

MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM)

Real-Time-PCR-Kit

*Für die Analyse der HLA-Allele DQA1*05,
DQB1*02 und DQB1*03:02/*03:05*

*For the analysis of the HLA-alleles DQA1*05,
DQB1*02 und DQB1*03:02/*03:05*

Gültig ab / Valid from 2022-02-28



KF190532
KF190596



32/96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	2
2	EINLEITUNG	2
3	TESTPRINZIP	2
4	INHALT DER TESTPACKUNG	3
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	3
7	WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
8	PROBENMATERIAL	5
9	REAL-TIME-PCR	5
	9.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	9.2 <i>Durchführung</i>	6
	9.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	7
10	ANALYSE DER ERGEBNISSE	8
11	PROBLEMBEHANDLUNG	11
12	GRENZEN DES TESTS	12
13	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	12
14	LITERATUR	13

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kit ist ein molekularbiologischer Test zum Nachweis der HLA-Allele DQA1*05, DQB1*02¹ und DQB1*03:02/*03:05^{2,3} in offenen Real-Time PCR-Systemen mittels Taq-Man-Technologie.

¹ Die Kopienanzahl von DQB1*02 wird mit dieser Methode nicht bestimmt.

² Auf Grund der Sequenzhomologie kann mit dieser Methode DQB1*03:05 nicht von DQB1*03:02 unterschieden werden. Die Häufigkeit von DQB1*03:05 ist jedoch sehr gering, ca. 0,4% in der Kaukasischen Bevölkerung, während DQB1*03:02 eine Häufigkeit von ca. 15% aufweist ([http:// www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net), Nov. 2018). Weltweit beträgt die Häufigkeit von DQB1*03:05 0,07% und die Häufigkeit von DQB1*03:02 11,5% (Solberg et al., Hum Immunol, 2008).

³ Die Detektion anderer sehr seltener Allele kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

2 EINLEITUNG

Zöliakie / Glutenunverträglichkeit (GU) stellt eine der häufigsten chronisch gastrointestinalen Erkrankungen dar. Es handelt sich um eine genetisch bedingte Erkrankung, bei der der Körper das in vielen Getreidesorten enthaltene Gluten nicht verarbeiten kann. Nahezu alle Zöliakie-Patienten sind Träger von HLA-DQ2 (HLA-DQA1*05 und HLADQB1*02) oder HLA-DQ8 (HLA-DQB1*03:02, häufig in Kombination mit DQA1*03). Wenn kein DQ2 und DQ8 nachgewiesen werden kann, kann mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95% eine Glutenunverträglichkeit ausgeschlossen werden.

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kit beinhaltet zwei spezifische Primer, die die Zielsequenz flankieren und zwei Hydrolysesonden (TaqMan Sonden), die spezifisch in der Region der Mutation binden. Die beiden Hydrolysesonden sind am 5' Ende mit unterschiedlichen Fluorophoren (Reporter Farbstoffen) markiert, welche für die Unterscheidung der Allele genutzt werden. Am 3' Ende sind die Sonden mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert. Die Nähe des Reporter Farbstoffes zu dem Quencher inhibiert die Fluoreszenz des Reporter-moleküls.

Während der Amplifikation binden die Sonden spezifisch an die DNA Fragmente. Die 5' Nukleaseaktivität der Polymerase spaltet die hybridisierten Sonden, wodurch der Reporter vom Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal generiert wird.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KF190532) oder 96 (KF190596) Reaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Enzymmix	blau	1 x 1313 µl	2 x 1970 µl
Detektionsmix 1 (DQA1*05)	gelb	1 x 210 µl	1 x 630 µl
Detektionsmix 2 (DQB1*02)	braun	1 x 210 µl	1 x 630 µl
Detektionsmix 3 (DQB1*03:02)	lila	1 x 210 µl	1 x 630 µl
Detektionsmix IC	weiß	1 x 473 µl	1 x 1419 µl
Positive Kontrolle 1 (DQA1*05/DQB1*02)	rot	1 x 30 µl	1 x 90 µl
Positive Kontrolle 2 (DQB1*03:02)	orange	1 x 15 µl	1 x 45 µl
Negative Kontrolle	grün	1 x 150 µl	1 x 150 µl

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Roche LightCycler® 2.0 Real-Time-PCR-System
 - *Die CE Konformität besteht nur mit diesem Gerät.*
- Roche LightCycler® Kapillaren
- Roche LightCycler® Cooling Block
 - **Oder:** Offenes Real-Time-PCR-System (mit Platten/Streifen oder Tubes)
 - Sterile PCR Reaktionsgefäße oder 96-well Platten/Streifen (weiß)
 - Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Pipetten (variable Volumina) und sterile Einweg-Spitzen mit Filter
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kits erfolgt gefroren auf Trockeneis oder Kühlakkus. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei mindestens -20 °C zu lagern. Mehrfache Frier-Auftau-Zykeln sind zu vermeiden (wenn nötig, Aliquots herstellen). Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Schützen Sie die Detektionsmische unbedingt während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.

- Alle Proben müssen als potentiell infektiös und/oder biogefährdend betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Die Real-Time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Bei Verwendung der Kitkomponenten sind stets puderfreie Einmal-schutzhandschuhe zu tragen.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.
- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.
- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.

- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierten Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet, den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Alle PCR-Reagenzien während des Arbeitens kühlen.
- Die Reinheit (A260/A280) der genomischen DNA sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen

8 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR-Kit ist genomische DNA, die mittels eines geeigneten Extraktionskits aus klinischen Proben (Blut) isoliert wurde.

9 REAL-TIME-PCR

9.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-Time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf alle Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Vor jedem Gebrauch müssen alle Reagenzien schonend aufgetaut, gründlich gemischt (nicht vortexen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Die Detektionsmixe vor Lichteinwirkung schützen.
- Wir empfehlen, die Reagenzien und den Ansatz während des Arbeiten stets in einem Kühlblock (+4 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

9.2 Durchführung

Für die Amplifikation werden drei Reaktionsgefäße (LightCycler® Kapillaren) pro Probe und zwei zusätzliche Reaktionsgefäße pro Master Mix für die negative und die positive Kontrolle benötigt. Die folgende Tabelle zeigt die zu pipettierenden Volumina pro Probe. Für die Analyse wird empfohlen ein Master Mix für die Anzahl an Proben (inkl. negativer und positiver Kontrollen) (N) plus 10% herzustellen, um Ungenauigkeiten auszugleichen. Die Master Mixe werden wie in den Tabellen 2, 3 und 4 beschrieben pipettiert:

Master Mix 1 (DQA1*05)

Tabelle 2: Herstellung des Master Mix 1 DQA1*05

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 1 (gelb)	6 µl	6 µl * (N + (N * 0,1))
Dektionsmix IC (weiß)	4,5 µl	4,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzymmix (blau)	12,5 µl	12,5 µl * (N + (N * 0,1))

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 1 (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Master Mix 2 (DQB1*02)

Tabelle 3: Herstellung des Master Mix DQB1*02

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 2 (braun)	6 µl	6 µl * (N + (N * 0,1))
Dektionsmix IC (weiß)	4,5 µl	4,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzymmix (blau)	12,5 µl	12,5 µl * (N + (N * 0,1))

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 1 (**rot**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Master Mix 3 (DQB1*03:02)

Tabelle 4: Herstellung des Master Mix DQB1*03:02

Reagenz	Volumen pro 25 µl - Reaktionsansatz	Master-Mix-Volumen
Detektionsmix 3 (lila)	6 µl	6 µl * (N + (N * 0,1))
Dektionsmix IC (weiß)	4,5 µl	4,5 µl * (N + (N * 0,1))
Enzymmix (blau)	12,5 µl	12,5 µl * (N + (N * 0,1))

- Den Master Mix vorsichtig durch auf- und abpipettieren oder durch invertieren durchmischen und kurz anzentrifugieren.
- In jedes Reaktionsgefäß **23 µl** des Master Mix vorlegen.
- Für die negative Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten negativen Kontrolle (**grün**) dazugeben.
- Für die positive Kontrolle **2 µl** von der mitgelieferten positiven Kontrolle 2 (**orange**) dazugeben.
- Für die zu analysierenden Proben jeweils **2 µl** der extrahierten genomischen DNA in das entsprechende Reaktionsgefäß dazugeben.

Die Kapillaren mit den Deckeln verschließen, in das LightCycler® Karussell überführen und in der LightCycler® Zentrifuge abzentrifugieren (sollte eine Tischzentrifuge verwendet werden die Kapillaren in den Einsätzen des Cooling Blocks bei 3000 rpm für 15 s zentrifugieren). Anschließend das Karussell in den LightCycler® überführen und das unter 9.3 beschriebene PCR Programm starten.

9.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-Time-PCR das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 5: Real-Time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Heizrate	Zyklen	Acquisition
Initiale Denaturierung	120 s	94 °C	max.	1	keine
Denaturierung	10 s	94 °C	max.	45	keine
Primer Anlagerung und Elongation	50 s	60 °C	max.		Single
Kühlen	30 s	40 °C	max.	1	-

10 ANALYSE DER ERGEBNISSE

Das HLA DQ 2+8 PCR Real-Time Kit detektiert das Vorliegen der HLA Allele DQA1*05, DQB1*02 und DQB1*03:02. Die entsprechenden TaqMan Sonden für die drei Allele sind FAM (**510 nm, grün**) markiert. Wenn die HLA-Allele nicht vorliegen, findet keine Amplifikation statt und es wird somit keine Fluoreszenz von der FAM-markierten TaqMan Sonde detektiert. Um in diesem Fall eine erfolgreiche PCR zu gewährleisten, ist eine interne Amplifikationskontrolle (IC) in die PCR eingearbeitet. Die TaqMan Sonde für die interne Amplifikationskontrolle ist markiert mit YAK (**555 nm, gelb**) und sollte immer ein Fluoreszenzsignal geben.

Entsprechend des Genotyps können folgende Resultate erzielt werden:

1. HLA-Allel ist vorhanden:

Anstieg des Fluoreszenzsignals von der **FAM** markierten TaqMan Sonde und Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK** markierten TaqMan Sonde.

2. HLA-Allel ist nicht vorhanden:

Kein Anstieg des Fluoreszenzsignals von der **FAM** markierten TaqMan Sonde, Anstieg des Fluoreszenzsignals der **YAK** markierten TaqMan Sonde.

Die Auswertung der Amplifikationskurven (Bestimmung der Crossing Points) wird mit einer Analyse des Typs „Absolute Quantifikation“ vorgenommen. Die Ergebnisse der Analyse für die HLA-Allele DQA1*05, DQB1*02 und DQB1*03:02 werden bei **510 - 530 nm / grün** und für die IC bei **550 - 570 nm / gelb** analysiert. Verwenden Sie ein geeignetes Color Compensation File.

Die folgenden Abbildungen zeigen die typischen Ergebnisse für den Nachweis des HLA-Allels **DQA1*05**: **grüne Kurve** - negative Kontrolle, **dunkelblaue Kurve** - DQA1*05 nicht detektiert, **blaue Kurve** - DQA1*05 detektiert.

FAM (510 - 530 nm / grün) - Nachweis des A-Allels DQA1*05

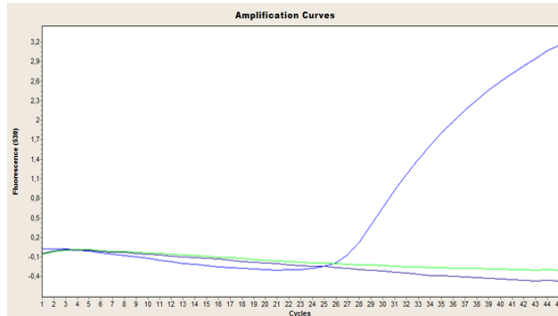


Abb. 1: Auswertung zu HLA DQA1*05

YAK (550 - 570 nm / gelb) - Interne Amplifikationskontrolle

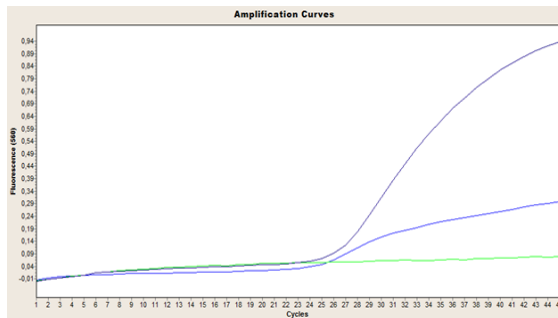


Abb. 2: Auswertung zu HLA DQA1*05- Interne Amplifikationskontrolle.

Die folgenden Abbildungen zeigen die typischen Ergebnisse für den Nachweis des HLA-Allels **DQB1*02**: **graue Kurve** - negative Kontrolle, **lila Kurve** - DQB1*02 nicht detektiert, **dunkelblaue Kurve** - DQB1*02 detektiert.

FAM (510 - 530 nm / grün) - Nachweis des Allels DQB1*02

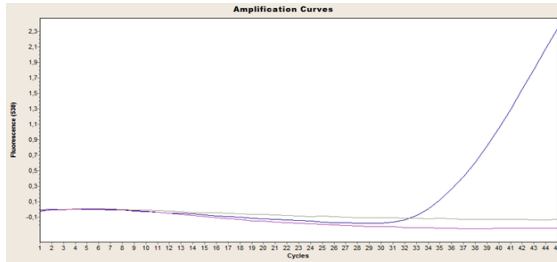


Abb. 3: Auswertung zu HLA DQB1*02.

YAK (550 - 570 nm / gelb) - Interne Amplifikationskontrolle

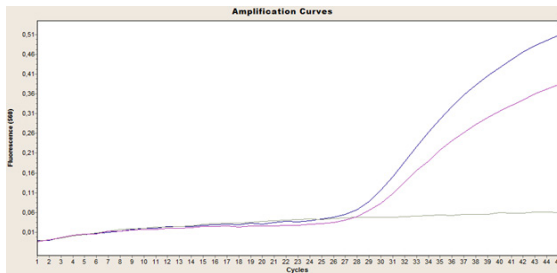


Abb. 4: Auswertung zu HLA DQB1*02 - Interne Amplifikationskontrolle.

Die folgenden Abbildungen zeigen die typischen Ergebnisse für den Nachweis des HLA-Allels **DQB1*03:02: rote Kurve** - negative Kontrolle, **türkise Kurve** - DQB1*03:02 nicht detektiert, **blaue Kurve** - DQB1*03:02 detektiert.

FAM (510 - 530 nm / grün) - Nachweis des Allels DQB1*03:02

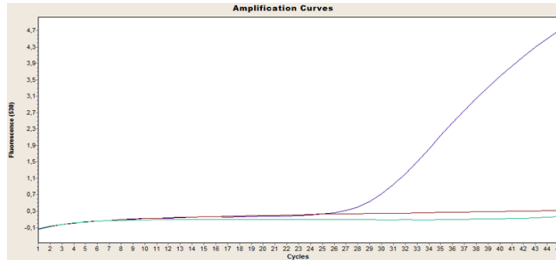


Abb. 3: Auswertung zu HLA DQB1*03:02

YAK (550 - 570 nm / gelb) - Interne Amplifikationskontrolle

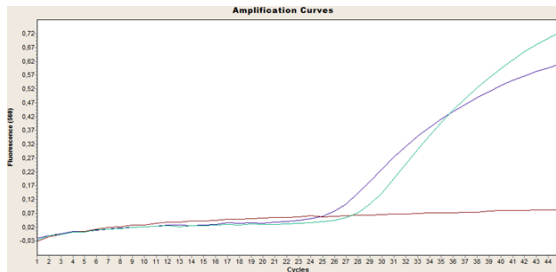


Abb. 4: Auswertung zu HLA DQB1*03:02 - Interne Amplifikationskontrolle.

Die mitgelieferte Positivkontrolle 1 (**rot**) enthält ein Template, das für die Allele DQA1*05 und DQB1*02 positiv ist. Die mitgelieferte Positivkontrolle 2 (**orange**) enthält ein Template, das für das Allel DQB1*03:02 positiv ist.

11 PROBLEMBEHANDLUNG

Folgende Problembeschreibung soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-Time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik AG.

Keine Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben bei 510 nm - 530 nm oder 555 - 560 nm:

Überprüfung des PCR Programms des Real-Time-PCR Systems und Wiederholung der Analyse mit dem korrigierten Protokoll.

Der Detektions Mix wurde mehr als zwei Gefrierzyklen unterzogen oder wurde länger als vier Tage bei 2-8 °C gelagert. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuem Detektions Mix.

Die Qualität der Ausgangs-DNA ist nicht ausreichend. Nutzen Sie frisch extrahierte DNA und bestimmen Sie die Konzentration/Reinheit vor der Nutzung.

Der Detektions Mix wurden nicht vor Lichteinwirkung geschützt. Wiederholen Sie die Analyse mit einem frischen Aliquot oder neuen PCR Reagenzien.

Geringe Fluoreszenz bei der Positivkontrolle oder den Proben bei 510 nm - 530 nm oder 555 - 560 nm:

Einzelne Komponenten vor Gebrauch sorgfältig mischen (nur durch mehrmaliges pipettieren - nicht vortexen!)

Alle Stammlösungen während der Arbeitsschritte in geeigneter Weise kühlen und die Detektionsmische vor Lichteinstrahlung schützen.

Auf Eis oder mit einem gekühlten Block (4 °C) arbeiten.





12 GRENZEN DES TESTS





Das Ergebnis wird dem behandelnden Arzt als unterstützendes Material zur Verfügung gestellt und sollte niemals ausschließlich zur Diagnostik oder zu Behandlungsempfehlungen herangezogen werden. Die Diagnose sowie die einzuleitenden Behandlungsentscheidungen bleiben in der vollen Verantwortung des Arztes.

Die Genauigkeit von genetischen Tests beträgt nicht 100%. Es wurde jedoch eine Genauigkeit von über 98% basierend auf den Validierungsdaten für diesen Test festgestellt. Weiterhin müssen Ergebnisse von genetischen Tests im Kontext der klinischen Repräsentation des Patienten sowie bekannten familiären Risiken im Umfeld des Patienten betrachtet werden.

Der Test analysiert nur eine Auswahl an Markern. Daher schließt ein negatives Testergebnis des Patienten ein Risiko jedweder Art nicht vollständig aus.

13 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure		Katalognummer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Zu verwenden mit
	Enzymmix		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

DETECTION MIX 1	Detektionsmix 1		Obere Temperaturgrenze
DETECTION MIX 2	Detektionsmix 2		Hersteller
DETECTION MIX 3	Detektionsmix 3	LOT	Chargennummer
DETECTION MIX IC	Detektionsmix IC		Arbeitsanleitung beachten
CONTROL 1 +	Positive Kontrolle 1		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT
CONTROL 2 +	Positive Kontrolle 2	IVD	<i>In-vitro</i> Diagnostikum
CONTROL -	Negative Kontrolle	CONTENT	Inhalt

14 LITERATUR

1. Solberg et al., Hum Immunol, 2008

MutaPLATE[®] HLA DQ 2+8 (TM)

Real-Time-PCR Kit

*For the analysis of the HLA-alleles DQA1*05,
DQB1*02 und DQB1*03:02/*03:05*

Valid from 2022-02-23



KF190532
KF190596



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	17
2	INTRODUCTION	17
3	PRINCIPLE OF THE TEST	17
4	PACKAGE CONTENTS	17
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	18
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	18
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	18
8	SAMPLE MATERIAL	19
9	REAL-TIME-PCR	19
	9.1 <i>Important points before starting</i>	19
	9.2 <i>Procedure</i>	20
	9.3 <i>Instrument settings</i>	22
10	DATA ANALYSIS	22
11	TROUBLESHOOTING	26
12	LIMITATIONS OF THE METHOD	26
13	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	27
14	LITERATURE	27

1 INTENDED USE

The MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time PCR Kit is a molecular biological assay for the detection of the HLA alleles DQA1*05, DQB1*02¹ and DQB1*03:02/*03:05^{2,3} based on the TaqMan-technology.

¹ The number of copies of DQB1*02 is not determined by this method.

² Due to sequence homologies this method cannot differentiate between DQB1*03:02 and DQB1*03:05. However, the frequency of DQB1*03:05 is very low, about 0.4% in the Caucasian population, whereas DQB1*03:02 has a frequency of about 15% (<http://www.allelefreqencies.net>, Nov. 2018). Worldwide the frequency of DQB1*03:05 is 0.07% and the frequency of DQB1*03:02 is 11.5% (Solberg et al., Hum Immunol, 2008).

³ The detection of other very rare alleles cannot be completely excluded.

2 INTRODUCTION

Celiac disease / gluten intolerance is one of the most frequent chronic gastrointestinal diseases. It is a genetic disease, in which the body is not able to process the gluten present in many cereals. Almost all celiac disease patients are carrier of HLA-DQ2 (HLADQA1*05 and HLA-DQB1*02) or HLA-DQ8 (HLA-DQB1*03:02, often in combination with DQA1*03). If DQ2 and DQ8 are not detected, celiac disease can be excluded with a probability of over 95%.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time PCR Kit contains two sequence specific primers flanking the region of interest and two TaqMan probes specific to the region containing the mutation. The two TaqMan probes are labeled at the 5' end with different fluorophores (reporter dyes) which are used for the allelic discrimination. On the 3' end the TaqMan probes are labeled with a non-fluorescent quencher. The proximity of the reporter dye to the quencher inhibits the fluorescence of the reporter molecule. During amplification the probes hybridize specifically to the DNA fragments. The 5' nuclease activity of the polymerase cleaves the hybridized probes releasing the reporter from the quencher generating a fluorescent signal.

4 PACKAGE CONTENTS

The components supplied are sufficient for the preparation of 32 (KF190532) or 96 (KF190596) reactions.

Table 1: Components of the MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) Real-Time-PCR Kit .

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Enzyme mix	blue	1 x 1313 µl	2 x 1970 µl
Detection mix 1 (DQA1*05)	yellow	1 x 210 µl	1 x 630 µl
Detection mix 2 (DQB1*02)	brown	1 x 210 µl	1 x 630 µl
Detection mix 3 (DQB1*03:02)	purple	1 x 210 µl	1 x 630 µl
Detection mix IC	white	1 x 473 µl	1 x 1419 µl
Positive control 1 (DQA1*05 / DQB1*02)	red	1 x 30 µl	1 x 990 µl
Positive control 2 (DQB1*03:02)	orange	1 x 15 µl	1 x 45 µl
Negative control	green	1 x 150 µl	1 x 150 µl

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA extraction kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Roche LightCycler® 2.0 real-time PCR system
 - *The CE conformity is only given with this instrument.*
- Roche LightCycler® capillaries
- Roche LightCycler® Cooling Block
 - **Or:** Open real-time PCR system (with plates/strips or tubes)
 - Sterile PCR reaction tubes or 96-well plate/strips (white)
 - Sterile reaction tubes
- Calibrated pipettes (variable volumes) and sterile disposable tips with filter
- Optional: Liquid handling system for automation

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) real-time PCR kit is transported frozen on dry ice or cool packs. All components are to be stored protected from light at a minimum of -20 °C immediately after receipt. Avoid multiple freeze-thaw cycles (make aliquots if necessary). Do not use after the expiry date indicated on the package.

Be sure to protect the detection mixes from direct sunlight during the entire test procedure.

7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

Read the instructions for use carefully before using the product.

- All samples must be considered potentially infectious and/or biohazardous and all items that come into contact with the specimens must be considered potentially contaminated.
- Real-time PCR must be performed in laboratories suitable for this purpose and by specially trained personnel.
- The assay must always be carried out according to the instructions supplied with the kit.
- Areas for sample preparation and preparation of the PCR master mix should be strictly separated.
- Pipettes, tubes and other working materials must not circulate from one area to the other.
- Always use pipette tips with filters.
- Always wear powder-free disposable gloves when using the kit
- Clean pipettes and work surfaces regularly with suitable decontamination solution (no ethanol-containing agents).
- Contamination of eluates and kit components with microbes or nucleases (RNAs and DNAses) should be avoided.
- Positive and potentially positive material must be kept separate from all other kit components at all times.
- Do not open reaction tubes/plates after amplification in order to avoid contamination.
- In accordance with guidelines or requirements of local, state or federal regulations or authorised organisations, additional controls may be tested.
- Do not autoclave reaction tubes after PCR as this will not degrade the amplified nucleic acid and risks contaminating the laboratory area.
- Dispose of samples and test waste according to your local safety regulations.
- Refrigerate all PCR reagents while working.
- The purity (A260/A280) of the genomic DNA should be between 1.8 and 2.0.

8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLATE® HLA DQ 2+8 (TM) real-time PCR kit is genomic DNA isolated from clinical samples (blood) using a suitable extraction kit.

9 REAL-TIME-PCR

9.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.

- Before setting up the Real-Time-PCR familiarise yourself with the Real-Time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run all Positive Controls and one Negative Control should be included.
- Before each use, all reagents must be gently thawed, thoroughly mixed (do not vortex) and briefly centrifuged.
- Protect the detection mixes from exposure to light.
- We recommend always cooling the reagents and the preparation in a cooling block (+4 to +8 °C) or on ice while working.

9.2 Procedure

For amplification, two reaction tubes are required per sample and two additional reaction tubes per master mix are required for the negative and the positive control. The following tables show the volumes to be pipetted per sample. For the analysis it is recommended to prepare a master mix for the number of samples (incl. negative and positive control) (N) plus 10 % to compensate for inaccuracies. The master mixes are pipetted as described in tables 2, 3 and 4:

Master mix 1 (DQA1*05)

Table 2: Preparation of master mix 1 (DQA1*05)

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 1 (yellow)	6 µl	6 µl * (N + (N * 0.1))
Detection mix IC (white)	4.5 µl	4.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme mix (blue)	12.5 µl	12.5 µl * (N + (N * 0.1))

- Mix the Master Mix carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Master Mix to each capillary.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (**green**).
- For the positive control add **2 µl** of the supplied positive control 1 (**red**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding capillary.

Master mix 2 (DQB1*02)

Table 3: Preparation of master mix 2 (DQB1*02)

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 2 (brown)	6 µl	6 µl * (N + (N * 0.1))
Detection mix IC (white)	4.5 µl	4.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme mix (blue)	12.5 µl	12.5 µl * (N + (N * 0.1))

- Mix the Master Mix carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Master Mix to each capillary.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (**green**).
- For the positive control add **2 µl** of the supplied positive control 1 (**red**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding capillary.

Master mix 3 (DQB1*02)

Table 4: Preparation of master mix 2 (DQB1*02)

Reagent	Volume per 25 µl - reaction mix	Master mix volume
Detection mix 3 (purple)	6 µl	6 µl * (N + (N * 0.1))
Detection mix IC (white)	4.5 µl	4.5 µl * (N + (N * 0.1))
Enzyme mix (blue)	12.5 µl	12.5 µl * (N + (N * 0.1))

- Mix the Master Mix carefully by pipetting up and down or by inverting and centrifuge briefly.
- Add **23 µl** of the Master Mix to each capillary.
- For the negative control add **2 µl** of the supplied negative control (**green**).
- For the positive control add **2 µl** of the supplied positive control 2 (**orange**).
- For each sample to be analysed, add **2 µl** of the extracted genomic DNA to the corresponding capillary.

Close the capillaries with the corresponding lids, transfer them into the LightCycler® carousel and spin them down in the LightCycler® centrifuge (if a table top centrifuge is used, spin the capillaries in the adapters of the cooling block at 3000 rpm for 15 s).

Subsequently place the carousel in the LightCycler® and use the PCR protocol described in 9.3.

9.3 Instrument settings

For the Real-Time-PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: Real-Time-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	Ramp rate	Cycles	Acquisition
Initial Denaturation	120 s	94 °C	max.	1	none
Denaturation	10 s	94 °C	max.	45	none
Primer annealing and elongation	50 s	60 °C	max.		single
Cooling	30 s	40 °C	max.	1	-

10 DATA ANALYSIS

The HLA DQ 2+8 PCR Real-Time kit detects the presence of the HLA alleles DQA1*05, DQB1*02 and DQB1*03:02. The corresponding TaqMan probe for the three alleles is labeled with FAM (**510 nm, green**). If no HLA allele is present, no amplification occurs and therefore no fluorescence of the FAM-labeled TaqMan probe is detected. To ensure in this case that the PCR was correctly carried out and an internal amplification control (IC) is included into the PCR. The TaqMan probe for the internal amplification control is labeled with YAK (**555 nm, yellow**) and should always give a signal.

Corresponding to the genotype the following results can be achieved:

1. HLA allele present:

Increase of the fluorescence signal of the **FAM**-labeled TaqMan probe and increase of the fluorescence signal of the **YAK**-labeled TaqMan probe.

2. HLA allele is not present:

No increase of the fluorescence signal of the **FAM**-labeled TaqMan probe and increase of the fluorescence signal of the **YAK**-labeled TaqMan probe.

The evaluation of the amplification curves (determination of the crossing points) is done by adding an analysis of the type "absolute quantification". The results of the analysis for the HLA alleles DQA1*05, DQB1*02 and DQB1*03:02 are analysed at **510 - 530 nm / green** and for the IC at **550 - 570 nm / yellow**. Please use a corresponding color compensation file.

The following figures show the representative results for the detection of the HLA allele **DQA1*05**: **green curve** - negative control, **dark blue curve** - DQA1*05 not detected, **blue curve** - DQA1*05 detected.

FAM (510 - 530 nm / green) - detection of the allele DQA1*05

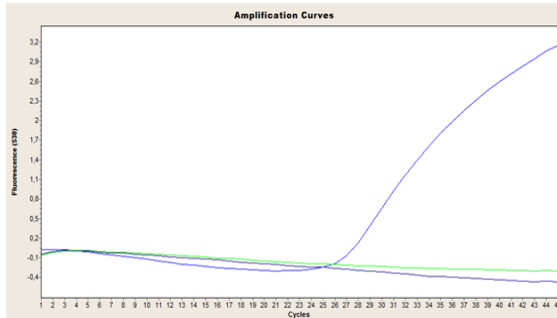


Fig. 1: Evaluation of HLA DQA1*05

YAK (550 - 570 nm / yellow) - internal amplification control

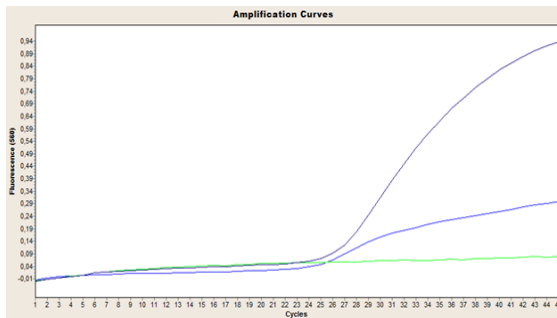


Fig. 2: Evaluation of HLA DQA1*05 - internal amplification control

The following figure shows the representative results for the detection of the HLA allele **DQB1*02**: **grey curve** - negative control, **violet curve** - DQB1*02 not detected, **dark blue curve** - DQB1*02 detected.

FAM (510 - 530 nm / green) - detection of the allele DQB1*02

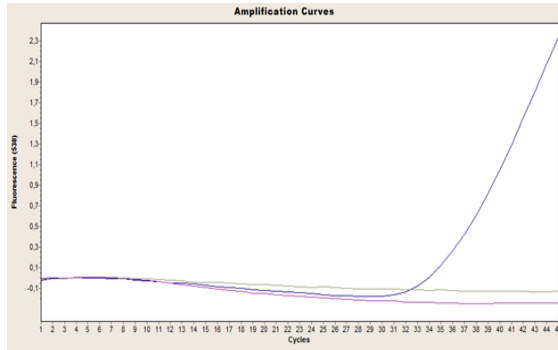


Fig. 3: Evaluation of HLA DQB1*02

YAK (550 - 570 nm / yellow) - internal amplification control

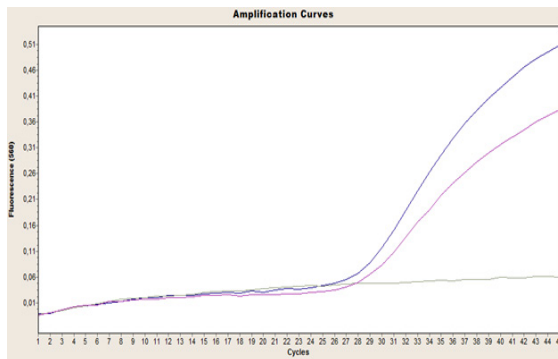


Fig. 4: Evaluation of HLA DQB1*02 - internal amplification control

The following figure shows the representative results for the detection of the HLA allele **DQB1*03:02**: **red curve** - negative control, **turquoise curve** - DQB1*03:02 not detected, **blue curve** - DQB1*03:02 detected.

FAM (510 - 530 nm / green) - detection of the allele DQB1*03:02

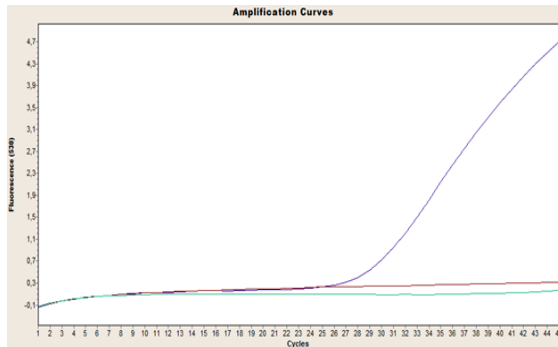


Fig. 5: Evaluation of HLA DQB1*03:02

YAK (550 - 570 nm / yellow) - internal amplification control

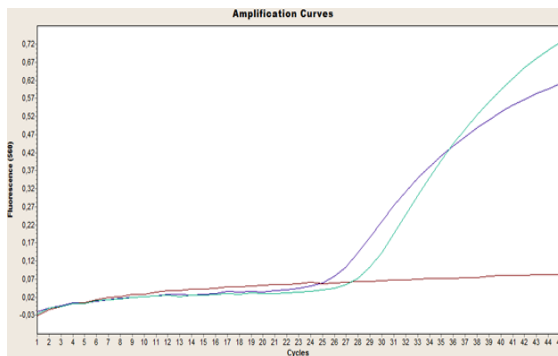


Fig. 6: Evaluation of HLA DQB1*03:02 - internal amplification control

The provided Positive Control 1 (**red**) contains a template, which is positive for the alleles DQA1*05 and DQB1*02. The provided Positive Control 2 (**orange**) contains a template, which is positive for the allele DQB1*03:02.

11 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a Real-Time-PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on info@immundiagnostik.com.

No fluorescence peak in the positive control or samples at about 510-530 nm or 550-560 nm.

Check the PCR programme of the real-time PCR system and repeat the analysis with the corrected protocol.

Detection mixes have been subjected to more than two freeze cycles or have been stored at 2-8 °C for more than four days. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new detection mix.

The quality of the starting DNA is not sufficient. Use freshly extracted DNA and determine the concentration/purity before use.

The detection mixes were not protected from light exposure. Repeat the analysis with a fresh aliquot or new PCR reagents.

Low fluorescence peak at about 510-530 nm or 555-560 nm

Mix individual components carefully before use (only by pipetting several times - do not vortex!).

Cool all stock solutions appropriately during the working steps and protect the detection mixes from light irradiation.

Work on ice or with a cooled block (4 °C).











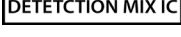







12 LIMITATIONS OF THE METHOD

The result is provided to the treating physician as supporting material and should never be used exclusively for diagnosis or treatment recommendations. The diagnosis as well as the treatment decisions to be taken remain the full responsibility of the physician.

The accuracy of genetic tests is not 100%. However, it has been found to be over 98% accurate based on validation data for this test. Furthermore, genetic test results must be considered in the context of the patient's clinical representation and known familial risks in the patient's environment.

The test only analyses a selection of markers. Therefore, a negative test result of the patient does not completely exclude a risk of any kind.

13 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleic acid		Catalog number
PCR	Polymerase chain reaction		To be used with
	Enzyme mix		Contains sufficient for <n> test
	Detection mix 1		Upper limit of temperature
	Detection mix 2		Manufacturer
	Detection mix 3		Lot number
	Detection mix IC		Consult instructions for use
	Positive control 1		Use by YYYY-MM-DD
	Positive control 2		<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Negative control		Content

14 LITERATURE

1. Solberg et al., Hum Immunol, 2008

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

