9.4 Checkliste Immungenetik

C. Seidl, J. Mytilineos, E. Petershofen

1 Anwendungsbereich **3**
4 Anforderungen an das Management **3**
5 Technische Anforderungen **6**
Annex A: HLA-Allele und Antigene **12**
Familienuntersuchungen 13
Unverwandte Individuen 14
Annex B: Serologische HLA-Klasse I und -Klasse II Typisierung **14**
HLA-DR,-DQ und –DP Antigene 15
HLA-Klasse I und –Klasse II Typisierungstechniken 15
Komplement 17
Annex C: HLA-Antikörperscreening **18**
Technische Vorraussetzungen 18
Panelzellen 19
Antikörperscreening mittels Komplement-vermittelter Zytotoxizität 19
Antikörperscreening mittels Durchflußzytometrie 20
Antikörperscreening mittels ELISA 20
Annex D: Nieren- und Pankreastransplantation **20**
Antikörperscreening 20
Crossmatch (lymphozytäre Kreuzprobe) 21
Serumproben 22
HLA-Typisierung 23
Lebend/Verwandten-Transplantation 23
Leichenspender 23
Annex E: Sonstige Organtransplantation **24**
Annex F: Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation **25**
Knochenmarkspenderdateien 26
Unverwandte Knochenmarkspender 27
Annex G: Thrombozyten- und Granulozytentransfusion **28**

Annex H: Krankheitsassoziation **28**
Bestimmung eines Einzelantigens (z.B. HLA-B27) 28
Annex I: Nukleinsäureanalyse **29**
HLA-DNA-Analysen durch Amplifikationstechniken 29
Typisierung mittels Hybridisierung von Amplifikaten mit DNA-Sonden (SSO) 34
DNA-Sequenzierung 36
Typisierungsverfahren mit Primerverlängerung 36
Typisierung mittels Sequenz-spezifischer Amplifikation (SSP) 39
Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) 41
Andere Verfahren 42
Annex J: Durchflußzytometrie **42**
Durchflusszytometrische Crossmatch Testung / Antikörperscreening 44
Antikörperscreening mittels Mikropartikel 44
HLA-Typisierung mittels Durchflußzytometrie 46
Annex K: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) **48**
Annex L: Abstammungsuntersuchungen **50**

1 Anwendungsbereich			

Fragen in diesem Abschnitt betreffen alle Bereiche der Immungenetik und sollen bei Akkreditierungen für medizinisch-diagnostisch Laboratorien Anwendung finden, die in diesem Gebiet tätig sind. Die Fragen sind von der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI) erarbeitet worden und beruhen auf den Standards der europäischen Fachgesellschaft für Immungenetik (EFI). Für die Bereiche Nieren- und Pankreastransplantation, sonstige Organtransplantationen und Blutstammzelltransplantationen sowie Knochenmarkspendertypisierungen im Rahmen von nationalen/internationalen Organisationen wird auf die Anforderungen eines zusätzlichen Akkreditierungsverfahrens über die EFI verwiesen.

Siehe auch: Checklisten für Medizinische Laboratorien

Checkliste Immunhämatologie und Transfusionsmedizin

4 Anforderungen an das Management			

4.5	**Untersuchungen durch Auftragslaboratorien**			

		U	**O**	**Bemerkungen**
4.5.1	Erfüllen die Unterauftragnehmer die geforderten Qualitätskriterien ? _____ **Liegt eine Akkreditierung für die durchgeführten immungenetischen Laboruntersuchungen des Unterauftragnehmers vor?**			
4.5.2	**Erfolgt eine Kennzeichnung der Ergebnisse, die durch das Unterauftragnehmerlaboratorium ermittelt werden?**			

4.8	**Klärung von Beschwerden**			

		U	O	Bemerkungen
4.8.1	**Erfolgt bei Reklamationen und Beschwerden eine eingehende Untersuchung des Vorfalles um korrigierende und präventive Maßnahmen vorzunehmen ?**			

4.11	**Vorbeugende Massnahmen**			

		U	O	Bemerkungen
4.11.1	**Erfolgt eine Bewertung und Dokumentation der Reklamationen und Umsetzung von korrigierenden und präventiven Maßnahmen ?**			
4.11.2	**Werden diese Unterlagen für mindestens zwei Jahre aufbewahrt?**			
4.11.3	**Werden die Ergebnisse von Qualitätssicherungsmaßnahmen eingehend mit den Mitarbeitern besprochen ?**			

4.13	**Qualitätsaufzeichnungen**			

		U	O	Bemerkungen
4.13.1	**Werden Unterlagen über die internen und externen Qualitätskontrollen aufbewahrt ?**			
4.13.2	**Entspricht die Aufbewahrung von Befunden (Log-Büchern, Arbeitslisten, Testergebnisse) den Vorgaben?**			
4.13.3	**Enthalten die Arbeitsprotokolle folgende Angaben:** ❑ **Identität der Probe** ❑ **Reagenzien (Charge)** ❑ **Methode** ❑ **Untersuchungsdatum** ❑ **Name des durchführenden Mitarbeiters**			

		U	O	Bemerkungen
4.13.4	**Erfolgt bei serologischen Untersuchungen mittels Komplement-vermittelter Zytolyse eine Bewertung des prozentualen Anteils der lysierten Zellen ?**			
4.13.5	Wird hierbei die Internationale Workshop Bewertungsskala (0,1,2,4,6,8) verwendet oder andere numerische Skalen ? _____ _____			
4.13.6	**Wird die Art des verwendeten Untersuchungsmaterial (z.B. Blut, Lymphknoten oder Knochenmark) dokumentiert ?**			
4.13.7	Ist bei elektronisch gespeicherten Befunde sichergestellt, dass ein Computer-Back-Up vorhanden ist?			
4.13.8	**Erfolgt die Archivierung der Ergebnisse von Knochenmark/Blutstammzellspender dergestalt, dass ein schneller und zuverlässiger Zugriff auf die Daten gewährleistet ist ?**			

5 Technische Anforderungen			

5.1	**Personal**			

		U	O	Bemerkungen
5.1.1	**Besitzt der verantwortliche Laborleiter und dessen Vertreter die erforderliche Qualifikation** ❑ **Laborleiter** ❑ **Vertreter** Der Laborleiter/Vertreter soll ein promovierter Humanmediziner oder Naturwissenschaftler mit 1) mindestens 4 jähriger Erfahrung auf dem Gebiet der Immunologie oder Zellbiologie sein. Davon sollten 2 Jahre dem Schwerpunkt Histokompatibilität und Immungenetik gewidmet sein. **2)** oder 5 jähriger Arbeitserfahrung im Bereich Histokompatibilität und Immungenetik. **3)** Der Laborleiter soll über ausgewiesene Erfahrungen in den Arbeitsbereiches des Laboratoriums verfügen. Diese sollte eingehende Kenntnisse der immunologischen Grundlagen, der Genetik und der Histokompatibilitätstestung umfassen. Die Kenntnisse sollten weiterhin durch Teilnahme an nationalen oder internationalen Histokompatibilitätsworkshops oder Publikationen in begutachteten Zeitschriften nachgewiesen sein.			
5.1.2	**Besitzt das technische Personal das erforderliche Fachwissen ?** Gibt es eine fachkompetente leitende MTA, die mindestens drei Jahre Erfahrung im Bereich der Histokompatibilitätstestung hat ? Gibt es eine ausreichende Zahl technischer Mitarbeiter, die über mindestens ein Jahr Erfahrung im Bereich der Histokompatibilitätstestung verfügen ?			

		U	O	Bemerkungen
5.1.3	**Ist die Zahl der Mitarbeiter ausreichend zur Durchführung der analytischen Anforderungen?**			
5.1.4	**Erfolgt mindestens einmal jährlich durch den Laborleiter eine Überprüfung der Qualifikation (Autorisierung) der Mitarbeiter ?**			
5.1.5	**Werden regelmäßig Schulungen und Weiterbildungen in den relevanten immungenetischen Fachbereichen durchgeführt ?**			

5.2	**Räumlichkeiten und Umgebungsbedingungen**			

		U	O	Bemerkungen
5.2.1	**Ist genügend Laborraum vorhanden, um die Durchführung der Analysen fehlerfrei zu gewährleisten ?**			
5.2.2	**Werden die gesetzlichen Regelungen zur Arbeitssicherheit und technischen Ausstattung von Laborräumen eingehalten ?**			
5.2.3	**Werden die Prä-Amplifikationsschritte bei DNA-Analysen in einem streng getrennten Arbeitsbereich durchgeführt, für welchen Maßnahmen getroffen wurden, dass keine amplifizierte DNA vorhanden ist ?**			
5.2.4	**Werden die gesetzlichen Regelungen zum Umgang mit radioaktiven Stoffen eingehalten (z.B. Lagerung und Entsorgung) ?**			
5.2.5	**Liegt die vorgeschriebene Genehmigung für den Umgang mit Radioisotopen nach dem Strahlenschutzgesetz vor ?**			

5.3	**Laboratoriumsausrüstung**			

		U	O	Bemerkungen
5.3.1	**Entspricht die eingestellte Temperatur von Gefrierschränke/-truhen, Kühlschränke und Inkubatoren den Vorgaben zur Analytik bzw. Lagerung von Proben und Testreagenzien ?**			
5.3.2	**Werden die Temperaturen von Gefrierschränke/-truhen, Kühlschränke, Inkubatoren und Laborräumen mindestens arbeitstäglich kontrolliert und kontinuierliche Aufzeichnungen darüber geführt ?**			
5.3.3	Besteht ein zentraler Alarmanschluss, der eine 24stündige Temperaturüberwachung und Aufzeichnung ermöglicht ?			
5.3.4	**Wird der Vorrat an Flüssigstickstoff in den Vorratsbehältern von tiefgefrorenen Zellen regelmäßig überprüft ?**			
5.3.5	**Sind qualifizierte Werkbänke, die eine aseptische Durchführung von Zellkulturanalysen ermöglichen vorhanden ?**			
5.3.6	**Werden die Inkubatoren für Zellkulturansätze an jedem Arbeitstag entsprechend der vorgeschriebenen Temperatur (+37°C), CO_2 Konzentration (5%$\pm$1%) und Luftfeuchte überprüft ?**			
5.3.7	**Erfolgt eine regelmäßige Prüfmittelkontrolle ?** (z.B. durch Kalibrierpläne, in denen interne und externe Wartungsarbeiten und Funktionskontrollen festgelegt sind)			
5.3.8	**Erfolgt bei EDV-unterstützter Auswertung von Ergebnissen eine Dokumentation der Freigabe der Softwareprogramme bei Erstinstallation oder Softwareänderungen durch den Laborleiter ?**			
5.3.9	**Sind alle für die Diagnostik und Befunddokumentation relevanten Softwareprogramme validiert ?**			

5.4	**Präanalytische Maßnahmen**			

		U	O	Bemerkungen
5.4.1	**Sind Regelungen zum Probeneingang (Probeneingangskriterien) und zum Vorgehen bei der Entnahme von Untersuchungsmaterial in schriftlicher Form vorhanden ?**			
5.4.2	**Ist sichergestellt, dass ein Untersuchungsauftrag erst dann bearbeitet wird, wenn folgende Informationen vorhanden sind:** ❑ **Name des Patienten, Spenders oder eindeutige Identifikationsnummer der Probe** ❑ **Name und Adresse des Auftraggebers Datum der Probennahme** ❑ **Zeitpunkt der Probennahme, falls dies für die Untersuchung relevant sein sollte.** ❑ **Art des Untersuchungsmaterial (z.B. peripheres Blut, Knochenmark, Milz etc.)**			
5.4.3	**Wird das Probenmaterial eindeutig durch den Namen der zu untersuchenden Person oder einer Identifikationsnummer sowie dem Entnahmedatum beschriftet ?** **Wird jedes Röhrchen einzeln beschriftet?**			
5.4.4	**Erfolgt eine Dokumentation über die verschiedenen Schritte in der diagnostischen Bearbeitung und Ergebnisbeurteilung (Rückverfolgbarkeit der Laborergebnisse)?**			
5.4.5	**Sind Anforderungen an die Präanalytik vorhanden?**			
5.4.6	**Ist sichergestellt dass Proben, die <u>nicht</u> den Probeneingangskriterien oder präanalytischen Vorgaben entsprechen nicht untersucht werden?**			
5.4.7	**Werden alle Proben unter Beachtung der Regelungen zum Umgang mit potentiell infektiösem Material bearbeitet?**			

		U	O	Bemerkungen
5.4.8	**Sind die Einsender des Laboratoriums über die präanalytischen Kriterien (z.B. Beschriftung, Material, Transporttemperatur, Entnahmebedingungen) informiert*, die für die angebotene Untersuchung notwendig sind?** z.B. durch Darstellung der präanalytischen Kriterien in dem Leistungsverzeichnis			
5.4.9	**Liegt eine Liste der Untersuchungsverfahren vor, die dem Kunden zur Verfügung gestellt werden kann (z.B. Leistungsverzeichnis) ?**			
5.4.10	**Sind alle Reagenzien korrekt beschriftet und werden die vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen eingehalten ?**			
5.4.11	**Erfolgt die Beschriftung der Reagenzien, Kontroll- und Kalibriermaterialien mit** ❑ **Identität** ❑ **Bezeichnung des Inhaltes** ❑ **ggf. einschließlich des Titers und/oder der Konzentration** ❑ **Lagerungsbedingungen** ❑ **Herstellungs-, Anbruchs- und Verfallsdatum**			

5.5	**Analytische Verfahren**			

		U	O	Bemerkungen
5.5.1	**Erfolgt eine Überprüfung der durchgeführten Testverfahren ?**			5.5
5.5.2	**Existiert ein gelenktes Dokumentensystem für alle relevanten schriftlichen Anweisungen und werden alle Arbeits- und Methodenanweisungen mindestens einmal jährlich von dem Laborleiter überarbeitet ?**			
5.5.3	**Ist sichergestellt, dass alle Änderungen von Arbeits- und Methodenanweisungen durch den Laborleiter schriftlich mit Datum freigegeben werden ?**			

5.6	**Qualitätssicherung bei Untersuchungen**			

		U	O	Bemerkungen
5.6.1	**Nimmt das Labor in jeder Prüfart bzw. Prüfverfahren an entsprechend vorhandenen externen Ringversuchen teil ?**			
5.6.2	**Ist die Zahl der bestandenen Ringversuche ausreichend ?** **Wurde ggf. an weiteren Ringversuchen teilgenommen ?**			
5.6.3	**Erfolgt die Untersuchung von Ringversuchsproben analog zu der Untersuchung von Routineproben ?**			
5.6.4	**Nehmen alle technischen Mitarbeiter viermal jährlich an internen Ringversuchen in den verschiedenen Prüfverfahren teil ?** **Sind Aufzeichnungen einschließlich der Bewertung dieser internen Ringversuche vorhanden ?**			
5.6.6	**Wird ein Methodenvergleich durchgeführt, für den Fall dass für einen Testparameter verschiedene Methoden verwendet werden ?** **Erfolgt ein solcher Methodenvergleich auch unter Einbeziehung verschiedener Laborstandorte?**			
5.6.7	**Gibt es dokumentierte Verfahren, um Untersuchungsergebnisse zu erfassen, die nicht die relevanten Kriterien, wie z.B. die Patienteninformationen, erfüllen ?**			

5.8	**Ergebnismitteilung**			

		U	O	Bemerkungen
5.8.1	**Gibt es Regelungen zur Kundenzufriedenheit, die insbesondere folgende Punkte erfassen:** ❑ **Vorgehen bei Kommunikationsfehlern zwischen Einsender und Labor** ❑ **Beschwerden und Reklamationen von Seiten des Kunden**			
5.8.3	**Wird bei molekularbiologischen Untersuchungen eine Dokumentation entsprechend der durchgeführten Methodik (z.B. mittels Gelbild, Autoradiographie oder Sequenzausdruck) aufbewahrt?**			
5.8.4	**Werden Befunde in einer ausreichend zeitgerechten und zuverlässigen Weise erstellt und dem Einsender übermittelt ?** **(z.B. maximal 4 Wochen bei Knochenmarkspendertypsierungen)**			
5.8.5	**Enthalten die Endbefunde bei Familienuntersuchungen auch den Verwandtschaftsgrad der untersuchten Personen ?**			

A	**Annex A: HLA-Allele und Antigene**			

		U	O	Bemerkungen
A1.1	**Wird die aktuelle WHO-Nomenklatur verwendet?**			
A1.2	**Sind lokale Bezeichnungen eindeutig von der WHO-Nomenklatur zu unterscheiden?**			

		U	O	Bemerkungen
A1.3	**Werden Phänotypen und Genotypen entsprechend der Vorgaben des WHO-Nomenklaturkomitees gekennzeichnet und folgende Schreibweise verwendet:** ❑ **Einzelallele: z.B. HLA-B*07. Einzelantigene: HLA-B7 (oder B7 falls die Bezeichnung HLA eindeutig aus dem Befundergebnis zu erkennen ist)** ❑ **Serologischer HLA-Phänotyp: z.B. HLA-A2.30; B7,44; Cw5; DR1,4; DQ5,7** ❑ **Molekularbiologischer HLA-Phänotyp: z.B. HLA-A*02,*30; B*07,*44; Cw*05,*06; DRB1*01,*04; DQB1*05,*0301** ❑ **Serologischer HLA-Genotyp: z.B. HLA-A2, B44, Cw5, DR1, DQ5 / A30, D7, Cw-, DR4, DQ7.** ❑ **Molekularbiologischer HLA-Genotyp: z.B. HLA-A*02, B*44, Cw*05, DRB1*01, DQB1*05 / A*30, B*07, Cw*16, DRB1*04, DQB1*0302.**			
A1.4	**Erfolgt immer die Angabe des untersuchten Genortes (z.B. HLA-B, HLA-DRB1, etc) ?**			
A1.6	**Werden breite Antigene (‚Broad Antigens') einschließlich Bw4 und Bw6 in Klammern hinter dem zugehörigen Allel/Antigen angegeben ?**			
A1.7	**Aufgrund von serologischen oder molekulargenetischen Untersuchungsverfahren erhaltene Einzelantigene oder -Allele können nur dann biallel (z.B. HLA-B7,7) oder als Blank-Antigen/Allele in den Befunden geschrieben werden, wenn die homozygote Erbanlage durch eine Familienuntersuchung belegt wurde.**			
A2.0	**Familienuntersuchungen**			
A2.1	**Erfolgt die Festlegung der Haplotypen oder Genotypen ausschließlich nach einer Familienuntersuchung?**			
A2.2	**Werden alle Familienmitglieder ersten Grades typisiert?**			

		U	O	Bemerkungen
A2.3	**Wird eine HLA-A-, -B und HLA-DR-Typisierung durchgeführt ?**			
A2.4	**Erfolgt bei unklaren Haplotypergebnissen eine erweiterte Familienuntersuchung durch Bestimmung der Merkmale des HLA-C, -DQ und/oder –DP Locus ?**			
A2.5	**Enthalten die Endbefunde der Familienuntersuchungen eine Zuordnung der Haplotypen und Genotypen einschließlich der Interpretation und Bewertung von möglichen Rekombinationsereignissen ?**			
	Unverwandte Individuen			
A2.6	**Erfolgt eine Berechnung des Haplotyps aufgrund von bekannten Haplotypfrequenzen aus einer repräsentativen Populationsstichprobe ?**			
A2.7	**Ist die Populationsstichprobe für die Berechnung der Haplotypfrequenzen ausreichend repräsentativ und groß?**			
A2.8	**Wird bei die Berechnung der Haplotypfrequenz, die Merkmalsfrequenz der zugehörigen ethnischen Gruppe zugrundegelegt?**			
A2.9	**Werden extrapolierte wahrscheinliche Haplotypen in den Endbefunden entsprechend gekennzeichnet ?**			

B	**Annex B: Serologische HLA-Klasse I und -Klasse II Typisierung**			

		U	O	Bemerkungen
B1.0	**HLA-A,-B und –C Locus Antigene**			

		U	O	Bemerkungen
B1.1	**Ist das Laboratorium in der Lage sämtliche offiziell durch das EFI-Standard Komitee festgelegten WHO-Spezifitäten des HLA-A und –B Locus zu bestimmen ?**			
B1.2	Die serologische Bestimmung von HLA-C Locus Antigenen ist optional.			
	HLA-DR,-DQ und –DP Antigene			
B1.3	**Ist das Laboratorium in der Lage sämtliche offiziell durch das EFI-Standard Komitee festgelegten WHO-Spezifitäten des HLA-DR Locus zu bestimmen ?**			
B1.4	Die serologische Bestimmung von HLA-DQ und –DP Antigenen ist optional.			
	HLA-Klasse I und –Klasse II Typisierungstechniken			
B1.5	**Werden geeignete, optimierte Typisierungstechniken für die Bestimmung von HLA-Klasse I und –Klasse II Merkmalen verwendet ?**			
B1.6	**Wird für jeden Typisierungsansatz eine geeignetes positives Kontrollserum* verwendet ?** ***Das HLA-Klasse I bzw. HLA-Klasse II spezifische Reaktionsmuster dieses Kontrollserum muss mittels Referenzzelllinien belegt sein.**			
B1.7	**Wird für jeden Typisierungsansatz ein negatives Kontrollserum verwendet, bei dem eindeutig gezeigt werden konnte, dass es keine leukozytären Antikörper beinhaltet ?**			
B1.8	Sind analytische Kriterien festgelegt, für den Fall, dass kein eindeutiges Reaktionsmuster bei den Kontrollen vorhanden ist ?			

		U	O	Bemerkungen
B1.9	**Wird die Vitalität der negativen Kontrolle angegeben und ist sie ausreichend für die Interpretation der Ergebnisse ?** Die Vitalität der negativen Kontrolle sollte für die überwiegende Zahl der serologischen Untersuchungsverfahren größer als 80% sein.			
B1.10	**Sind eindeutige analytische Freigabekriterien definiert für die Bewertung von positiven und negativen Kontrollen bei Untersuchungsverfahren, die nicht auf der Bewertung der Vitalität von Zellen beruhen ?**			
B1.11	**Ist das Vorgehen bei unklaren positiven und/oder negativen Kontrollergebnissen in den Arbeitsanweisungen/Methodenhandbuch festgelegt ?**			
B1.12	**Eine Trennung von B-Zellen ist nicht notwendig, wenn** ❑ **Techniken verwendet werden, die zwischen T- und B-Zellen eindeutig unterscheiden ?** ❑ **Antikörper eingesetzt werden, die eine eindeutig gegen HLA-Klasse II Antigene gerichtete Spezifität aufweisen.**			
B1.13	**Werden monoklonale Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung und mittels einer geeigneten Methodik verwendet die gewährleistet, dass die Spezifität optimal ist?** Wurde die Spezifität anhand eines definierten Referenzzellpanels belegt ?			
B1.14	Wird bei der HLA-Klasse II Antigenbestimmung jedes Antigen durch drei monoklonale Seren bestimmt ? oder werden mindestens fünf polyklonale Seren zur Bestimmung eines HLA-Klasse II Antigens eingesetzt ?			

		U	O	Bemerkungen
B1.5	**Sind Kriterien für die Antigenzuordnung in den Arbeitsanweisungen /Methodenhandbuch enthalten ?**			
B1.6	**Sind Zellpanel, d.h. Zellen oder Zelllinien, mit definierter HLA-Klasse I oder –Klasse II Spezifität, vorhanden, um die Spezifität von neuen Antiseren / Antikörpern zu ermitteln ?** Umfasst dieses Zellpanel alle vom Labor getesteten Antigenspezifitäten ?			
B1.17	Wurde die Spezifität eines lokal durch das Laboratrium definierten Antiserums durch mindestens ein weiteres Laboratorium bestätigt ?			
B1.18	**Werden zur Validierung der lokal gefundenen Spezifität(en) auch statistische Bewertungen aufgrund des Reaktionsmuster des Serums anhand einer ausreichend großen Untersuchungsserie verschiedener Zellen / Zelllinien vorgenommen ?**			
B1.19	**Wird eine Prüfung der Spezifität durchgeführt, wenn Seren von anderen Laboratorien bezogen werden ?**			
B1.20	**Erfolgt eine Chargenprüfung anhand von mindestens fünf unterschiedlichen Zellen mit bekanntem Phänotyp ?**			
	Komplement			
B1.21	**Erfolgt eine Chargentestung und Freigabe von Komplement, die nachweist, dass das Komplement bei Vorhandensein eines spezifischen Antikörpers Zytotoxizität vermittelt, jedoch nicht zytotoxisch wirkt, wenn kein spezifischer Antikörper vorhanden ist?**			
B1.22	Wird die Chargentestung in verschiedenen Verdünnungsstufen durchgeführt, um diejenige Verdünnungsstufe für die Routinetestung festzulegen, die eine Stufe über der als ausreichend befundenen Verdünnungsstufe liegt ?			

		U	O	Bemerkungen
B1.23	Erfolgt die Chargentestung mit mindestens zwei Antikörpern (einem schwach und einem stark reagierenden), die gegen zwei unterschiedlichen Zellen / Zelllinien gerichtet sind sowie einer Zelle / Zelllinie, die nicht reagiert (Negativkontrolle) ? Alternativ kann anstelle der zwei unterschiedlich stark reagierenden Antikörper auch lediglich ein Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen verwendet werden.			
B1.24	Wird jede Komplementcharge unter Verwendung der verschiedenen in die Untersuchung einfließenden Zelltypen ausgetestet ?			

C	**Annex C: HLA-Antikörperscreening**			

		U	O	Bemerkungen
	Technische Vorraussetzungen			
C1.1	**Kommt Komplement-vermittelte Zytotoxizität bei der Bestimmung von HLA-Antikörpern zur Anwendung oder wurde eine andere Methode validiert, die Alloantikörper mit einer vergleichbaren oder besseren Sensitivität nachweist ?** _____			
C1.2	**Wird zum Nachweis von HLA-Klasse II Antikörpern eine Methode verwendet, die diese eindeutig von HLA-Klasse I Antikörpern unterscheidet?**			
C1.3	**Werden die verwendeten Methoden in den Befunden angegeben ?**			
	Serumproben			
C1.4	**Werden Serumkonzentrationen verwendet, die eine optimale Sensitivität gewährleisten ?**			
C1.5	**Werden die Seren in einer zusätzlichen Verdünnungsstufe untersucht und wird die eingesetzte Serumverdünnung dokumentiert ?**			

		U	O	Bemerkungen
C1.6	**Wird in jedem Testansatz eine negative Kontrolle mitgeführt und stammt diese negative Kontrolle von einem nicht-alloimmunisierten humanen Individuum?**			
C1.7	**Werden in jedem Testansatz eine positive Kontrolle mitgeführt die folgende Bedingungen erfüllt** ❑ **Serum von einem hoch-alloimmunisierten Individuum** ❑ **dokumentierter Nachweis eines gegen HLA-Antigene gerichteten Reaktionsmusters*** *Das Serum kann von einem polyspezifisch immunisierten Individuum sein			
	Panelzellen			
C1.8	**Werden als Panelzellen mononukleäre Zellen aus peripherem Blut, Lymphknoten, Milz oder Zelllinien verwendet ?**			
C1.9	**Werden zum Nachweis von HLA Klasse I Antikörpern mit B-Lymphozyten angereicherte Zellpräparationen, Zellsuspensionen von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukamie oder B lymphoblastoide Zelllinien eingesetzt ?**			
C1.10	**Wird eine ausreichend große Anzahl* von Panelzellen eingesetzt ?** *empfohlen sind mindestens 50 Zellen			
C1.11	**Sind die Phänotypen (HLA-Klasse I und Klasse II) der eingesetzten Panelzellen für die Bewertung der Antikörperspezifität bekannt ?**			
C1.12	Erfolgt eine erweiterte Spezifitätsaustestung unter Verwendung von Zellen / Zelllinien, die die gefundene Spezifität aufweisen bzw. nicht-aufweisen und Zellen / Zelllinien, die kreuzreagierende Antigene exprimieren ?			
	Antikörperscreening mittels Komplement-vermittelter Zytotoxizität			

		U	O	Bemerkungen
C1.13	**Wird für jeden Testansatz (Platte) eine HLA-spezifische Positivkontrolle zur Überprüfung der Komplement-Aktivität und eine Negativkontrolle zur Bewertung der Vitalität der untersuchten Zellen mitgeführt ?**			
C1.14	**Werden bei Testansätzen, die mit Dithiothreitol (DTT) Zusatz erfolgen, eine IgG-spezifische und eine IgM-spezifische Positivkontrolle mitgeführt?**			
	Antikörperscreening mittels Durchflußzytometrie			
C1.15	**siehe Fragen unter Annex J: Durchflußzytometrie**			
	Antikörperscreening mittels ELISA			
C1.16	**Siehe Fragen unter Annex K: ELISA**			

D	**Annex D: Nieren- und Pankreastransplantation**			

		U	O	Bemerkungen
D1.1	**Gibt es einen 24stündigen Bereitschaftsdienst zur technischen Durchführung von Histokompatibilitätstestungen bei Leichennierentransplantationen ?**			
	Antikörperscreening			
D1.2	**Gibt es eine dokumentierte Vorgehensweise um den Sensibilisierungsstatus jedes neu für die Warteliste zu registrierenden Patienten nachzuweisen ?**			

		U	O	Bemerkungen
D1.3	**Werden Serumproben der Patienten auf der Nierentransplantationswarteliste regelmäßig (z.B. alle 3 Monate) auf das Vorliegen von HLA-Antikörpern untersucht ?** **Werden hierbei die entsprechenden Richtlinien der Organaustauschorganisation (z.B. Eurotransplant) sowie alle gesetzliche Vorgaben berücksichtigt ?**			
D1.4	Erfolgt eine Dokumentation von potentiellen Sensibilisierungsereignissen und werden die folgenden Maßnahmen durchgeführt: ❑ In kürzeren Intervallen nach dem Sensibilisierungsereignis werden Serumproben gewonnen um einen möglichen HLA-Antikörper zu ermitteln. ❑ Bei einem positivem Nachweis eines HLA-Antikörpers wird dieses Serum aufbewahrt um in späteren Crossmatch-Untersuchungen eingesetzt zu werden.			
D1.5	Werden Antikörper-Spezifitäten der Patientenseren ermittelt und dokumentiert ?			
	Crossmatch (lymphozytäre Kreuzprobe)			
D1.6	**Wird die Crossmatch-Untersuchung prospektiv durchgeführt ?**			
D1.7	**Entspricht die Sensitivität der verwendeten Crossmatch-Methode der Sensitivität der für das Antikörperscreening verwendeten Methode?**			
D1.8	Werden Methoden für die Crossmatch-Untersuchung eingesetzt, die im Vergleich zum Standard-Mikrolymphozytoxizitättest-Crossmatchverfahren eine höhere Sensitivität aufweisen (z.B. durch verlängerte Inkubationszeiten, Waschschritten oder der Reaktionsverstärkung durch Zusatz von Antihumanglobulin oder der Messung mittels Durchflußzytometrie) ?			

		U	O	Bemerkungen
D1.9	**Werden für alle Crossmatchuntersuchungen ungetrennte Spender-Lymphozyten-suspensionen oder T-Zell angereicherte Lym-phozytensuspensionen verwendet ?**			
D1.10	**Falls durch das Transplantationsprogramm ge-fordert: Wird zusätzlich auch ein Ansatz mit B-Lymphozyten durchgeführt ?**			
D1.11	Wird bei der Durchführung einer Lymphozytoxizi-täts-basierten Crossmatchuntersuchung eine HLA-spezifische Positivkontrolle zur Überprüfung der Komplementaktivität und eine Negativkontrolle zur Bewertung der Vitalität der untersuchten Zellen mitgeführt ?			
D1.12	**Werden bei Testansätzen, die mit Dithiothreitol (DTT)- Zusatz erfolgen, eine IgG-spezifische und eine IgM-spezifische Positivkontrolle mitge-führt ?**			
	Serumproben			
D1.13	**Werden Serumverdünnungen verwendet, die eine optimale Sensitivität gewährleisten ?**			
D1.14	**Wird bei der Durchführung einer Mikrolympho-zytoxizitäts-basierten Crossmatchuntersuchung jedes Serum unverdünnt getestet ?**			
D1.15	Erfolgt zusätzlich ein Testansatz mit einer oder mehreren Verdünnungsstufen und wird die einge-setzte Serumverdünnung dokumentiert ?			
D1.16	Werden Serumproben die 14 Tage nach einem potentiellen Sensibilisierungsereignis gewonnen wurden in die Crossmatchuntersuchung einbezo-gen ?			

		U	O	Bemerkungen
D1.17	**Sind die für eine Crossmatchuntersuchung vor der Transplantation verwendeten Seren von Patienten mit HLA-Klasse I spezifischen Antikörpern oder Patienten, die innerhalb des letzten Screeningintervals eine Sensibilisierungsereignis aufweisen nicht älter als 48 Stunden ?** **Werden anderenfalls tiefgefrorene (≤ 25°C) gelagerte Serumproben verwendet, die nicht älter als 3 Monate sind ?**			
D1.18	**Werden Serumproben, die für eine Crossmatchuntersuchung eingesetzt wurden, anschließend tiefgefroren gelagert ?**			
	HLA-Typisierung			
D1.19	**Erfolgt eine prospektive HLA-A, -B und -DR Typisierung des Patienten (Empfängers) und des Leichennierenspenders ?**			
D1.20	Werden zusätzlich auch die HLA-C, -DQ und –DP Merkmale des Patienten(Empfängers) und des Kadavernierenspenders prospektiv untersucht ?			
	Lebend/Verwandten-Transplantation			
D1.21	Wird eine ausreichende Zahl von Familienmitgliedern untersucht, um bei Lebend / Verwandten-Transplantationen die HLA-Genotypen bestimmen zu können ?			
D1.22	Sind die für eine Crossmatchuntersuchung vor der Transplantation verwendeten Seren von Patienten mit HLA-Klasse I spezifischen Antikörpern oder Patienten, die kürzlich ein Sensibilisierungsereignis aufweisen nicht älter als 48 Stunden ? Werden anderenfalls tiefgefrorene (≤ 25°C) gelagerte Serumproben verwendet, die nicht älter als 3 Monate sind ?			
	Leichenspender			

		U	O	Bemerkungen
D1.23	Erfolgt die HLA-Typisierung unter Verwendung von Lymphozytensuspensionen, die aus ❑ Lymphknoten und/oder Milz ❑ und/oder peripherem Blut gewonnen wurden ?			

E	**Annex E: Sonstige Organtransplantation**			

		U	O	Bemerkungen
	Die Fragen E1.1-E1.7 treffen auf Empfänger mit hohem Abstoßungsrisiko (z.B. Patienten nach Transplantatabstoßung oder Patienten mit präformierten HLA-Klasse I spezifischen Antikörpern) zu.			
E1.1	Werden Spender und Empfänger HLA-A, -B und -DR typisiert ?			
E1.2	Werden die Empfänger prospektiv auf HLA-Klasse-I (A/B) und –Klasse II (DR) Antikörper untersucht ?			
E1.3	Wird bei sensibilisierten Patienten vor Transplantation ein Crossmatch durchgeführt ?			
E1.4	**Entspricht die Sensitivität der verwendeten Crossmatch-Methode der Sensitivität der für das Antikörper-Screening eingesetzten Methode ?**			
E1.5	Werden Methoden für die Crossmatch-Untersuchung eingesetzt, die im Vergleich zum Standard-Mikrolymphozytoxizitätstest eine höhere Sensititvität aufweisen (z.B. durch verlängerte Inkubationszeiten, Waschschritten oder der Reaktionsverstärkung durch Zusatz von Antihumanglobulin oder der Messung mittels Durchflußzytometrie) ?			
E1.6	Wird die Crossmatch-Untersuchung prospektiv durchgeführt ?			

		U	O	Bemerkungen
E1.7	Sind die für eine Crossmatchuntersuchung vor der Transplantation verwendeten Seren von Patienten mit HLA-Klasse I spezifischen Antikörpern oder Patienten, die kürzlich ein Sensibilisierungsereignis aufweisen nicht älter als 48 Stunden ? Werden anderenfalls tiefgefrorene ($\leq$ 25°C) gelagerte Serumproben verwendet, die nicht älter als 3 Monate sind ?			
E1.8	Werden möglichst Organe und/oder Gewebe von Crossmatch-negativen* Spendern für hochimmunisierte Empfänger verwendet ? * z.B. Crossmatch mit ungetrennten Lymphozyten oder angereicherten T-Zellen weniger als 20% über Negativkontrolle.			
E1.9	Werden nach einer potentiellen Alloimmunisierung (z.B. durch Bluttransfusion, Transplantatabstoßung oder Transplantatexplantation) Serumproben, die 14 Tage nach einem potentiellen Sensibilisierungsereignis gewonnen wurden, in die Crossmatchuntersuchung einbezogen (Historische Antikörper) ?			

F	**Annex F: Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation**			

		U	O	Bemerkungen
	Histokompatibilitätstestung bei verwandten Spendern			
F1.1	Werden der Patient und mindestens alle verfügbaren Verwandten routinemäßig HLA-A, -B und -DR typisiert, um die Vererbung der Haplotypen zu klären ?			

		U	O	Bemerkungen
F1.2	**Gibt es eine adäquate Vorgehensweise, um die HLA-Übereinstimmung (Genotyp-Identität) von Geschwistern zu ermitteln durch** ❑ ***eindeutige Zuordnung der Genotypen anhand einer Familienuntersuchung** ❑ ***oder durch eine hochauflösenden (4-stellige) HLA-Klasse I und/oder HLA-Klasse II Typisierung** ** entsprechend den Vorgaben im Transplantationsprotokoll kann dieser Teil auch entfallen (siehe 11.5)*			
F1.3	**Erfolgt eine molekularbiologisch hochauflösende (4-stellige) HLA-Klasse II Bestimmung bei Verwandten zweiten Grades?** ****Wird in diesen Fällen zusätzlich eine molekularbiologische hochauflösende (4-stellige) HLA-Klasse I Bestimmung durchgeführt ?*** ** entsprechend den Vorgaben im Transplantationsprotokoll kann dieser Teil auch entfallen (siehe 11.5)*			
F1.4	Ist sichergestellt, dass vor Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation immer eine Bestätigungstypisierung des Spenders und Empfängers aus einer zweiten unabhängig gewonnenen Probe erfolgt ?			
F1.5	Ist das Laboratorium in der Lage eine erweiterte hochauflösenden (4-stellige, z.B. A*0201, DRB1*1107) molekularbiologische HLA-Klasse I (*) und/oder Klasse II Typisierung durchzuführen oder ist gewährleistet, dass diese Untersuchungen in einem externen immungenetisch akkreditierten Laboratorium als Unterauftrag vergeben sind ? _____ ** entsprechend den Vorgaben im Transplantationsprotokoll kann dieser Teil auch entfallen*			
	Knochenmarkspenderdateien			

		U	O	Bemerkungen
F1.6	**Liegt von jedem Knochenmarkspender eine freiwillige Einverständniserklärung vor ?** **Entspricht die Einverständniserklärung den gültigen Richtlinien und gesetzlichen Vorgaben?**			
F1.7	**Erfolgt die HLA-Typisierung mittels serologischer oder molekularbiologischer Methoden, die ein niedrig-auflösendes Ergebnis (2-stellig, z.B. HLA-A2 oder HLA-A*02, oder HLA-DRB1*11) erreichen ?**			
	Unverwandte Knochenmarkspender			
F1.8	**Werden folgende Kriterien erfüllt:** ❑ **niedrig auflösende (2-stellige) molekularbiologische HLA-Klasse I Typisierung** ❑ **Auflösungsniveau der 2-stelligen HLA-Klasse I Typisierung entspricht der Serologie** ❑ **hoch-auflösenden (4-stellige) molekular molekularbiologische HLA-Klasse II Typisierung**			
F1.9	**Ist sichergestellt, dass vor Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation immer eine Bestätigungstypisierung des Spenders und Empfängers aus einer zweiten unabhängig gewonnenen Probe erfolgt ?**			
F1.10 *	**Ist das Laboratorium in der Lage eine erweiterte hochauflösenden (4-stellige, z.B. A*0201, DRB1*1107) molekularbiologische HLA-Klasse I Typisierung durchzuführen** **oder** **ist gewährleistet, dass diese Untersuchungen in einem externen immungenetisch akkreditierten Laboratorium als Unterauftrag vergeben sind ?** _____ ** entsprechend den Vorgaben im Transplantationsprotokoll kann dieser Teil auch entfallen*			

		U	O	Bemerkungen
F1.11	**Werden alle Ambiguitäten bei hochauflösenden (4-stelligen) Typisierungsergebnissen in dem Endbefund angegeben ?**			

G	**Annex G: Thrombozyten- und Granulozytentransfusion**			

		U	O	Bemerkungen
G1.1	Werden bei dem Empfänger (Patient) die Merkmale des HLA-A und –B Locus bestimmt ?			
G1.2	Erfolgt die Auswahl der Spender entsprechend den aktuell gültigen Richtlinien und gesetzlichen Vorgaben ?			
G1.3	Werden Crossmatch-Untersuchungen anhand von Spenderlymphozyten vorgenommen oder erfolgt die Crossmatch-Untersuchung unter Verwendung von Spenderthrombozyten oder –Granulozyten ?			

H	**Annex H: Krankheitsassoziation**			

		U	O	Bemerkungen
H1.1	Erfolgt eine komplette Austestung der HLA-Klasse I und/oder Klasse II Merkmale ?			
	Bestimmung eines Einzelantigens (z.B. HLA-B27)			
H1.2	**Wird jede Charge von Kontrollzellen getestet ?**			
H1.3	**Sind unter den Kontrollzellen mindestens 2 Zellen, die das betreffende Antigen besitzen ?**			
H1.4	Sind unter den Kontrollzellen mindestens 2 Zellen von Personen, die weder das betreffende Antigen noch ein kreuzreagierendes Antigen besitzen ?			

		U	O	Bemerkungen
H1.5	Werden die Serumkontrollen gleichzeitig mit dem Testansatz mitgeführt ?			
H1.6	**Beinhaltet jeder Testansatz bzw. jede Testplatte die folgenden Kontrollen:** ❑ **positive Serumkontrolle** ❑ **negative Serumkontrolle** ❑ **zwei spezifische Antiseren für jedes kreuzreagierende Antigen**			
H1.7	**Erfüllen die verwendeten Antiseren die Standardanforderungen aus der Sektion ‚HLA-Klasse I und –Klasse II Typisierungstechniken' (Kapitel 7) ?** (Die Auswahl der Antikörper müssen dabei geeignet sein, das Antigen eindeutig nachzuweisen (2 Mono oder 1 Mono + 2 Polyspezifische)			

I	**Annex I: Nukleinsäureanalyse**			

		U	O	Bemerkungen
	DNA-Extraktion			
I.1.1	**Wird die DNA über ein Verfahren extrahiert, das in der wiss. Fachliteratur beschrieben wurde und wurde dieses Verfahren im Labor ausreichend validiert ?**			
I1.2	**Wird die DNA nach der Isolation adäquat gelagert, so dass deren Struktur und Integrität erhalten bleibt?**			
	HLA-DNA-Analysen durch Amplifikationstechniken			
	Amplifikation			
I2.1	**Werden die Prä-Amplifikationsschritte in einem streng getrennten Arbeitsbereich durchgeführt, in dem keine amplifizierte DNA vorhanden ist ?**			

		U	O	Bemerkungen
I2.2	**Wird die Bearbeitung von Phagen und Plasmiden, die HLA-spezifische Sequenzen enthalten, in einem von dem Prä-Amplifikationsbereich getrennten Bereich durchgeführt ?**			
I2.3	Ist die räumliche Trennung des Prä-Amplifikationsbereiches, sowie ein limitierter Personenzugang gewährleistet ?			
I2.4	Werden zur Inaktivierung von Amplifikaten biochemische Verfahren eingesetzt ?			
I2.5	Werden Arbeitsflächen und Schränke eingesetzt, die der biologische Sicherheitsklasse II entsprechen ?			
I2.6	**Werden in dem Prä-Amplifikationsbereich folgende Gegenstände ausschließlich verwendet?** ❑ **Auswurf-Pipetten mit Einwegmaterialien** ❑ **Laborkittel** ❑ **Handschuhe**			
I2.7	**Werden die Arbeitsplätze im Labor regelmäßig mit verdünnter Säure (z.B. 1M Hypochlorit) oder Lauge (10%) und/oder durch UV-Bestrahlung gereinigt ?**			
	Geräte und Reagenzien			
I.3.1	**Ist die Nutzung von Geräten und Reagenzien, die ausschließlich für den Prä-PCR-Bereich vorgesehen sind, gewährleistet?**			
I3.2	Werden die Thermocycler bei der Installation und in entsprechenden Abständen auf Präzision und Reproduzierbarkeit geprüft?			
I3.3	**Wird die Temperatur in den einzelnen Probepositionen (Thermoblock) des Thermocyclers regelmäßig überprüft?**			
I3.4	Werden Kombinationen von Reagenzien („Master-Mix“) in kleine Aliquots abgefüllt und wird auf das Fehlen einer kritischen Substanz geachtet (z.B. Mg^{2+}) ?			

		U	O	Bemerkungen
I3.5	**Ist gewährleistet, dass die Aliquots der Primärreagenzien frei von Amplifikat-Kontaminationen sind?**			
I3.6	**Werden die Empfehlungen des Herstellers für die Reagenzien (Chemikalien, Enzyme) zu folgenden Punkten eingehalten:** ❑ **Lagerungsbedingungen** ❑ **Reaktionstemperatur** ❑ **Konzentration** ❑ **Pufferzusammesetzung**			
I3.7	**Ist gewährleistet, dass Reagenzien, die zur DNA-Amplifikation eingesetzt werden, nicht in Post-PCR Bereichen aufbewahrt werden?**			
I3.8	**Werden die Benutzungshinweise der Hersteller kommerziell erhältlicher Testsysteme mit Angaben zur Herkunft, der Chargennummer, des Verfallsdatums und den Lagerungsbedingungen aufbewahrt?**			
I3.9	**Wird gewährleistet, dass Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht zusammen verwendet werden?**			
I3.10	**Werden die Primer sachgerecht gelagert?**			
I3.11	**Wenn Verfahren eingesetzt werden, bei denen zwei aufeinanderfolgende Schritte logarithmischer Amplifikation erforderlich sind (z.B. ‚Nested PCR'), ist es gewährleistet, dass besondere Vorsichtsmassnahmen zur Reduzierung einer bei diesen Methoden erhöhten Kontaminationsgefahr durch Amplifikate getroffen werden?**			

		U	O	Bemerkungen
I3.12	**Beinhalten diese Vorsichtsmassnahmen folgende Schritte?** ❑ **Physikalische Trennung zwischen Prä- und Post-PCR Bereiche** ❑ **Die Beachtung der unter 15.3 – 15.7 genannten Standards für alle Komponenten des zweiten Amplifikationschrittes bis auf die DNA-Zielsequenz.** ❑ **Dass die Zugabe der DNA-Zielsequenz für die zweite Amplifikation in einem Raum geschieht, der vom Prä- und Post-Amplifikationsraum getrennt ist** ❑ **Den Einsatz eines gesonderten Satzes von Pipetten in jedem dieser Räume**			
	Amplifikationszielsequenz			
I4.1	**Ist es gewährleistet, dass Material, dass als Zielsequenz (Template) für einen Amplifikationassay eingesetzt werden soll, nicht in Post-Amplifikationsbereichen aufbewahrt wurde?**			
I4.2	**Sind geeignete Kontrollen für die reverse Transkription vorhanden, falls zur Amplifizierung cDNA (aus RNA) verwendet wird?**			
I4.3	**Stammt diese RNA aus Zellen, die das zum detektierenden HLA-Genort korrespondierende HLA-Merkmal exprimieren?**			
I4.4	**Wird sichergestellt, dass die Nukleinsäuren so hergestellt und gelagert werden, dass keine Artefakte auftreten oder eine Inhibition während der Amplifikation stattfindet?**			
I4.5	**Ist der annehmbare Mengenbereich für die DNA-Zielsequenz, die zur Amplifikation erforderlich ist, definiert und validiert?**			
	Primer-Oligonukleotide			
I5.1	**Werden die Nukleinsäuresequenzen der Primer und der Allele, die von dem jeweiligen Primer nachgewiesen werden, dokumentiert?**			
I5.2	**Werden die Nukleinsäuresequenzen der Primer und der Allele, die von dem jeweiligen Primer nachgewiesen werden, dokumentiert?**			

		U	O	Bemerkungen
I5.3	Wird die Spezifität und Effektivität jedes Primerpaars nach Lagerung untersucht und periodisch bestätigt mit DNA-Referenzmaterial, das die spezifische Sequenz aufweist oder eine geringfügig differierende Sequenz besitzt?			
	Kontamination			
I6.1	**Wird die DNA/RNA Verunreinigung erfasst und wird hierfür das Verfahren eingesetzt, das auch für die HLA-Bestimmung verwendet wird?**			
I6.2	**Werden in jedem Amplifikations-Testansatz negative Kontrollen, die keine Nukleinsäure enthalten, mitgeführt?**			
I6.3	Wird auch eine ‚open tube control' mitgeführt?			
I6.4	Ist die Anzahl der PCR-Zyklen so gewählt, dass sie eine Detektion der Zielsequenz-DNA erlaubt, ohne jedoch ausreichend für die Amplifikation einer kleinen Menge von kontaminierenden Molekülen (z.B. < 10 Moleküle / PCR-Amplifikat) zu sein?			
I6.5	**Werden vom Prä-Amplifikationsbereich routinemäßig Wischtests oder vergleichbare Kontrollen durchgeführt und die Aufzeichnungen dieser Untersuchungen archiviert?**			
I6.6	**Wird im Falle von positiven Ergebnissen sichergestellt, dass der Prä-PCR-Arbeitsbereich entsprechend gesäubert und vorbeugende Maßnahmen getroffen werden?**			
	Kontrollen			
I7.1	**Wird das spezifischen Amplifikationsprodukt durch Gelelektrophorese oder Hybridisierung nachgewiesen ?**			
I7.2	**Sind analytische Freigabekriterien für die Amplifikationsergebnisse in den Arbeitsanweisungen festgelegt ?**			

		U	O	Bemerkungen
I7.3	**Wird bei Amplifikationsverfahren (z.B. SSP), deren primäre Ergebnisinterpretation auf dem Vorliegen eines Amplifikates beruht, geeignete Kontrollen mitgeführt um eine falsch negative Amplifikation zu erkennen ?** **Wird die Spezifität der Amplifikationsansätze in regelmäßigen Zeitabständen überprüft?**			
	Amplifikate			
I8.1	**Wird die Quantität des Amplifikatproduktes bei jedem Testansatz überprüft (z.B. durch Hybridisierung mit einer Consensus Sonde oder Gelelektrophorese) <u>oder</u> liegen Validierungsunterlagen über die Reproduzierbarkeit einer für die nachfolgende Analytik ausreichenden Amplifikationsmenge vor ?**			
I8.2	**Wurden akzeptable Grenzen der einzusetzenden Amplifikatmenge festgelegt?**			
I8.2	**Typisierung mittels Hybridisierung von Amplifikaten mit DNA-Sonden (SSO)**			
	Sonden			
I9.1	**Sind für jede Sonde und Template-Kombination der entsprechende MHC-Locus und die erfassten Allele definiert ?**			
I9.2	**Werden die Sonden so gelagert, dass deren Spezifität und Sensitivität unbeeinflusst bleibt ?**			
	Hybridisierung			
I10.1	**Werden die Hybridisierungsbedingungen dokumentiert, um die definierte Spezifität von jeder Sonde zu gewährleisten ?**			
I10.2	Werden geeignete Kontrollen bei den Hybridisierungs-Tests mitgeführt ?			
I10.3	Wird als negative Kontrolle eine Sequenz verwendet, die nur geringfügig von der Sequenz abweicht, die von der empfohlenen Sonde erkannt wird ?			

		U	O	Bemerkungen
I10.4	**Werden die an eine Festphase gebundenen Nukleinsäuren (Sonden oder Zielsequenz), nur dann wieder benutzt, wenn sichergestellt ist, dass die vorhergehenden Signale nicht mehr nachweisbar sind ?**			
I10.5	**Werden beim Einsatz von Festphasen-gebundener DNA (Sonden oder Zielsequenzen) geeignete Kontrollen verwendet ?**			
	Geräte			
I11.1	**Werden die Inkubatoren und Wasserbäder bei jedem Testansatz auf korrekte Funktion und Temperatureinhaltung überprüft ?**			
	Sondenmarkierung und Detektion			
I12.1	Wird dokumentiert und geprüft, inwieweit die Spezifität und Sensitivität der Markierungsmethode reproduzierbar sind ? **Erfolgt eine regelmäßige Chargenkontrolle der Reagenzien (z.B. Antikörper, Sonden oder Indikatormoleküle) ?**			
I12.2	**Werden die Empfehlungen des Herstellers für die Enzyme zu folgenden Punkten eingehalten ?** ❑ **Lagerungsbedingungen** ❑ **Reaktionstemperatur** ❑ **Puffer** ❑ **Konzentration**			
I12.3	Wird die Aktivität jeder neuen Charge von Enzymen vor deren Einsatz überprüft ?			
	Analyse			
I13.1	**Sind Grenzwerte für die Beurteilung von positiven und negativen Hybridisierungsreaktionen festgelegt ?**			
I13.2	**Sind analytische Freigabekriterien für die Interpretation und Zuordnung der Antigen/Allele festgelegt ?**			

		U	O	Bemerkungen
I13.3	Werden die Ergebnisse von mehr als einer Person interpretiert ?			
	DNA-Sequenzierung			
	Zielsequenzen			
I14.1	**Werden bei der Vorbereitung der Zielsequenzen für die Sequenzierung insbesondere die Punkte 15.22, 15.25 und 15.26 berücksichtigt ?**			
I14.2	**Wird das Material, das als Zielsequenz für die Sequenzierung eingesetzt wird, gereinigt und ist dessen Spezifität (für den zu testenden HLA-Genort bzw. Allelgruppe), Qualität und Quantität ausreichend, um interpretierbare Primärsequenzen zu generieren ?**			
I14.3	**Ist die Methode, die für die Vorbereitung der Zielsequenz eingesetzt wird, in der Lage, eine ausreichend lange Zielsequenz zu generieren, die frei von Verunreinigungen ist ?**			
I14.4	**Ist es gewährleistet, dass diese Methode die abzulesende Sequenz nicht beeinflusst (z.B. durch Mutationen während der Klonierung, bzw. präferentielle Amplifizierung) ?**			
I14.5	**Werden die Empfehlungen des Herstellers für Reagenzien, die bei der Vorbereitung von Zielsequenzen eingesetzt werden (z.B. Enzyme, Chemikalien), bezüglich deren Lagerung und Gebrauch eingehalten ?**			
I14.6	**Wird die Funktionalität jeder neuen Charge dieser Reagenzien vor deren Einsatz überprüft und dokumentiert ?**			
	Typisierungsverfahren mit Primerverlängerung			
I14.7	**Sind der Polymorphismus und die Spezifität der Primer-Zielsequenzen bekannt ?**			
I14.8	**Werden Primer unter den für sie empirisch festgelegten Bedingungen eingesetzt, die eine optimale Spezifität gewährleisten ?**			

		U	O	Bemerkungen
I14.9	**Wird durch die angewendeten Amplifikations-bedingungen die erwünschte und definierte Spezifität sowie die ensprechende Quantität an spezifischem Amplifikat erreicht ?**			
I14.10	Wird die Spezifität und Reaktionsstärke jeder Primercharge nach deren Lagerung mit DNA-Referenzmaterial untersucht und periodisch bestätigt ?			
I14.11	**Sind PCR-Zielsequenzen und PCR-Bedingungen aufeinander abgestimmt bezüglich folgender Parameter ?** ❑ **Polymerase-Typ** ❑ **Polymerase-Konzentration** ❑ **Primer-Konzentration** ❑ **dNTP-Konzentration** ❑ **ddNTP-Konzentration** ❑ **Länge der Sequenz** ❑ **GC-Gehalt des Amplifikats**			
I14.12	**Sind die Spezifität und Sensitivität der Markierungs- und Detektionsmethode bezüglich deren Funktionalität (Signalstärke und -spezifität einer Kontrollsequenz) vor dem routinemäßigen Einsatz der Methode im Labor validiert und ausreichend dokumentiert worden ?**			
I14.13	**Ist im Labor die zufriedenstellende Funktionalität jeder neuen Charge von Reagenzien (z.B. Nukleotide, Enzyme) vor deren Einsatz im Routine-Betrieb überprüft worden ?**			
I14.14	**Werden Reagenzien so gelagert, dass eine optimale Funktionalität gewährleistet wird ?**			
	Elektrophorese			
I14.15	**Sind in den Arbeitsanweisungen zur Methodendurchführung Kriterien für die Akzeptanz oder Verwerfung von Gelen, bzw. einzelnen Bahnen eines Geles festgelegt ?**			
I14.16	**Entsprechen diese Kriterien dem aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik ?**			

		U	O	Bemerkungen
I14.17	Sind in den Arbeitsanweisungen zur Methodendurchführung die optimalen Bedingungen unter denen bestimmte Reagenzien, die wesentlichen Einfluss auf die Qualität und Genauigkeit der Sequenzierungsergebnisse nehmen (z.B. Akrylamid, Puffer- und Salzkonzentration), festgelegt ?			
I14.17	**Werden optimale Lagerungsbedingungen der Reagenzien eingehalten ?**			
I14.18	**Sind die Elektrophoresebedingungen festgelegt (z.B. Temperatur, Spannung, Zeitdauer) ?** Werden diese Bedingungen für jeden Lauf dokumentiert ?			
	Nukleotid- und Allelzuordnung			
I14.19	**Sind Kriterien über Parameter bezüglich der Akzeptanz der Sequenzierrohdaten in den Arbeitsanweisungen dokumentiert ?** ❑ **Zuordnung der Sequenzen von nicht-polymorphen Positionen** ❑ **Minimal- bzw. maximal annehmbare Signal (Peak)-Höhe** ❑ **Grenzwert für die Grundlinien-Fluktuation** ❑ **Signal zu Hintergrund-Ratio**			
I14.20	Erfolgte die Validierung anhand der Sequenzierung von Referenzmaterial, das möglichst alle bekannten polymorphen Positionen umfasst ?			
I14.21	**Basieren Sequenzierungsergebnisse für die Routine-Diagnostik auf Sequenz-Rohdaten, die aus komplementären DNA-Strängen stammen?** **Wenn nicht, ist es gezeigt worden, dass die eingesetzte Sequenzierungsmethode, die nur auf die Analyse eines einzelnen DNA-Stranges beruht zuverlässige Ergebnisse erzielt ?**			
I14.22	**Gibt es Kriterien in den Arbeitsanweisungen zur Interpretation von schwierig beurteilbaren Sequenzbereichen (z.B. Kompressionen, Ende einer Sequenz) die dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik entsprechen ?**			
I14.23	Werden die Ergebnisse von mehr als einer Person interpretiert, vor allem dann, wenn zweifelhafte Nukleotidpositionen auftreten ?			

		U	O	Bemerkungen
I14.24	**Werden automatische Typisierungssysteme bzw. Computerprogramme, die zur Auswertung von HLA-Sequenzierungsdaten verwendet werden, vor deren routinemäßigen Einsatz validiert ?**			
	Allelzuordnung			
I14.25	**Ist die Allel- und Genortspezifität jeder Primer/Template-Kombination definiert ?**			
I14.26	**Erfolgt die Interpretation der erhaltenen Sequenzen durch Vergleich mit allen durch die WHO definierten bekannten Allelsequenzen des betroffenen Genortes ?**			
I14.27	**Werden die benutzten Sequenz-Datenbanken regelmäßig dem aktuellen Stand angepasst ?**			
I14.28	Existiert für jede Primer/Template Kombination eine Liste mit allen möglichen, nicht eindeutigen Allelkombinationen (Ambiguitäten) ?			
I14.29	**Ist es gewährleistet, dass Sequenzinformationen, die durch die Amplifikationsprimer zustande kommen, für die Auswertung der Ergebnisse und die Allelzuordnung nicht berücksichtigt werden ?**			
I14.30	Wenn eine manuelle Auswertung der Daten erfolgt, werden die Ergebnisse von mehr als einer Person interpretiert ?			
I14.31	**Werden Unterlagen über die Sequenzdatenbank, die für die analytische Interpretation der Rohdaten eingesetzt wurde, aufbewahrt ?**			
I14.32	**Werden bei nicht eindeutigen Sequenzierungsergebnissen alle theoretisch möglichen Allelkombinationen (Ambiguitäten) im Befund angegeben ?**			
	Typisierung mittels Sequenz-spezifischer Amplifikation (SSP)			
I15.1	**Ist die Spezifität jeder einzelner Primerkombination definiert ?**			

		U	O	Bemerkungen
I15.2	**Werden bei jeder Amplifizierungsreaktion interne Kontrollen verwendet, um methodische Fehler in der SSP zu erfassen ?**			
I15.3	Existieren geeignete Kontrollen, um eine Kontamination durch zuvor amplifizierte Produkte zu erkennen ?			
I15.4	**Werden Primer in der Routinetestung unter den für sie empirisch festgelegten, optimalen Bedingungen eingesetzt, die eine optimale Spezifität gewährleisten ?**			
I15.5	**Wird die Sensitivität und Spezifität jedes Primerpaares mit DNA-Referenzmaterial und/oder anhand der aktuellen Allel-Sequenzdatenbank in regelmäßigen Abständen überprüft ?**			
I15.6	**Ist die Sensitivität und Spezifität jedes Primerpaares auch bei heterozygoten Proben gewährleistet ?**			
	Elektrophorese			
I15.7	**Werden Molekulargewichtsmarker bei der Elektrophorese eingesetzt, die das Größenspektrum der zu erwartenden SSP-Amplifikate abdecken ?**			
I15.6	**Ist es gewährleistet, dass die pro Spur aufgetragene DNA-Menge die Migration der spezifischen Banden im Vergleich zu den Banden des Längenstandards nicht verändert ?**			
I15.7	**Sind die für jeden Genort gewählten Elektrophoresebedingungen in den Arbeitsanweisungen festgelegt und werden diese bei der Anwendung dokumentiert ?**			
I15.8	**Sind in den Arbeitsanweisungen die analytischen Freigabekriterien für die Akzeptanz von Gelen festgelegt?**			
	Detektion von DNA-Fragmenten			
I15.9	**Erfolgt die Anfärbung/Detektion der DNA entsprechend den Empfehlungen des Herstellers,** **einer wissenschaftlich anerkannten Methode bzw. nach eigenen validierten Bedingungen ?**			

		U	O	Bemerkungen
I15.10	**Sind Spezifität und Sensitivität der Markierungs- und Detektionsmethode von markierten Primern, die zur Amplifikation eingesetzt werden, optimiert und reproduzierbar ?**			
I15.11	**Sind akzeptable Grenzen der Signalintensität spezifiziert ?**			
I15.12	**Sind Spezifität und Sensitivität der Detektionsmethode optimiert und reproduzierbar ?**			
	Datenanalyse			
I15.13	**Werden die Grenzwerte für die Signalintensität von positiven sowie negativen Reaktionen in den Arbeitsanweisungen definiert ?** **Sind Maßnahmen festgelegt, falls diese Werte nicht erreicht werden ?**			
I15.14	**Sind analytische Freigabekriterien für die Zuordnung der Allele in den Arbeitsanweisungen festgelegt, die dem aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik entsprechen ?**			
I15.15	Werden die Ergebnisse von mehr als einer Person interpretiert ?			
	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)			
	Restriktionsenzyme			
I16.1	**Sind für jeden RFLP-Ansatz der HLA-Genort und die Allele (einschließlich Varianten) definiert ?**			
I16.2	**Werden die Empfehlungen des Herstellers für die Enzyme zu folgenden Punkten eingehalten?** ❑ **Lagerungsbedingungen** ❑ **Reaktionstemperatur** ❑ **Puffer** ❑ **Konzentration**			
I16.3	**Wird die enzymatische Aktivität jeder neuen Charge von Enzymen überprüft ?**			
I16.4	**Werden bei RFLP Analysen mittels PCR-Amplifikaten in dem Restriktionsenzymverdau Kontrollamplifikate mitgeführt um die Vollständigkeit des Verdaues zu prüfen ?**			

		U	O	Bemerkungen
	Elektrophorese			
I16.5	**Sind alle relevanten Standards aus dem Abschnitt Elektrophorese 15.94 - 15.97 beachtet worden ?**			
	Detektion von DNA-Fragmenten			
I16.6	**Sind alle relevanten Standards aus dem Abschnitt Detektion von DNA-Fragmenten 15.98 - 15.101 beachtet worden ?**			
	Analyse			
I16.7	**Sind alle relevanten Standards aus dem Abschnitt Analyse 15.102 – 15.104 beachtet worden ?**			
	Andere Verfahren			
I17.1	**Falls alternative Methoden bei der HLA-Typisierung eingesetzt werden (z.B. SSCP, heteroduplex, DGGE) liegen hierfür Validierungsunterlagen vor ?**			
I17.2	**Beinhaltet die Methodendurchführung ausreichende Kontrollen um die korrekten Zuordnung der Allele und damit die Spezifität zu gewährleisten ?**			
I17.3	**Wurden alle oben genannten, relevanten Standards beachtet ?**			
I17.4	**Werden automatische Typisierungssysteme bzw. Computerprogramme, die zur Auswertung von HLA-Typisisierungsergebnissen verwendet werden, vor deren routinemäßigen Einsatz validiert und bezüglich Reproduzierbarkeit und Genauigkeit überprüft ?**			

J	**Annex J: Durchflußzytometrie**			

		U	O	Bemerkungen
	Geräte Standardisierung und Kalibrierung			

		U	O	Bemerkungen
J1.1	**Wird ein geeigneter Standard (Latex-Beads oder ähnliches) zur Kalibierung des Gerätes verwendet ?**			
J1.2	**Wird eine Kalibrierung vor jedem Analysenlauf bzw. an jedem Werktag durchgeführt ?**			
J1.3	**Werden Aufzeichnungen über die Gerätekalibrierung in Gerätehandbüchern bzw. bei den Prüfmittelüberwachungsprotokollen aufbewahrt ?**			
J1.4	**Sind für alle bei der Analytik relevanten Signale (z.B. Side-Scatter, Forward-Scatter, Fluoreszenz) Geräte-spezifische Mindestspezifikationen für die Signalamplifikation ermittelt worden?**			
J1.5	**Ist in den Arbeitsanweisungen das Vorgehen für den Fall festgelegt, dass die Kalibrierung (Latex-Beads oder ähnliches) außerhalb der Spezifikation liegt?** **Werden die erforderlichen Korrekturmaßnahmen dokumentiert?**			
J1.6	**Wird eine interne Prüfmittelüberwachung (z.B. Gerätereinigung) regelmäßig und entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt ?**			
J1.7	**Wird regelmäßig eine externe Prüfmittelüberwachung (Wartung nach Angaben der Herstellerfirma) durchgeführt ?**			
J1.8	**Wird vor jedem Arbeitstag oder Analyselauf eine Fluoreszenzstandardmessung* für jeden in der Analyse verwendetem Fluorochrom-Farbstoff durchgeführt ?** *Der Fluoreszenzstandard kann hierbei in den Kalibrierungsbeads enthalten sein.			
J1.9	**Wird diese Fluoreszenzstandardmessung einschließlich Kalibrierung nach jedem Wartungsvorgang durchgeführt ?**			
J1.10	**Werden Aufzeichnungen über die Fluoreszenzstandardmessungen (Kalibrierung) in den Gerätehandbüchern bzw. bei den Prüfmittelüberwachungsprotokollen aufbewahrt ?**			

		U	O	Bemerkungen
J1.11	**Falls die Fluoreszenzstandardmessungen außerhalb der vorgegebenen Spezifikationen liegt, sind die erforderlichen Korrekturmaßnahmen beschrieben und werden diese dokumentiert ?**			
J1.12	**Erfolgt eine adäquate Kompensation zum Ausgleich der Überlagerungen bei gleichzeitiger Verwendung von mehr als einem Fluorochrom-Farbstoff ?**			
J1.13	**Werden für die Farbstoffkompensation Fluorochrom-markierte periphere Lymphozyten oder Kalibrierbeads verwendet, die für diesen speziellen Zweck validiert wurden?**			
J1.14	Werden die Geräteeinstellungen [Verstärkungen (Amperestärke) und Laserleistung (in Milli-Watt)] bei Betriebstemperatur des Lasers täglich aufgezeichnet?			
	Durchflusszytometrische Crossmatch Testung / Antikörperscreening			
J2.1	**Eine Mehrfarbmessung wird empfohlen.** **Falls lediglich eine Einfarbmessung erfolgt, wird auf eine ausreichenden Reinheit der untersuchten Zellpopulation geachtet?**			
J2.2	**Wird ein Sekundärantikörper (Fluorochrom konjugierter F(ab') Anti-human IgG) mit Spezifität gegen die Fc-Region der schweren Kette) zum Nachweis der Bindung von humanen Immunglobulinen verwendet?**			
	Antikörperscreening mittels Zellpanel			
J3.1	**Wird bei dem Einsatz der Zellpanels darauf geachtet, dass die Anzahl der gepoolten Zellen / Zelllinien groß genug* ist, um alle Hauptspezifitäten zu erfassen ?** *Vorgaben entsprechend Abschnitt ‚Panelzellen' (Kapitel 8.12)			
J3.2	**Erfolgt eine Dokumentation der Anzahl der eingesetzten Zellen in einem Zellpool?**			
	Antikörperscreening mittels Mikropartikel			

		U	O	Bemerkungen
J4.1	**Wird ein ausreichend großes Panel* verwendet um einen korrekten Antikörpernachweis und die Antikörperspezifität zu gewährleisten ?** *Vorgaben entsprechend Abschnitt ‚Panelzellen' (Kapitel 8.12)			
	Kontrollen			
J5.1	**Werden in jeder Testserie positive und negative Kontrollen mitgeführt ?**			
J5.2	**Wird jeder Test in einem Doppelansatz durchgeführt?**			
J5.3	Sind die Seren für die Negativkontrolle von nicht-alloimmunisierten Personen ?			
J5.4	**Ist mittels eines durchflußzytometrischen Verfahrens nachgewiesen, dass die Negativkontrolle keine HLA-spezifische Reaktivität aufweist ?**			
J5.5	Ist die Positivkontrolle humanen Ursprungs und wird als Positivkontrolle Serum von einem alloimmunisierten Spender mitgeführt, dessen HLA-spezifische Reaktivität nachgewiesen ist ?			
J5.6	Werden für die Crossmatch-Untersuchung zusätzliche Positivkontrollen gegen andere Alloantigene verwendet ?			
J5.7	Erfolgt eine Titration des sekundären Antikörpers um die optimale Konzentration für die Reaktionsansätze festzustellen (Signal/Hintergrund-Ratio) ?			
J5.8	**Falls eine Mehrfarbanalyse durchgeführt wird, ist eine Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper untereinander ausgeschlossen?**			
J5.9	**Werden Methoden verwendet (z.B. Blockierung des Fc-Rezeptors mit nicht-humanen Antikörpern) um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zu vermeiden ?**			
	Reagenzien			
J6.1	**Ist die Spezifität der verwendeten monoklonalen Antikörper eindeutig nachgewiesen?**			
J6.2	**Erfolgt die Lagerung der Reagenzien entsprechend den Angaben des Herstellers oder unter anderweitig nachgewiesenen optimalen Bedingungen?**			

		U	O	Bemerkungen
J6.3	Wenn lyophilisierte Antikörper verwendet werden, wird darauf geachtet, dass Mikroaggregate nach Rekonstitution durch Zentrifugation entfernt werden?			
	Interpretation			
J7.1	**Wurde von dem Laboratorium ein eigenes Protokoll für die Durchführung von Crossmatch-Untersuchungen erstellt?**			
J7.2	**Sind Validierungsunterlagen zur Methodendurchführung vorhanden, die eine Laboratoriums-spezifische Antikörpernachweisgrenze belegen?**			
J7.3	**Wird bei methodischen und technischen Änderungen oder bei Wechsel des Durchflußzytometers eine erneute Validierung der Antikörpernachweisgrenze durchgeführt?**			
J7.4	**Wurde ein Laboratoriums-spezifischer Grenzwert für die Beurteilung von Crossmatch-Ergebnissen ermittelt?**			
J7.5	**Wird bei methodischen und technischen Änderungen oder bei Wechsel des Durchflußzytometers eine erneute Validierung dieser Crossmatch-Grenzwerte durchgeführt ?**			
	HLA-Typisierung mittels Durchflußzytometrie			
J8.1	**Entspricht die verwendete Nomenklatur dem aktuellen Stand der WHO ?**			
	Zellpräparation			
J8.2	Wird eine Methode zur Zellpräparation eingesetzt, die eine ausreichende Zellvitalität und Reinheit der isolierten Zellen gewährleistet ?			
J8.3	Wird die Zellvitalität dokumentiert und liegt diese über dem Laboratoriums-spezifischen Minimalwert für die korrekte Durchführung der Analyse ?			
J8.4	**Wird für jede Testserie eine Negativkontrolle (Isotypkontrolle) mitgeführt?** **Stimmt die verwendete Isotypkontrolle mit dem Isotyp des Antigen-spezifischen Antikörpers überein?**			

		U	O	Bemerkungen
J8.5	**Wird im Falle einer <u>indirekten</u> Färbung ein irrelevanter primärer Antikörper (wenn verfügbar) und in jedem Fall der selbe sekundäre Antikörper, mit der gleichen Fluoreszenz und der gleichen Fluorochrome/Protein Ratio (F/P Ratio) verwendet ?** **Im Fall einer <u>direkten</u> Färbung, wird ein irrelevanter Antikörper (Isotypkontrolle) der gleichen Fluoreszenz und F/P Ration verwendet ?**			
J8.6	**Sind die kritischen Zeiträume validiert innerhalb derer eine direkte Messung, oder Messung von fixierten Proben, stattfinden muss, um ein korrektes Ergebnis zu gewährleisten ?**			
J8.7	**Werden die Kontrollen parallel mit den Proben angesetzt und analysiert ?**			
	Reagenzien			
J8.8	**Ist die Spezifität der verwendeten Antikörper mit geeigneten Testzellen und unter den gleichen Bedingungen wie die eigentliche Analyse validiert worden ?**			
J8.9	**Wurden bei diesen Validierungen die geeigneten Referenz- oder Kontrollzellen verwendet ?**			
J8.10	**Wird jede Antikörper-Charge mittels Referenz- oder Kontrollzellen getestet ?**			
J8.11	**Erfüllen die Kontrollzellen folgende Kriterien:** ❑ **mindestens fünf Kontrollzellen, die das spezifische Antigen exprimieren** ❑ **zwei Kontrollzellen für jedes mögliche kreuzreagierende Antigen** ❑ **mindestens zwei Zellen, die das spezifische und kreuzreagierenden Antigen(e) nicht aufweisen**			
J8.12	**Sind die Mengen der in der Analytik eingesetzten Reagenzien durch das Laboratorium validiert <u>oder</u> entsprechen diese den Herstellerangaben ?**			
J8.13	**Erfolgt die Lagerung der Reagenzien entsprechend den Angaben des Herstellers oder unter anderweitig nachgewiesenen optimalen Bedingungen ?**			

L	**Annex L: Abstammungsuntersuchungen**			

		U	O	Bemerkungen
L1.1	**Werden die Vorgaben der Richtlinien zur Durchführung von abstammungsgenetischen Gutachten der Bundesärztekammer und des Robert-Koch-Institutes in der jeweils gültigen Fassung beachtet ?**			
L1.2	**Haben der verantwortliche Laborleiter und das Laborpersonal durch eine entsprechende Ausbildung, Erfahrung und relevante kontinuierliche Fortbildung die erforderliche Qualifikation, um Abstammungsuntersuchungen durchzuführen ?**			
L1.3	**Existiert ein Qualifikationsnachweis für den Fall, dass im Labor außer HLA-Merkmalen auch andere genetische Merkmalssysteme untersucht werden** **oder** **werden diese Untersuchungen an andere qualifizierte* Laboratorien weitergegeben ?** _____ ***Liegen Unterlagen zur Unterauftragnehmerprüfung und/oder Akkreditierung dieser Laboratorien vor.**			
L1.4	**Wird routinemäßig eine ausreichende Identitätssicherung der zu untersuchenden Personen durchgeführt ?**			
L1.5	**Werden die Identifikationsnachweise von der zu untersuchenden Person unterzeichnet ?**			

		U	O	Bemerkungen
L1.6	**Erfolgt eine Dokumentation der folgenden Unterlagen:** ❑ **Name der an der Untersuchung beteiligten Personen** ❑ **Identität der zu untersuchenden Personen** ❑ **Art und Datum der durchgeführten Untersuchungen** ❑ **Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen einschließlich schriftliches Gutachten** ❑ **Art der biostatischen Auswertung (Software, Frequenzdateien, Biostatische Tabellen)** **und werden diese generationsübergreifend (für 30 Jahre) archiviert ?**			
L1.7	**Wird die Aufbewahrungsfrist von analytischen Anteilen des Originaluntersuchungsmateriales für mindestens zwölf Monate beachtet ?**			
L1.8	**Wird die Arbeitsanweisung zur ordnungsgemäßen Beschriftung der Proben eingehalten ?**			
L1.9	**Beinhaltet die Beschriftung den vollen Namen der zu untersuchenden Person, das Geburtdatum und das Entnahmedatum ?**			
L1.10	**Wird der Name der blutentnehmenden Person routinemäßig vermerkt ?**			
L1.11	**Wird der Verbleib der Blutprobe lückenlos dokumentiert und sind Maßnahmen gegen Verwechslung, Übertragungs- und Ablesefehler vorhanden ?**			
L1.12	**Werden alle Untersuchungen einschließlich der HLA-Typisierungen im Doppelansatz durchgeführt und geeignete Kontrollen mitgeführt ?**			
L1.13	**Werden die Computeranalysen routinemäßig überprüft und von dem verantwortlichen Mitarbeiter unterzeichnet ?**			
L1.14	**Existiert eine Dokumentation der Computerprogramme ?**			

		U	O	Bemerkungen
L1.15	**Werden manuelle Berechnungen doppelt durchgeführt ?**			
L1.16	**Werden geeignete Genfrequenzen zur Berechnung herangezogen ?**			
L1.17	**Werden die Berechnungen korrekt durchgeführt ?**			
L1.18	**Werden die Befunde nur an autorisierte Personen weitergegeben ?**			
L1.19	**Beinhalten die Befunde/Gutachten zusätzlich folgende Informationen:** ❑ **Name jeder getesteten Person und deren Verwandtschaftsgrad zum Kind** ❑ Ethnische Abstammung der beteiligten Personen ❑ **Für jede untersuchte Person die Phänotypen der einzelnen genetischen Systeme** ❑ **Unterschrift des verantwortlichen Gutachters**			
L1.20	**Beinhaltet der/das Befund/Gutachten die Feststellung der Vaterschaft / Nicht-Vaterschaft ?**			
L1.21	**Wird als Basis der Likelihood-Berechnung bei Nichtausschluß eine exakte Hypotheseformulierung (Terzettenfall und Defizienzfall) im Hinblick auf die postulierten Verwandtschaftsbeziehungen und ethnische Zugehörigkeit vorgenommen ?**			
L1.22	**Enthält der/das Befund/Gutachten bei Nichtausschluß folgende Angaben:** ❑ **Den W-Wert (unter Angabe der A-priori-Warscheinlichkeit) der sich aus Y/X (Likelihood-Quotient), PI_{kum} (Paternitätsindex) oder EM (Essen-Möller-Wert) ergibt** ❑ **Die individuelle Ausschlusschance (A)** ❑ Die Zuordnung eines verbalen Prädikates ‚Vaterschaft praktisch erwiesen' bei einem W-Wert $\geq$ 99,9 Prozent oder anderer analoger statistischer Maßzahlen			

		U	O	Bemerkungen
L1.23	**Falls andere mathematische Berechnungen durchgeführt werden, sind diese im Gutachten definiert und erklärt ?**			
L1.24	**Erfolgt eine Einbeziegung aller Besonderheiten (z.B. mögliche Mutationen, stumme Allele) durch geeignete Verfahren in die statische Auswertung und werden diese erläutert ?**			