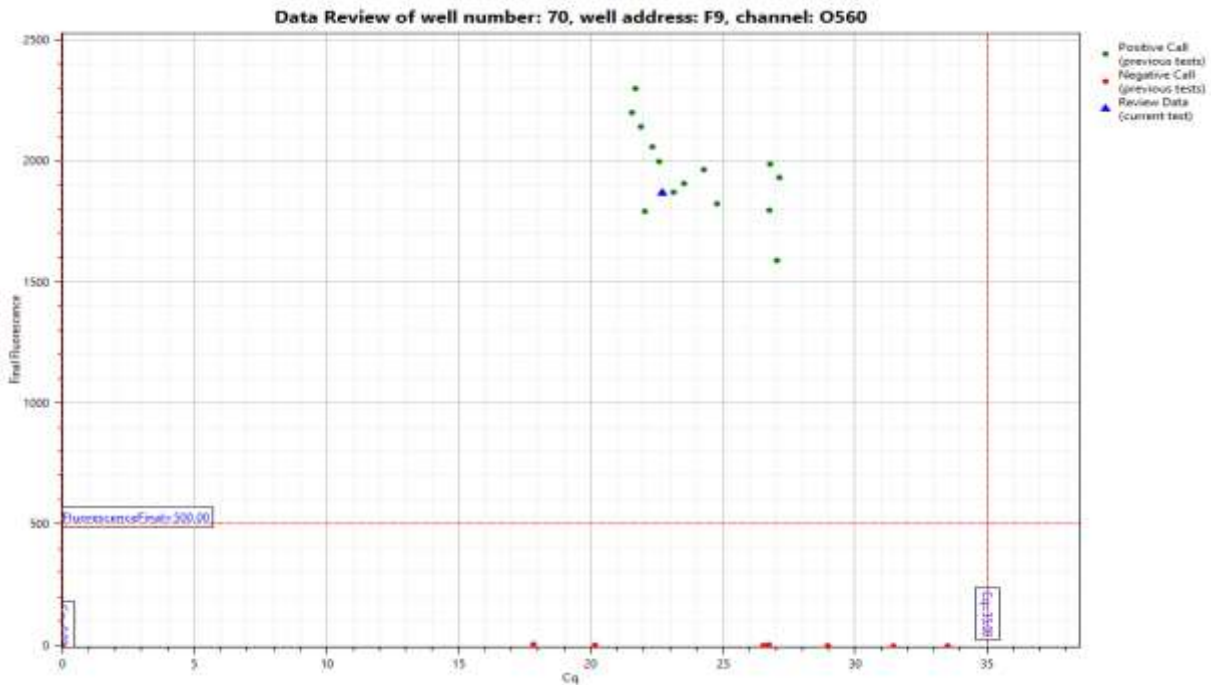


7.1.2 Werkzeuge zur Interpretation



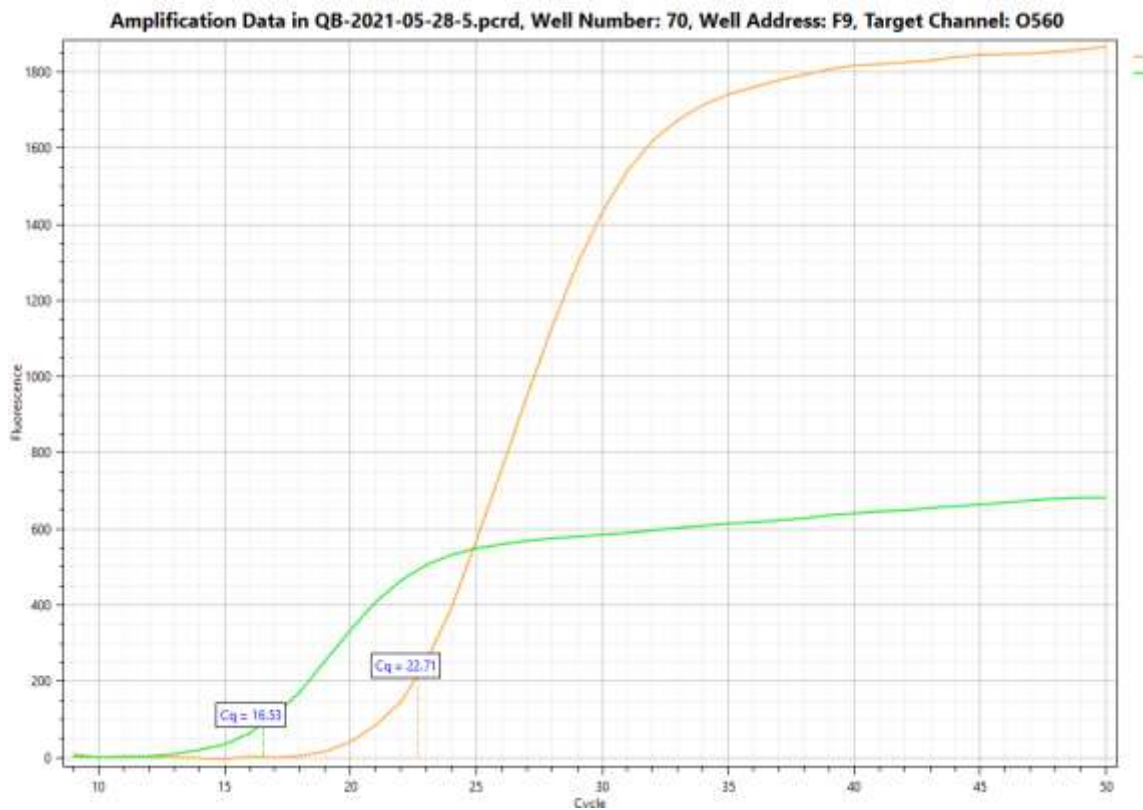
In PlexTyper® stehen einige Werkzeuge zur Verfügung, die nützlich sein können, wenn die automatische Interpretation kein Ergebnis findet oder ein seltenes Ergebnis vorliegt, das überprüft werden sollte. Die meisten dieser Werkzeuge sind für eine komplette HLA Typisierung gedacht und für die Auswertung des FastQ® B*27 direct 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:



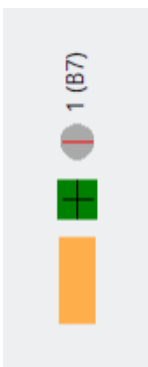
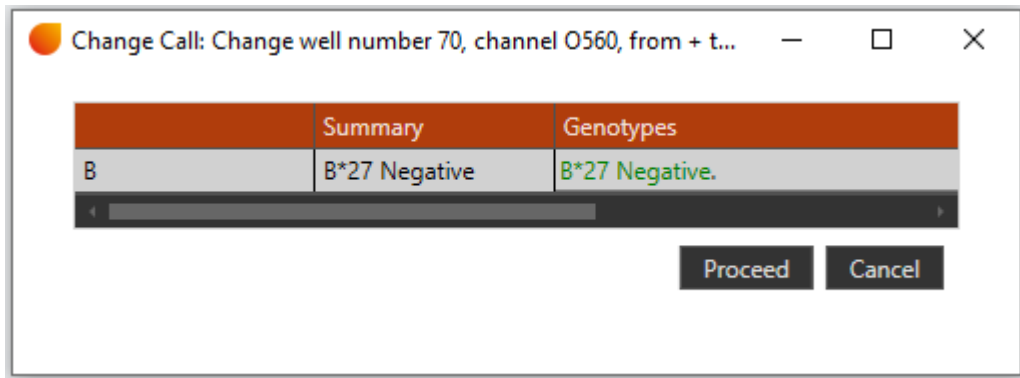
Die roten Linien geben die Schwellenwerte für positive Reaktionen an. Das blaue Dreieck repräsentiert den aktuell ausgewählten Test. Doppelklicken auf das blaue Dreieck öffnet ein Fenster mit den Amplifikationskurven für die interne Amplifikationskontrolle (grün) und die B*27 spezifische Reaktion (orange):

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

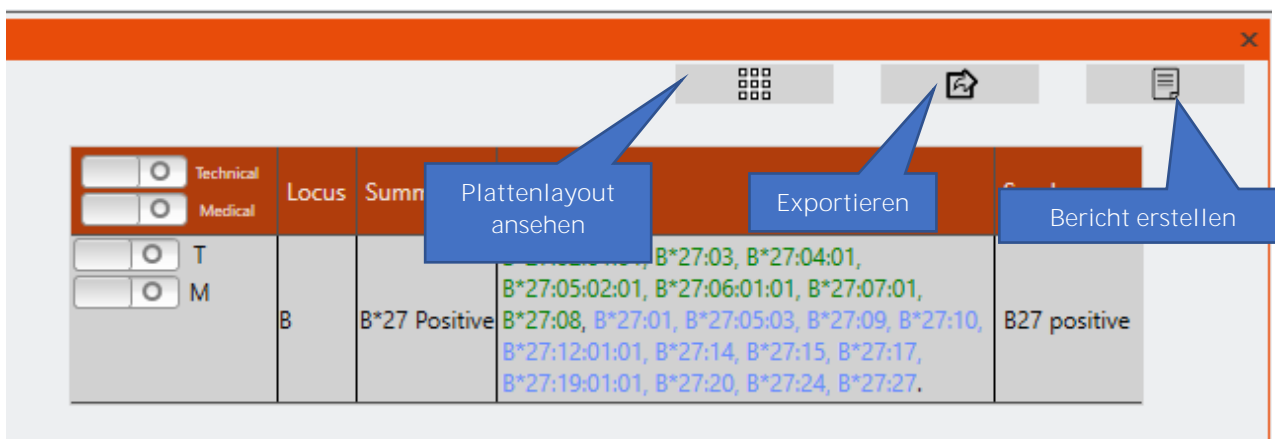
Sollte die Software eine Reaktion mit einem schlechten QS-Wert falsch bewertet haben, so kann diese Bewertung manuell geändert werden. Alle Änderungen durch den Anwender werden protokolliert und im Audit Trail im Ergebnisbericht angezeigt. Mit einem rechten Mausklick auf den entsprechenden Balken im 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

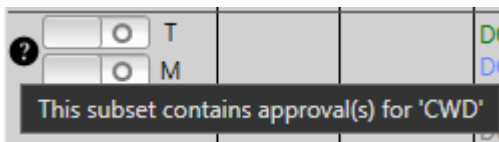
Auf der rechten Seite des Bildschirms werden die Ergebnisse in einer Tabelle angezeigt, die folgende Angaben enthält: Ergebniszusammenfassung, Genotyp als komplette Liste möglicher Allele (spiegelt den gewählten Filter wider), angenommener Phänotyp (serologische Äquivalent) und den Status der Bestätigung (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 wurden (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.



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 seltenen B*27 Allele vom Kit nicht erfasst werden. Diese Angaben erscheinen auch im Ergebnisbericht.

Summary		
Name	Person id	
Sample id	Sample Date	
Test id	Kit Details	B*27 Direct 728201 451129827GD-CFK-5611
User id	Test Date	28 May 2021
KSI Comments	Cycler File	CB-2021-05-28-3.post
Sample Comments	Instrument id	CT039548 (783BR20787)

7.2 Manuelle Auswertung und Interpretation

Alle Testansätze mit freigesetzter humaner gDNA müssen Fluoreszenzsignale im FAM-Kanal der internen Kontrolle aufweisen. Spezifisch positive Proben zeigen ein positives Farbsignal im korrespondierenden Farbkanal für CAL Fluor® Orange 560. **Amplifikations-signale von B*27 negativen Proben müssen** sich für den CAL Fluor® Orange 560 Farbkanal außerhalb des definierten Cq-Wertes befinden. Eine Negativkontrolle (NTC) mit Aqua dest. entwickelt über den gesamten RT-PCR Lauf keine Fluoreszenzsignale und dient als Kontaminationskontrolle.

Wenn bei der Negativkontrolle mit Aqua dest. Fluoreszenzsignale innerhalb der definierten Cq-Bereiche auftreten, weist dies auf eine Kontamination hin. Fluoreszenzsignale außerhalb der definierten Cq-Bereiche können aufgrund der sehr sensitiven

Testmethode bei ungenauem Pipettieren auftreten. In diesem Fall muss der Test wiederholt werden. Darüber hinaus wird eine Detailanalyse empfohlen; ggf. ist der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und die Reagenzien auszutauschen.

Es gelten die folgenden Werte für positive Signale:

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

Der Cq-Level gibt an bis zu welchem Cq eine positiven Reaktion (Fluoreszenzanstieg über den Threshold) im entsprechenden Kanal erwartet wird. Als Baseline Threshold (Schwellenwert) sollte der von der Cyclor-Software automatisch gesetzte Threshold verwendet werden. Es wird empfohlen die Plausibilität der Reaktionen anhand der Kurvenverläufe zu überprüfen und fragliche Ergebnisse zu wiederholen. Bei Fragen zur Anpassung des Thresholds oder grenzwertigen Cq Werten wenden Sie sich bitte an den Service der BAG Diagnostics (Tel.: +49 (0)6404 925125, Email: info@bag-diagnostics.com).

7.3 Spezifität des Kits

Im Einzelnen werden die folgenden Allele vom Kit erkannt:

Fluorophor	Common*	Well documented*	Rare*
CAL Fluor® Orange 560 (B*27 positiv)	B*27:02:01:01, *27:03, *27:04:01, *27:05:02:01, *27:06:01:01, *27:07:01, *27:08,	B*27:01, *27:05:03, *27:09, *27:10, *27:12:01:01, *27:14, *27:15, *27:17, *27:19:01:01, *27:20, *27:24, *27:27	B*27:02:01:02- *27:02:06, *27:04:02- *27:04:06, *27:05:02:02- *27:05:02:32, *27:05:04- *27:05:56, *27:06:01:02, *27:07:02- *27:07:06, *27:11, *27:12:01:02- *27:12:01:03, *27:13:01- *27:13:02, *27:16, *27:19:01:02, *27:21:01- *27:21:02, *27:25, *27:26, *27:28, *27:30- *27:74, *27:76- *27:84, *27:86- *27:91, *27:93 - *27:118, *27:120- *27:156, *27:158- *27:188, *27:190- *27:203- *27:255 / B*44:97

Seltene B*27-Allele, die nicht erfasst sind: 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

* Common und well documented Allele nach CWD 2.1.0 Katalog

8 WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

Der FastQ® B*27 direct Kit ist für den Gebrauch als In vitro Diagnostikum konzipiert und sollte nur von speziell ausgebildetem, qualifiziertem Personal verwendet werden. Alle Arbeiten sollten unter Berücksichtigung der guten Laborpraxis durchgeführt werden.

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs (z.B. Blut), sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung). Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem

geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots sollte vermieden werden. Der Gebrauch von sterilen Einmalpipetten und Pipettenspitzen wird empfohlen. Keine Reagenzien mit Trübung oder Anzeichen für mikrobielle Kontamination verwenden.

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

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 direct** Kit wurden für die Bestimmung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität Leistungsstudien mit vortypisierten Blutproben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen anderer CE zertifizierter Typisierungsreagenzien (u.a. Serologie, SSO, SSP) und/oder Sequenzierung verglichen. Dabei sind keine Diskrepanzen bei der Bestimmung des Merkmals HLA-B27 aufgetreten (100% Übereinstimmung).

Blut-Proben	Gesamtzahl Interne und externe Studie (CFX)	Gesamtzahl Interne Studie (QS6)	Gesamtzahl Interne Studie (LC480II)	Übereinstimmung in Prozent [%]
B27 negativ	79	84	84	100
B27 positiv	17	17	17	100
Gesamt	96	101	101	100

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

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

10 GRENZEN DER METHODE

Da das RT-PCR-Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen von DNA reagiert, ist bei der Probenvorbereitung hierauf zu achten. Validierungstests innerhalb der Leistungsbewertungsstudie des **FastQ® B*27 direct** Kits haben gezeigt, dass eine Probenverdünnung (WB/BC) zwischen 1:400 und 1:25 keinen signifikanten Einfluss auf den spezifischen Nachweis des Gewebemerkmals HLA B*27 hat. Es ist darauf zu achten, dass das Probenmaterial gut durchmischt wird, damit genügend kernhaltige Zellen für die PCR Reaktion zur Verfügung stehen. Das Nichtbeachten kann ggf. zu falsch negativen Ergebnissen im B*27 spezifischen Farbkanal führen.

Des Weiteren sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons, DNA oder Blutproben (WB/BC) zu vermeiden. 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 in der Negativkontrolle ist der PCR-Laborplatz 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, Realtime-Geräte) müssen entsprechend der Herstellervorgaben kalibriert werden.

11 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

Die Mitführung von einer Negativkontrolle dient zum Nachweis möglicher Kontaminationen. Zu diesem Zweck wird eine PCR Reaktion ohne Probenmaterial 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 und Verdünnen des Blutes achten
	Falsche Amplifikationsparameter	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrate) überprüfen
	Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert	Neuen Primermix verwenden Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/Auftauen vermeiden. Lagerungsbedingungen beachten!
	Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand	Vorsichtiges Pipettieren Abzentrifugieren der PCR Platte
	Nicht kompatible bzw. qualitativ minderwertige RT-PCR Plastikware	Verwendung von kompatibler und hochwertiger Plastikware (siehe Punkt 4.3.)
	Falsche Signalverrechnung durch abnormale Amplifikationssignale in den initialen Zyklen eines Laufes	Anwendung von Korrekturmaßnahmen durch Soft-ware (z.B. "apply fluorescence drift correction"-Funktion von Bio-Rad oder Ausschluss der ersten fünf Cyclen aus der Analyse)
Verdunstung der Reagenzien durch unsachgemäßes Verschließen der PCR Gefäße	Prüfung auf korrektes Verschließen Vorsicht bei Klebefolien im Randbereich	
Signal in Negativkontrolle	Kontamination der Negativkontrolle mit Blut bzw.DNA	Wiederholung der Negativkontrolle Dekontamination des Arbeitsplatzes

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

14 ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Oberer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
BLOOD BOOST	Blood Booster, Reagenz für RT-PCR Kits für Nachweis direkt aus Vollblut oder Buffy Coat
CONT	Inhalt, enthält
GENOTYPING	Zweckbestimmung: Bestimmung von humangenetischen Merkmalen, die mit Krankheiten oder pharmakogenetischen Reaktionen assoziiert sind
eIFU	Elektronische Gebrauchsinformation
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nr.
Q MASTERMIX	Mastermix für RT-PCR Kits für Nachweis direkt aus Vollblut oder Buffy Coat
Q PRIMERMIX B27-d	Primermix zur Bestimmung von HLA-B*27 mit dem FastQ® B*27 direct Kit
REF	Bestell-Nr.

15 LITERATUR

1. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet 1:904-907
2. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706
3. Mack et al., 2003, Tissue Antigens 81:194-203

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