

RIDA® GENE HLA-B27

REF PY0205



| | |
|-----------------|----|
| Deutsch | 3 |
| English..... | 17 |
| Español..... | 31 |
| Français..... | 45 |
| Italiano | 59 |
| Português | 73 |

RIDA®GENE HLA-B27

REF PY0205

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Mit dem RIDA®GENE HLA-B27 Kit werden HLA-B27 Allele in genomischer DNA, die aus humanen EDTA-Vollblutproben isoliert wurden, mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) qualitativ nachgewiesen. Das RIDA®GENE HLA-B27 Kit soll die Diagnose bei der Beurteilung von Patienten mit Verdacht auf Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew) und anderen Autoimmunerkrankungen unterstützen. **Der Test ist nicht zur Gewebetypisierung zu verwenden.**

Die folgenden HLA-B27 Subtypen werden mit den hier eingesetzten sequenzspezifischen Primern theoretisch (*in-silico*) nachgewiesen: HLA-B*27:01 bis 21, 23 bis 152 und 154 bis 164. Von diesen wurden folgende Subtypen *in-vitro* nachgewiesen: HLA-B*27:01 bis 05, 08 bis 10, 12, 14, 23 und 26.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Das Humane Leukozyten-Antigen-B27 (HLA-B27) ist ein Zelloberflächenantigen der Klasse I des Haupthistokompatibilitätskomplexes und ist auf Chromosom 6 kodiert. Seine Aufgabe ist es, T-Zellen mikrobielle Antigene zu präsentieren. Auf fast allen kernhaltigen Zellen im Körper sind HLA-Moleküle der Klasse I vorhanden.¹

Bei Trägern des HLA-B27 Allels ist eine Assoziation mit bestimmten entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, der Spondyloarthritis (SpA), insbesondere der ankylosierenden Spondylitis (AS), gegeben.^{2,3} Besonders ausgeprägt ist diese Assoziation in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Prävalenz von HLA-B27 in AS Patienten mit 90 - 95 %.^{4,5} In der Gesamtbevölkerung variiert die Prävalenz von HLA-B27 wesentlich zwischen den ethnischen Gruppen.⁶ AS ist eine chronisch rheumatische Entzündung, bei der hauptsächlich die Wirbelsäule und die Iliosakralgelenke betroffen sind. Weitere rheumatische Erkrankungen, mit denen HLA-B27 assoziiert wird, sind das Reiter-Syndrom, die akute anteriore Uveitis und entzündliche Darmerkrankungen.⁷

Der pathogene Mechanismus, durch den HLA-B27 eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung arthritischer Erkrankungen verursacht, ist trotz intensiver Forschungsarbeiten nach wie vor unbekannt.

3. Testprinzip

Mit dem RIDA®GENE HLA-B27 Kit werden HLA-B27 Allele in genomischer DNA, die aus humanen EDTA-Vollblutproben isoliert wurde, mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) qualitativ nachgewiesen.

Nach der DNA-Isolierung wird (falls vorhanden) das spezifische Genfragment und eine humane Gensequenz (IC) als Referenzgen amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

| Kit Code | Reagenz | Menge | | Deckelfarbe |
|----------|---------------------|-------|---------|-------------|
| 1 | Reaction Mix | 2x | 1050 µl | gelb |
| 2 | Taq-Polymerase | 1x | 80 µl | rot |
| N | No Template Control | 1x | 450 µl | weiß |
| P | Positive Control | 1x | 200 µl | blau |

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE HLA-B27 real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:

Tab.2: Validiertes Zubehör

| Extraktionsplattform | |
|----------------------|--|
| Promega | Maxwell® RSC |
| Real-time PCR-Gerät: | |
| Roche | LightCycler® 480II cobas z 480 Analyzer |
| Agilent Technologies | Mx3005P |
| Bio-Rad | CFX96™ |

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und cobas z 480 Analyzer
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Test die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.

- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 Probenlagerung

Der Test ist für die Untersuchung humaner EDTA-Vollblutproben entwickelt worden. Bis zur DNA-Extraktion sind die Proben bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden und bei 2 - 8 °C bis zu 72 Stunden zu lagern.⁸ Eine mikrobielle Kontamination der Proben ist unbedingt zu vermeiden. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut

Für die DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC Instrument (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Bei Verwendung des Maxwell[®] RSC Instruments (Promega) wird empfohlen die Blutproben für mindestens 5 min bei Raumtemperatur durchzumischen. Für die Probenvorbereitung sollen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 30 µl Proteinase K zugefügt werden. Aus der Blutprobe sollen 200 µl und aus dem Lysepuffer 300 µl hinzugefügt werden. Den Ansatz 10 s vortexen und für 20 min bei 56 °C inkubieren. Bei der Extraktion müssen 100 µl des Elutionspuffers eingesetzt werden. Die weiteren Angaben des Herstellers sind zu beachten.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen.

Es wird empfohlen, den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **No Template Control** und die **Positive Control** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen

| Kit Code | Komponenten des Master-Mix | Menge pro Reaktion | 10 Reaktionen (zusätzlich 10 %) |
|----------|----------------------------|--------------------|---------------------------------|
| 1 | Reaction Mix | 19,3 µl | 212,3 µl |
| 2 | Taq-Polymerase | 0,7 µl | 7,7 µl |
| | Gesamt | 20,0 µl | 220,0 µl |

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

No Template-Control: Je 5 µl No Template Control zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

Tab. 4: DNA real-time PCR Profil für LightCycler® 480II und cobas z 480 Analyzer

| | |
|---|---------------|
| Initiale Denaturierung | 1 min, 95 °C |
| Zyklen | 45 Zyklen |
| <u>PCR</u> Denaturierung | 10 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 15 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 5: DNA real-time PCR Profil für Mx3005P und CFX96™

| | |
|---|---------------|
| Initiale Denaturierung | 1 min, 95 °C |
| Zyklen | 45 Zyklen |
| <u>PCR</u> Denaturierung | 15 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 30 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.3.2 Universal real-time PCR Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR-Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 6: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® 480II und cobas z 480 Analyzer

| | |
|---|---------------|
| <u>Reverse Transkription</u> | 10 min, 58 °C |
| Initiale Denaturierung | 1 min, 95 °C |
| Zyklen | 45 Zyklen |
| <u>PCR</u> Denaturierung | 10 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 15 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 7: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P und CFX96™

| | |
|---|---------------|
| <u>Reverse Transkription</u> | 10 min, 58 °C |
| Initiale Denaturierung | 1 min, 95 °C |
| Zyklen | 45 Zyklen |
| <u>PCR</u> Denaturierung | 15 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 30 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 8: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

| Real-time PCR Gerät | Nachweis | Detektionskanal | Bemerkung |
|----------------------------|----------|-----------------|--|
| Roche LightCycler® 480II | HLA-B27 | 465/510 | RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt |
| | IC | 533/580 | |
| Roche cobas z 480 Analyzer | HLA-B27 | 465/510 | RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt |
| | IC | 540/580 | |
| Agilent Techn. Mx3005P | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |
| Bio-Rad CFX96™ | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. **No Template Control** und **Positive Control** müssen bei jedem PCR-Lauf mitgeführt werden und die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 9).

Tab. 9: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

| Probe | Ergebnis | | Zielgen Ct |
|---------------------|----------|---------|-------------------------------------|
| | HLA-B27 | IC | |
| Positive Control | positiv | positiv | Siehe Quality Assurance Certificate |
| No Template Control | negativ | negativ | 0 |

Wenn eine der beiden Kontrollen, **No Template Control** oder **Positive Control**, nicht spezifikationsgerecht ist, ist der gesamte PCR-Lauf zu wiederholen.

Die **Positive Control** enthält ein synthetisches Template einer Gensequenz HLA-B27 und einer humanen Gensequenz IC. Der Nachweis der **Positive Control** und der humanen Proben muss im Nachweiskanal IC daher immer positiv sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z.B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung

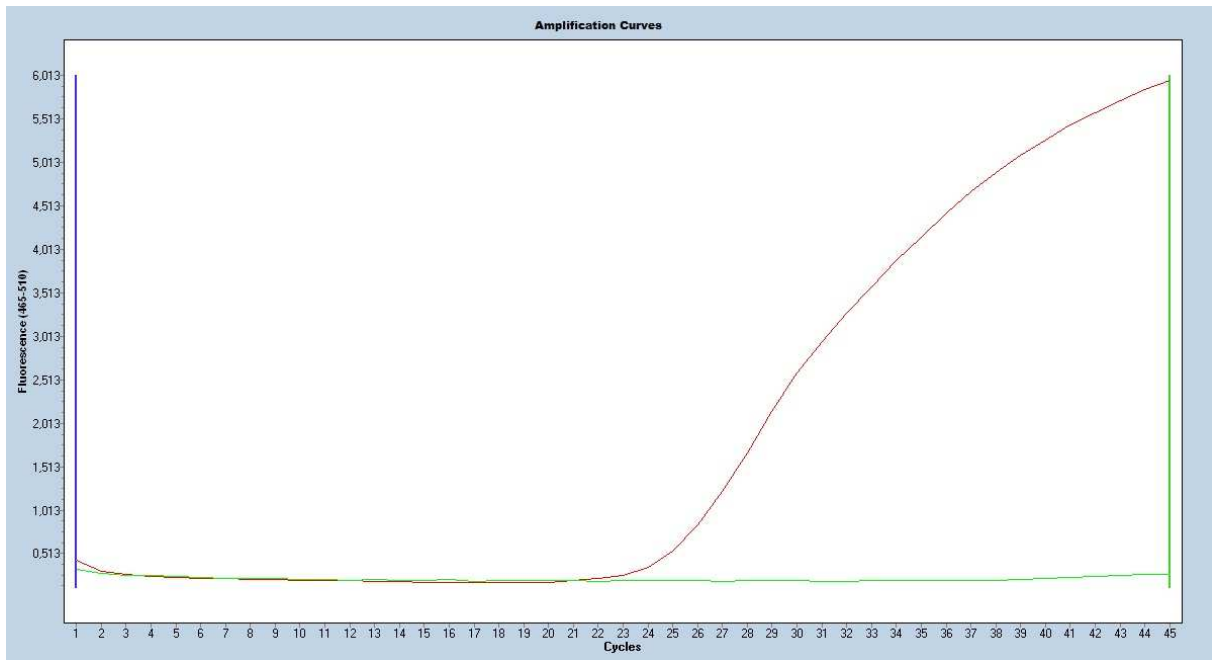


Abb. 1: Korrekter Verlauf der **Positive Control** und **No Template Control** auf dem cobas z 480 Analyzer (Detektionskanal 465/510)

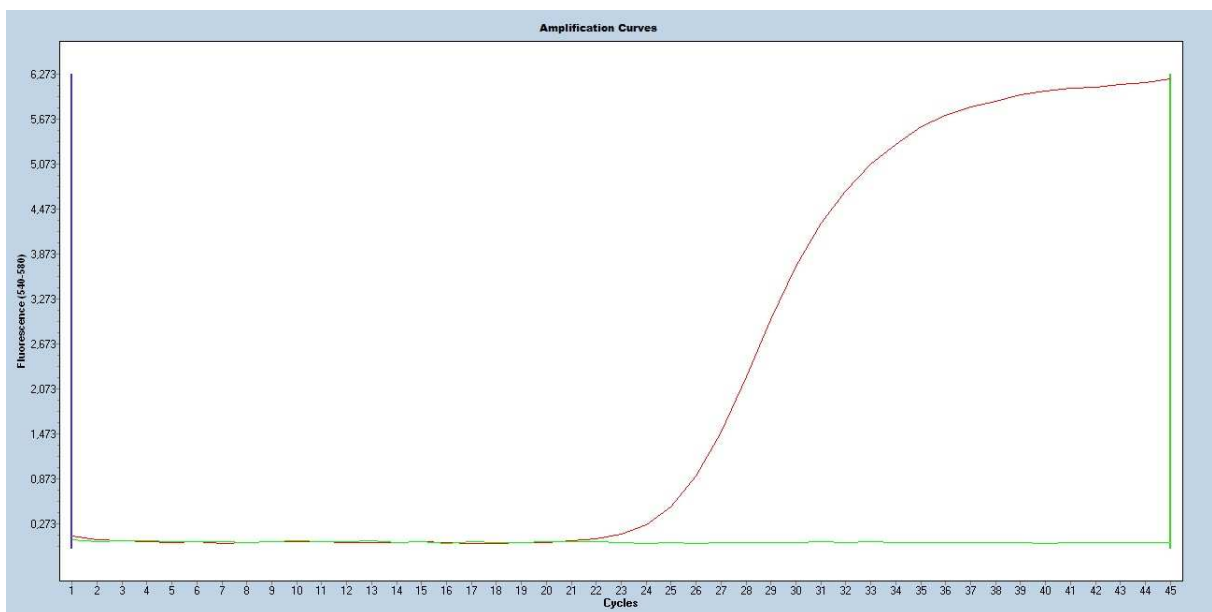


Abb. 2: Korrekter Verlauf der **Positive Control** und **No Template Control** auf dem cobas z 480 Analyzer (Detektionskanal 540/580)

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 10.

Tab. 10: Interpretation der Ergebnisse (z.B. LightCycler® 480II)

| Nachweis | HLA-B27 | IC | Ergebnis |
|---------------------|----------------|----------------|-----------------|
| Bsp. Probe 1 | positiv | positiv | HLA-B27 positiv |
| Bsp. Probe 2 | negativ | positiv | HLA-B27 negativ |
| Bsp. Probe 3 | positiv | negativ | Ungültig |
| Bsp. Probe 4 | negativ | negativ | Ungültig |

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn die **Positive Control** im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. Der gesamte PCR-Lauf ist zu wiederholen.

Wenn die **Positive Control** im Nachweissystem und im IC System die spezifikationsgerechte Amplifikation zeigt, die Probe (s. Tab. 10, Bsp. Probe 2) allerdings keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt, befindet sich humane DNA in der Probe, jedoch ist diese Probe HLA-B27 negativ.

Wenn die **Positive Control** im Nachweissystem und im IC System die spezifikationsgerechte Amplifikation zeigt, die Probe (s. Tab. 10, Bsp. Probe 3 bzw. Probe 4) allerdings keine Amplifikation der IC zeigt, wurde entweder die DNA nicht zugegeben oder ungeeignete Template-DNA (Qualität, PCR-Inhibitoren) verwendet. Die extrahierte Probe sollte erneut amplifiziert oder die Isolierung und Reinigung der Probe sollte verbessert werden.

Der Nachweis der **Positive Control** und der humanen Proben muss im Nachweiskanal IC immer positiv sein (s. Abschnitt 10. Qualitätskontrolle).

12. Grenzen der Methode

1. Der Test ist nicht zur Gewebetypisierung zu verwenden.
2. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
3. Dieser Test ist nur für humane EDTA-Vollblutproben validiert.
4. Die aufgelisteten HLA-B27 Typen (HLA-B*27:01 bis 21, 23 bis 152 und 154 bis 164) wurden anhand der *in-silico* Überprüfung mit der IPD-IMGT/HLA Datenbank (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/) als zu 100 % detektierbar bestimmt (Stand: Oktober 2017). Ein regelmäßiger Abgleich mit der Datenbank wird durchgeführt, jedoch kann nicht garantiert werden, dass zwischenzeitlich weitere Daten in der Datenbank hinzugefügt oder entfernt werden.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
6. Das Gendiagnostikgesetz (GenDG) setzt für alle genetischen Analysen gemäß GenDG eine ausführliche Aufklärung und eine schriftliche Einwilligung der Patienten voraus.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinisches Leistungsmerkmal

Der RIDA®GENE HLA-B27 Assay wurde für humane EDTA-Vollblutproben validiert. Zu beachten ist, dass die EDTA Konzentration in einem Standard Blutabnahmeröhrchen (z.B. Sarstedt Monovette® KE/9 ml) 1,6 mg pro ml Vollblut bei korrekter Füllhöhe beträgt. Bei der Testung der Interferierenden Substanzen wurde eine Konzentration von 1,8 mg pro ml K₂EDTA zusätzlich zugesetzt. Es wurde keine Interferenz zu den folgenden Substanzen festgestellt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Liste der Substanzen mit den im Test eingesetzten Konzentrationen










| Substanzen | Konzentrationen |
|---------------------|-----------------|
| Heparin | 15 U/ml |
| Cholesterin | 3,0 mg/ml |
| Bilirubin | 0,1 mg/ml |
| Hämoglobin | 0,2 mg/ml |
| K ₂ EDTA | 3,4 mg/ml |

14. Versionsübersicht

| Versionsnummer | Kapitel und Bezeichnung |
|----------------|-------------------------|
| 2018-05-18 | Freigabeversion |

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

| | |
|---|-----------------------------|
|  | In-vitro-Diagnostikum |
|  | Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Chargennummer |
|  | verwendbar bis |
|  | Lagertemperatur |
|  | Artikelnummer |
|  | Anzahl Tests |
|  | Herstelldatum |
|  | Hersteller |

16. Literatur

1. Boyle L, Goodall J, Opat S, Gaston JS. The recognition of HLA-B27 by human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2001; 167:2619-24.
2. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing Spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973; 904-7.
3. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-6.
4. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2014; 53(4): 650-57.
5. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J, Wordsworth BP, Cornélis F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann. Rheum. Dis* 1996; 55(4): 268-70.
6. López-Larrea C, Conzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Current Opinion in Thrumatology* 1996; 8:296-308.
7. Brewerton DA, Nicholls A, Caffrey M, Waters D, James DCO. HL-A 27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis. *Lancet* 1974; 956-58.
8. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.

RIDA®GENE HLA-B27

REF PY0205

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. With the RIDA®GENE HLA-B27 kit HLA-B27 alleles in genomic DNA, isolated from human whole blood EDTA samples, are qualitatively detected by using real-time Polymerase Chain Reaction (PCR). The RIDA®GENE HLA-B27 kit is designed to assist in the diagnosis of patients with suspected spondylitis ankylosans (Bechterew's disease) and other autoimmune diseases. **The test is not to be used for tissue typing.**

The following HLA-B27 subtypes will be detected theoretically (*in silico*) with the sequence-specific primers: HLA-B*27:01 to 21, 23 to 152 and 154 to 164. Of these, the following subtypes were detected *in vitro*: HLA-B*27:01 to 05, 08 to 10, 12, 14, 23 and 26.

2. Summary and explanation of the test

The human leukocyte antigens B27 (HLA-B27) is a major class I histocompatibility complex cell surface antigen and is coded on chromosome 6. Its task is to present microbial antigens to T-cells. Almost all nucleated cells in the body have class I HLA molecules.¹

An association with specific inflammatory, rheumatic diseases, spondyloarthritis (SpA), particularly ankylosing spondylitis (AS) is a given in carriers of HLA-B27 alleles.^{2,3} The association in the Caucasian population is particularly pronounced with a 90 - 95 % prevalence of HLA-B27 in AS patients.^{4,5} The prevalence of HLA-B27 in the total population varies significantly between the ethnic groups.⁶ AS is a chronic, rheumatic inflammation, which mainly affects the spine and the sacroiliac joints. Other rheumatic diseases associated with HLA-B27 include Reiter's syndrome, acute anterior uveitis and inflammatory intestinal disease.⁷

The pathogenic mechanism, in which HLA-B27 causes an increased susceptibility towards the development of arthritic disease, is still unknown despite intensive research work.

3. Test principle

With the RIDA®GENE HLA-B27 kit HLA-B27 alleles in genomic DNA, isolated from human whole blood EDTA samples, are qualitatively detected by using real-time Polymerase Chain Reaction (PCR).

After the DNA isolation, the specific gene fragment and a human gene sequence (IC) as a reference gene (if available) are amplified.

The amplified target sequences are detected using the hydrolysis probes attached to one end with the quencher and a reporter fluorescence label (fluorophore) on the other end. The probes hybridize with the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, the Taq-polymerase separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescence signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR device. The fluorescence signal increases with the quantity of formed amplicons.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (The reagents in a kit are sufficient for 100 determinations.)

| Kit code | Reagents | Quantity | | Cap color |
|----------|---------------------|----------|---------|-----------|
| 1 | Reaction mix | 2x | 1050 µl | yellow |
| 2 | Taq polymerase | 1x | 80 µl | red |
| N | No template control | 1x | 450 µl | white |
| P | Positive control | 1x | 200 µl | blue |

5. Storage instructions

- All reagents must be stored away from light at -20 °C and can be used until the expiry date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 20 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and freeze reagents immediately).
- Cool all reagents during PCR preparation (2 - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA®GENE HLA-B27 real-time PCR test can be used with the following extraction buffers and real-time PCR devices:

Tab. 2: Validated equipment

| Extraction buffer | |
|-----------------------|--|
| Promega | Maxwell® RSC |
| Real-time PCR device: | |
| Roche | LightCycler® 480II cobas z 480 Analyzer |
| Agilent Technologies | Mx3005P |
| Bio-Rad | CFX96™ |

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments, please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) when using LightCycler® 480II and cobas z 480 Analyzer
- Real-time PCR consumables (plates, reaction vials, foils)
- Centrifuge with rotor for reaction vial or plates
- Vortex blender
- Pipettes (0.5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Pipette tips with filters
- Powder-free disposable gloves

7. Precautions for users

For *in vitro* diagnostic use.

Only trained laboratory personnel may perform this test. Follow the guidelines for working in medical laboratories. The instructions for use for performing this test must be strictly followed. Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin or mucous membranes. Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test. Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.

- Please ensure that the extraction, PCR solution and PCR are spatially separate in order to avoid cross-contaminations.
- Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.
- Dispose of test kit once the expiry date has lapsed.

Users are responsible for proper disposal of all reagents and materials after use. Follow the respective national disposal regulations.

For further details, see the safety data sheets (SDS) www.r-biopharm.com.

8. Collection and storage of samples

8.1 Storage of samples

This test was developed for the examination of human whole blood EDTA samples. The samples must be stored at room temperature for up to 24 hours and 2 - 8 °C for up to 72 hours until the DNA is extracted.⁸ A microbial contamination of the samples must be avoided. The use of heat-inactivated, lipemic, hemolytic, icteric, or cloudy samples can lead to false results.

8.2 Preparation of samples

8.2.1 DNA isolation and whole blood EDTA

A commercially available DNA isolation kit or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC Instrument (Promega)) is recommended for the isolation of DNA from whole blood EDTA. The manufacturer's instructions must be observed.

When using Maxwell[®] RCS instruments (Promega), you are recommended to mix the blood samples for at least 5 minutes at room temperature. 30 µl proteinase K must be added to a 1.5 ml reaction vial for the preparation of samples. 200 µl from the blood sample and 300 µl from the lysis buffer must also be added. Vortex the solution for 10 seconds and incubate at 56 °C for 20 minutes. 100 µl of the elution buffer must be used for the extraction. The manufacturer's further instructions must be observed.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

The overall number of the reactions (samples and control reactions) must be calculated for the PCR.

Adding an additional 10% volume to the master mix is recommended in order to balance out the pipette loss (see Tab. 3). Prior to use, thaw, mix and briefly centrifuge the Reaction Mix, the Taq Polymerase, the No Template Control and the Positive Control. Always cool all reagents during work steps (2 - 8 °C).

Tab. 3: Example for the calculation and production of the master mix for 10 reactions

| Kit code | Components of the master mix | Quantity per reaction | 10 reactions (plus 10 %) |
|----------|------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | Reaction mix | 19.3 µl | 212.3 µl |
| 2 | Taq polymerase | 0.7 µl | 7.7 µl |
| | Overall | 20.0 µl | 220.0 µl |

Mix master mix and finally, centrifuge for short time.

9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the master mix in to the respective reaction vials (vials/plates).

No template control: Add 5 µl of the No Template Control to the prepared master mix.

Samples: Add 5 µl DNA extract to the prepared master mix of the sample reactions.

Positive control: Add 5 µl Positive Control for the prepared master mix into the reaction vial provided.

Close the reaction vials or plates, briefly centrifuge and transfer into the real-time PCR device. Start PCR according to device settings (See Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

9.3 PCR Instrument set-up

9.3.1 DNA real-time PCR profile

Tab. 4: DNA real-time PCR profile for LightCycler® 480II and cobas z 480 Analyzer

| | |
|---|---------------|
| Initial denaturation | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Denaturation | 10 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 15 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Note: Annealing and extension take place in the same step.

Tab. 5: DNA real-time PCR profile for Mx3005P and CFX96™

| | |
|---|---------------|
| Initial denaturation | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Denaturation | 15 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 30 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Note: Annealing and extension take place in the same step.

9.3.2 Universal real-time PCR profile

Note: The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA®GENE DNA and RNA real-time PCR assays in one run.

Tab. 6: Universal DNA real-time PCR profile for LightCycler® 480II and cobas z 480 Analyzer

| | |
|---|---------------|
| <u>Reverse transcription</u> | 10 min, 58 °C |
| Initial denaturation | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Denaturation | 10 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 15 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Note: Annealing and extension take place in the same step.

Tab. 7: Universal DNA real-time PCR profile for Mx3005P and CFX96™

| | |
|---|---------------|
| <u>Reverse transcription</u> | 10 min, 58 °C |
| Initial denaturation | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Denaturation | 15 sec, 95 °C |
| Annealing/Extension | 30 sec, 60 °C |
| Temperature Transition Rate / Ramp Rate | Maximum |

Note: Annealing and extension take place in the same step.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 8: Selecting suitable detection channels

| Real-time PCR device | Record | Detection channel | Comment |
|----------------------------|---------|-------------------|--|
| Roche LightCycler® 480II | HLA-B27 | 465/510 | RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required |
| | IC | 533/580 | |
| Roche cobas z 480 Analyzer | HLA-B27 | 465/510 | RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required |
| | IC | 540/580 | |
| Agilent Techn. Mx3005P | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |
| Bio-Rad CFX96™ | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |

10. Quality control

Specimens are evaluated using the analysis software of the respective real-time PCR device according to the manufacturer's instructions. **No Template Control** and **Positive Control** must be listed for each PCR run and must have correct results (see Tab. 9).

Tab. 9: A valid PCR run must meet the following conditions:

| Sample | Results | | Target gene Ct |
|---------------------|----------|----------|-----------------------------------|
| | HLA-B27 | IC | |
| Positive control | Positive | Positive | See Quality Assurance Certificate |
| No Template Control | Negative | Negative | 0 |

If one of the two controls, **No Template Control** or **Positive Control**, is not in line with the specifications, the whole PCR run must be repeated.

The **Positive Control** contains a synthetic template of a gene sequence HLA-B27 and a human gene sequence IC. The proof of the **Positive Control** and the human samples must therefore be positive in the detection channel IC.

If the specified values are not met, check the following before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functional performance of the equipment used (e.g., calibration)
- Correct test procedure

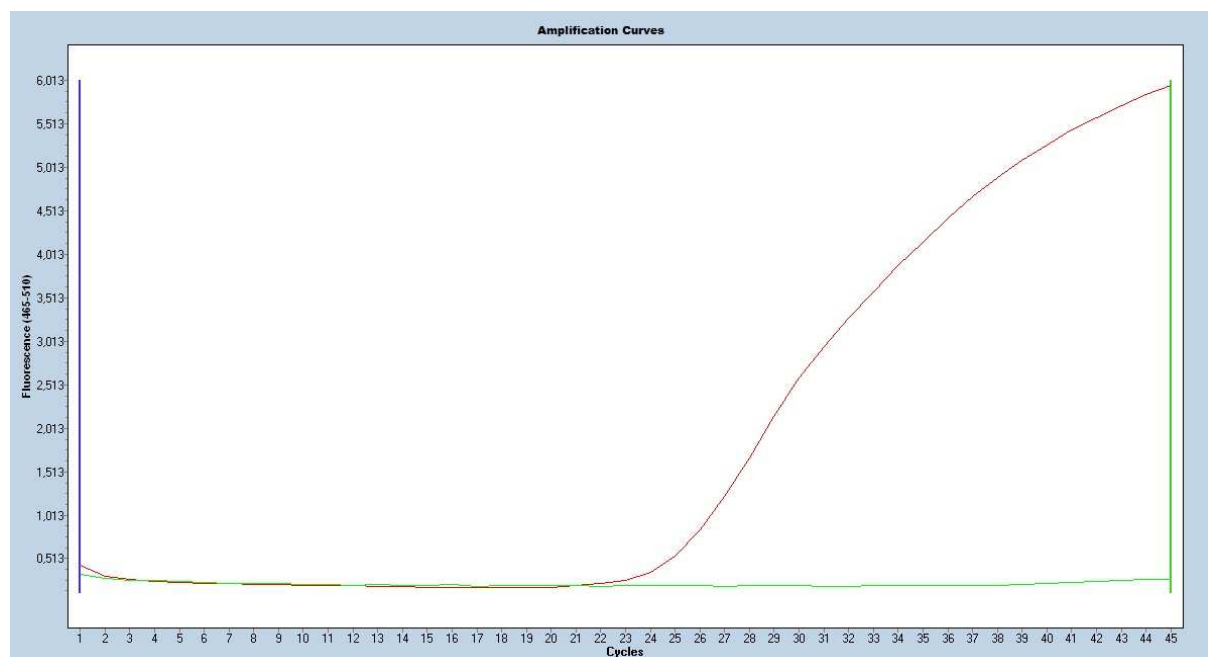


Fig. 1: Correct performance of the **Positive Control** and **No Template Control** on the cobas z 480 Analyzer (detection channel 465/510)

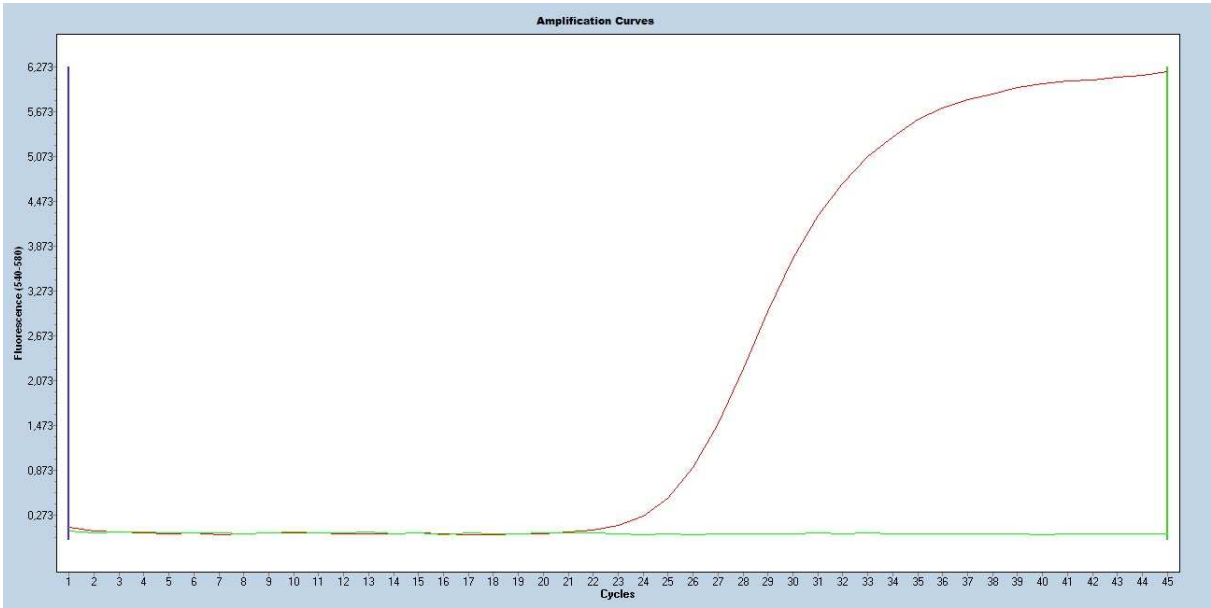


Fig. 2: Correct performance of the **Positive Control** and **No Template Control** on the cobas z 480 Analyzer (detection channel 540/580)

11. Interpretation of the Results

The sample evaluation of the results takes place as per table 10.

Tab. 10: Interpretation of the results (e.g. LightCycler® 480II)

| Record | HLA-B27 | IC | Results |
|------------------|----------|----------|------------------|
| Example sample 1 | Positive | Positive | HLA-B27 positive |
| Example sample 2 | Negative | Positive | HLA-B27 negative |
| Example sample 3 | Positive | Negative | Invalid |
| Example sample 4 | Negative | Negative | Invalid |

The PCR run cannot be evaluated, if the **Positive Control** displays no amplification in the detection system. The whole PCR run must be repeated.

If the **Positive Control** in the detection system and in the IC system shows the amplification in line with the specification, but the sample (see Tab. 10, example sample 2) does not show an amplification in the detection system, it means that the sample contains human DNA, but this sample is HLA-B27 negative.

If the **Positive Control** in the detection system and in the IC system shows the amplification in line with the specification, but the sample (see Tab. 10, example sample 3 or example sample 4) does not show an amplification of the IC, then either the DNA was not added or an unsuitable template DNA (quality, PCR inhibitor) was used. The extracted sample should be re-amplified or the isolation and cleaning of the sample should be improved.

The proof of the **Positive Control** and the human samples must therefore, be positive in the detection channel IC (see section 10, Quality control).

12. Limitations of the method

7. The test is not to be used for tissue typing.
8. The results which are obtained must always be interpreted in combination with the complete clinical symptoms.
9. This test is only valid for whole blood EDTA samples.
10. The listed HLA-B27 types (HLA-B*27:01 to 21, 23 to 152 and 154 to 164) were determined as 100 % detectable by using the *in silico* examination with the IPD-IMGT/HLA database (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/) (version: October 2017). A regular comparison with the database is carried out, however it is not possible to guarantee whether additional data was added or removed from the database in the mean time.
11. The presence of PCR inhibitors cannot lead to evaluable results.
12. The German Genetic Diagnostics Act (GenDG) requires a thorough explanation and written consent of the patients for all genetic analyses in accordance with the GenDG.

13. Performance characteristics

13.1 Clinical performance characteristics

The RIDA®GENE HLA-B27 assay was validated for human whole blood EDTA samples. Please note that at the correct filling level, the EDTA concentration in a standard blood collection tubes (e.g. Sarstedt Monovette® KE/9 ml) must amount to 1.6 mg per ml of whole blood. While testing interfering substances, a concentration of 1.8 mg per ml K₂EDTA was added in addition. No interference with the following substances was detected (see Tab. 11):

Tab. 11: List of substances and concentrations used in the test










| Substances | Concentrations |
|---------------------|----------------|
| Heparin | 15 U/ml |
| Cholesterol | 3.0 mg/ml |
| Bilirubin | 0.1 mg/ml |
| Hemoglobin | 0.2 mg/ml |
| K ₂ EDTA | 3.4 mg/ml |

14. Version history

| Version number | Chapter and designation |
|----------------|-------------------------|
| 5/18/2018 | Release version |

15. Explanation of symbols

General symbols

| | |
|---|----------------------------------|
|  | In-vitro diagnostics |
|  | Observe the instructions for use |
|  | Lot number |
|  | Use before |
|  | Storage temperature |
|  | Article number |
|  | Number of tests |
|  | Date of manufacture |
|  | Manufacturer |

16. Literature

9. Boyle L, Goodall J, Opat S, Gaston JS. The recognition of HLA-B27 by human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2001; 167:2619-24.
10. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing Spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973; 904-7.
11. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-6.
12. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2014; 53(4): 650-57.
13. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J, Wordsworth BP, Cornélis F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann. Rheum. Dis* 1996; 55(4): 268-70.
14. López-Larrea C, Conzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Current Opinion in Thrumatology* 1996; 8:296-308.
15. Brewerton DA, Nicholls A, Caffrey M, Waters D, James DCO. HL-A 27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis. *Lancet* 1974; 956-58.
16. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.

RIDA®GENE HLA-B27

REF PY0205

1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. Con el kit RIDA®GENE HLA-B27, se detectan de manera cualitativa los alelos HLA-B27 en el ADN genómico aislado de muestras de sangre entera humana con EDTA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. El kit RIDA®GENE HLA-B27 está diseñado para auxiliar en el diagnóstico de pacientes con sospecha de espondilitis anquilosante (enfermedad de Bechterew) y otras enfermedades autoinmunes. **El ensayo no debe usarse para la tipificación tisular.**

Con los cebadores de secuencia específica se detectarán teóricamente (*in silico*) los siguientes subtipos de HLA-B27: HLA-B*27:01 a 21, 23 a 152 y 154 a 164. De estos, los siguientes subtipos se detectaron *in vitro*: HLA-B*27:01 a 05, 08 a 10, 12, 14, 23 y 26.

2. Resumen y descripción del ensayo

Los antígenos leucocitarios humanos B27 (HLA-B27) son antígenos de superficie celular del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, y están codificados en el cromosoma 6. Su labor consiste en presentar antígenos microbianos a los linfocitos T. Casi todas las células nucleadas del cuerpo tienen moléculas HLA de clase I.¹ En los portadores de alelos HLA-B27 se presupone una asociación con enfermedades reumáticas inflamatorias específicas, con la espondiloartrosis (SpA) y, en particular, con la espondilitis anquilosante (AS).^{2,3} La asociación en la población caucásica es especialmente pronunciada, con una prevalencia de 90 a 95 % del HLA-B27 en pacientes con AS.^{4,5} La prevalencia del HLA-B27 en la población total varía significativamente entre los grupos étnicos.⁶ La AS es una inflamación reumática crónica que afecta principalmente la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas. Otras enfermedades reumáticas asociadas con el HLA-B27 son el síndrome de Reiter, la uveítis anterior aguda y la enfermedad intestinal inflamatoria.⁷

A pesar de la intensa labor de investigación, aún se desconoce el mecanismo patogénico mediante el cual el HLA-B27 causa una mayor susceptibilidad al desarrollo de artritis.

3. Principio del ensayo

Con el kit RIDA®GENE HLA-B27, se detectan de manera cualitativa los alelos HLA-B27 en el ADN genómico aislado de muestras de sangre entera humana con EDTA mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Después de aislar el ADN, se amplifican el fragmento genético específico y una secuencia genética humana (IC) como gen de referencia (si está disponible). Las secuencias diana amplificadas se detectan con sondas de hidrólisis con un desactivador en un extremo y una marca de fluorescencia reportera (fluoróforo) en el otro extremo. La sonda se hibrida con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq-polymerase** separa el reportero del desactivador. El reportero emite una señal de fluorescencia que es detectada por la unidad óptica de un dispositivo de PCR en tiempo real. La señal de fluorescencia aumenta con la cantidad de amplicones formados.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (Los reactivos en un kit son suficientes para 100 determinaciones)

| Código del kit | Reactivos | Cantidad | | Color del tapón |
|----------------|---------------------|----------|---------|-----------------|
| 1 | Reaction mix | 2x | 1050 µl | amarillo |
| 2 | Taq polymerase | 1x | 80 µl | rojo |
| N | No template control | 1x | 450 µl | blanco |
| P | Positive control | 1x | 200 µl | azul |

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben almacenarse lejos de la luz a -20 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes del uso (por ejemplo, en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelamiento/descongelamiento sin que esto afecte las propiedades del ensayo (si es necesario, pueden separarse alícuotas tras el primer descongelamiento y congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos durante la preparación de la PCR (2 - 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE HLA-B27 puede usarse con los siguientes búferes de extracción y dispositivos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo validado

| | |
|------------------------------------|--|
| Búfer de extracción | |
| Promega | Maxwell® RSC |
| Dispositivo de PCR en tiempo real: | |
| Roche | LightCycler® 480II Analizador cobas z 480 |
| Agilent Technologies | Mx3005P |
| Bio-Rad | CFX96™ |

Si desea usar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) al usar el LightCycler® 480II y el analizador cobas z 480
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, viales de reacción, papel aluminio)
- Centrífuga con rotor para viales o placas de reacción
- Mezclador vórtex
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntas de pipeta con filtros
- Guantes desechables sin talco

7. Precauciones para los usuarios

Para diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo puede ser realizado por personal de laboratorio capacitado.

Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Las instrucciones de uso para realizar este ensayo deben seguirse estrictamente. No pipetear muestras ni reactivos con la boca. Evitar el contacto con piel herida o membranas mucosas.

Llevar equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lavarse las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer ni beber en las zonas en que se manipulen las muestras.

- Asegúrese de que la extracción, la solución de PCR y la PCR estén en espacios separados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
- Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

- Elimine el kit de ensayo cuando llegue la fecha de caducidad.

Los usuarios son responsables de desechar todos los reactivos y materiales usados de forma correcta y responsable. Cumpla las normativas nacionales pertinentes en materia de desechos.

Para obtener más información, consulte las hojas de seguridad (SDS)

www.r-biopharm.com.

8. Recogida y almacenamiento de muestras

8.1 Almacenamiento de las muestras

Este ensayo fue desarrollado para el análisis de muestras de sangre entera humana con EDTA. Las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente hasta por 24 horas y a 2 - 8 °C hasta por 72 horas, hasta que el ADN se haya extraído.⁸ Debe evitarse la contaminación microbiológica de las muestras. El uso de muestras turbias, ictéricas, hemolíticas, lipémicas o termoinactivadas puede dar lugar a resultados falsos.

8.2 Preparación de las muestras

8.2.1 Aislamiento de ADN y sangre entera con EDTA

Para aislar el ADN de la sangre entera con EDTA se recomienda un kit de aislamiento de ADN o sistema de extracción de ADN disponible en el mercado (como el equipo Maxwell[®] RSC (Promega)). Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Cuando se use el equipo Maxwell[®] RCS (Promega), se recomienda mezclar las muestras de sangre durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente. Para la preparación de las muestras, deben añadirse 30 µl de proteinasa K a un vial de reacción de 1,5 ml. También deben añadirse 200 µl de la muestra de sangre y 300 µl del búfer de lisis. Agite la solución en el mezclador vórtex durante 10 segundos e incube a 56 °C durante 20 minutos. Para la extracción deben usarse 100 µl del búfer de elución. Deben seguirse las instrucciones adicionales del fabricante.

9. Ejecución del ensayo

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Para la PCR debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control).

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte la Tabla 3). Antes del uso, descongele, mezcle y centrifugue brevemente la [Reaction Mix], la [Taq Polymerase], el [No Template Control] y el [Positive Control]. Refrigere siempre todos los reactivos durante las etapas del trabajo (2 - 8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para 10 reacciones

| Código del kit | Componentes de la mezcla maestra | Cantidad por reacción | 10 reacciones (más 10 %) |
|----------------|----------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | Reaction mix | 19,3 µl | 212,3 µl |
| 2 | Taq polymerase | 0,7 µl | 7,7 µl |
| | Total | 20,0 µl | 220,0 µl |

Mezcle la mezcla maestra y, finalmente, centrifugue durante un breve lapso.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de la mezcla maestra en los respectivos viales de reacción (viales o placas).

No template control: Añada 5 µl del No Template Control a la mezcla maestra preparada.

Muestra: Añada 5 µl del extracto de ADN a la mezcla maestra preparada de las reacciones de muestra.

Control positivo: Añada 5 µl de Positive Control a la mezcla de reacción preparada en el vial de reacción suministrado.

Tape los viales o placas de reacción, centrifugue brevemente y transfiera al dispositivo de PCR en tiempo real. Comience la PCR de acuerdo a los parámetros del dispositivo (consulte la Tabla 4, la Tabla 5, la Tabla 6 y la Tabla 7).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 4: Perfil de ADN por PCR en tiempo real para el LightCycler® 480II y el analizador cobas z 480

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| <u>PCR</u> Desnaturalización | 10 s, 95 °C |
| Hibridación/Extensión | 15 s, 60 °C |
| Transición/Rampa de temperatura | Máxima |

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Tabla 5: Perfil de ADN por PCR en tiempo real de Mx3005P y CFX96™

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| <u>PCR</u> Desnaturalización | 15 s, 95 °C |
| Hibridación/Extensión | 30 s, 60 °C |
| Transición/Rampa de temperatura | Máxima |

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real debe usarse solo para ensayos de ADN cuando se combinen en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 6: Perfil universal de ADN por PCR en tiempo real para el LightCycler® 480II y el analizador cobas z 480

| | |
|---------------------------------|---------------|
| <u>Transcripción inversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Desnaturalización inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| <u>PCR</u> Desnaturalización | 10 s, 95 °C |
| Hibridación/Extensión | 15 s, 60 °C |
| Transición/Rampa de temperatura | Máxima |

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Tabla 7: Perfil universal de ADN por PCR en tiempo real de Mx3005P y CFX96™

| | |
|---------------------------------|---------------|
| <u>Transcripción inversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Desnaturalización inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| <u>PCR</u> Desnaturalización | 15 s, 95 °C |
| Hibridación/Extensión | 30 s, 60 °C |
| Transición/Rampa de temperatura | Máxima |

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 8: Selección de canales de detección adecuados

| Dispositivo de PCR en tiempo real | Registro | Canal de detección | Comentario |
|-----------------------------------|----------|--------------------|---|
| Roche LightCycler® 480II | HLA-B27 | 465/510 | Se requiere el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) |
| | IC | 533/580 | |
| Analizador cobas z 480 Roche | HLA-B27 | 465/510 | Se requiere el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) |
| | IC | 540/580 | |
| Agilent Techn. Mx3005P | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |
| Bio-Rad CFX96™ | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |

10. Control de calidad

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real respectivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El **No Template Control** y el **Positive Control** deben figurar en cada corrida de PCR y tener resultados correctos (consulte la Tabla 9).

Tabla 9: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

| Muestra | Resultados | | Gen diana Ct |
|---------------------|------------|----------|--|
| | HLA-B27 | IC | |
| Positive control | Positivo | Positivo | Consulte el certificado de garantía de calidad |
| No Template Control | Negativo | Negativo | 0 |

Si uno de los dos controles, **No Template Control** o **Positive Control**, no concuerda con las especificaciones, debe repetirse la corrida de PCR entera.

El **Positive Control** contiene una plantilla sintética de una secuencia genética de HLA-B27 y una secuencia genética humana IC. La prueba del **Positive Control** y de las muestras humanas deben ser, por lo tanto, positivas en el canal de detección IC.

Si los valores especificados no se cumplen, verifique lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Desempeño funcional de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Ejecución correcta del ensayo

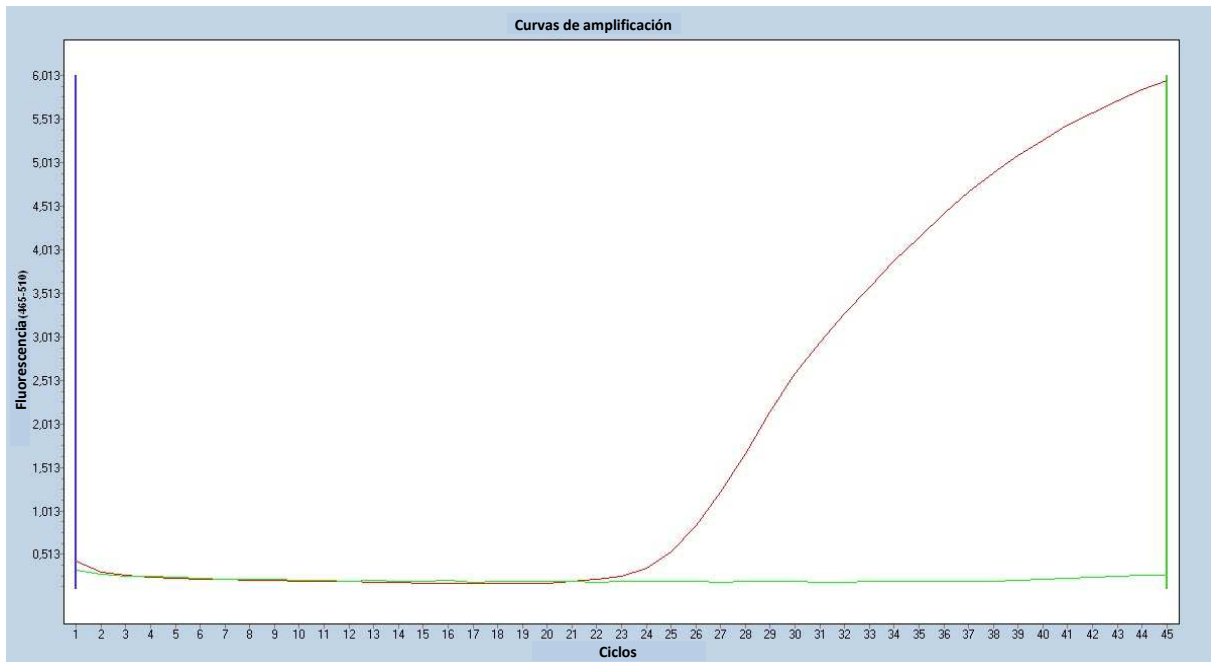


Figura 1: Desempeño correcto del **Positive Control** y el **No Template Control** en el analizador cobas z 480 (canal de detección 465/510)

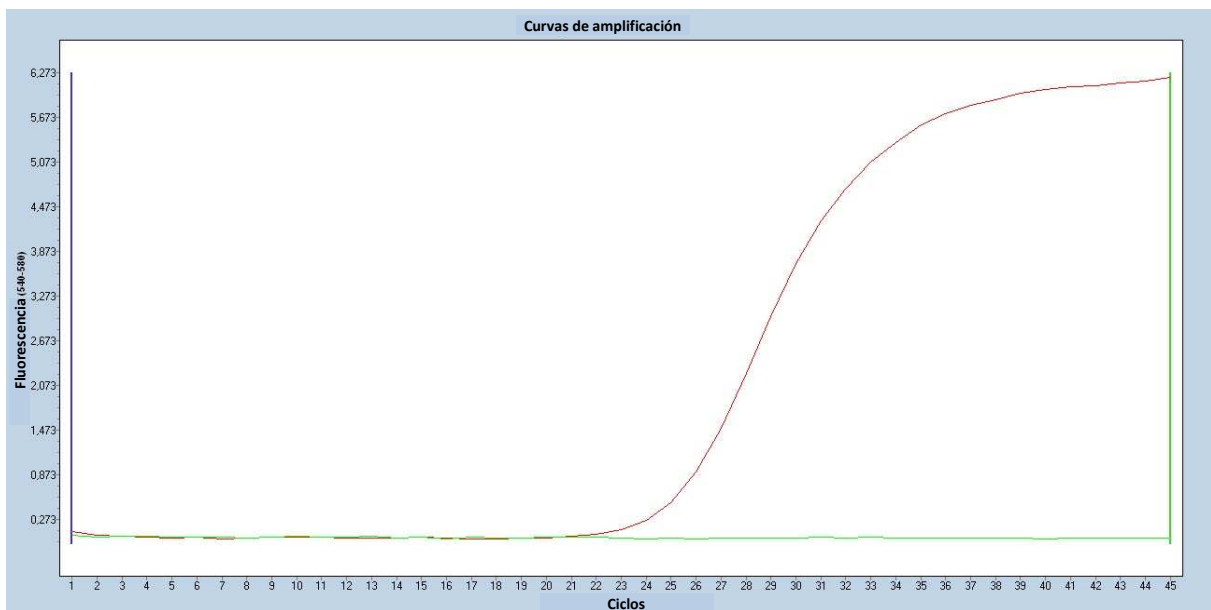


Figura 2: Desempeño correcto del **Positive Control** y el **No Template Control** en el analizador cobas z 480 (canal de detección 540/580)

11. Interpretación de los resultados

La evaluación de los resultados de las muestras se realiza conforme a la tabla 10.

Tabla 10: Interpretación de los resultados (p. ej., LightCycler® 480II)

| Registro | HLA-B27 | IC | Resultados |
|----------------------|----------|----------|--------------------|
| Muestra de ejemplo 1 | Positivo | Positivo | Positivo a HLA-B27 |
| Muestra de ejemplo 2 | Negativo | Positivo | Negativo a HLA-B27 |
| Muestra de ejemplo 3 | Positivo | Negativo | No válido |
| Muestra de ejemplo 4 | Negativo | Negativo | No válido |

La corrida de PCR no puede evaluarse si el **Positive Control** no presenta amplificación en el sistema de detección. Debe repetirse la corrida de PCR entera.

Si el **Positive Control** en el sistema de detección y en el sistema IC presenta amplificación concordante con la especificación, pero la muestra (consulte la Tabla 10, muestra de ejemplo 2) no presenta amplificación en el sistema de detección, significa que la muestra contiene ADN humano, pero esta muestra es negativa a HLA-B27.

Si el **Positive Control** en el sistema de detección y en el sistema IC presenta amplificación concordante con la especificación, pero la muestra (consulte la Tabla 10, muestra de ejemplo 3 o muestra de ejemplo 4) no presenta amplificación del IC, entonces o no se añadió el ADN o se usó una plantilla de ADN inadecuada (calidad, inhibidor de la PCR). La muestra extraída debe amplificarse de nuevo o se deben mejorar el aislamiento y la limpieza de la muestra.

La prueba del **Positive Control** y de las muestras humanas deben ser, por lo tanto, positivas en el canal de detección IC (consulte la sección 10, Control de calidad).

12. Limitaciones del método

13. El ensayo no debe usarse para la tipificación tisular.
14. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico completo.
15. Este ensayo es válido solo para muestras de sangre entera con EDTA.
16. Se determinó que los tipos de HLA-B27 enumerados (HLA-B*27:01 a 21, 23 a 152 y 154 a 164) son 100 % detectables mediante evaluación *in silico* con la base de datos IPD-IMGT/HLA (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/) (versión: octubre de 2017). Se realiza una comparación regular con la base de datos, sin embargo, no es posible garantizar si mientras tanto se añadieron o eliminaron datos de la base de datos.
17. La presencia de inhibidores de la PCR no puede conducir a resultados evaluables.
18. La Ley alemana en materia de diagnóstico genético (GenDG) exige una explicación exhaustiva y un consentimiento por escrito de los pacientes para todos los análisis genéticos, de conformidad con la GenDG.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento clínico

El ensayo RIDA®GENE HLA-B27 fue validado para muestras de sangre entera humana con EDTA. Tenga en cuenta que al nivel de llenado correcto, la concentración de EDTA en tubos para recolección de sangre normales (p. ej., Sarstedt Monovette® KE/9 ml) debe equivaler a 1,6 mg por ml de sangre entera. Al analizar sustancias interferentes, se añadió un exceso de 1,8 mg por ml de K₂EDTA. No se detectó ninguna interferencia con las siguientes sustancias (consultar la Tabla 11):

Tabla 11: Lista de sustancias y concentraciones usadas en el ensayo










| Sustancias | Concentraciones |
|---------------------|-----------------|
| Heparina | 15 U/ml |
| Colesterol | 3,0 mg/ml |
| Bilirrubina | 0,1 mg/ml |
| Hemoglobina | 0,2 mg/ml |
| K ₂ EDTA | 3,4 mg/ml |

14. Historial de versiones

| Número de versión | Capítulo y designación |
|-------------------|------------------------|
| 18/05/2018 | Versión de lanzamiento |

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

| | |
|---|----------------------------------|
|  | Diagnósticos <i>in vitro</i> |
|  | Respete las instrucciones de uso |
|  | Número de lote |
|  | Fecha de caducidad |
|  | Temperatura de almacenamiento |
|  | Número de artículo |
|  | Número de ensayos |
|  | Fecha de fabricación |
|  | Fabricante |

16. Bibliografía

17. Boyle L, Goodall J, Opat S, Gaston JS. The recognition of HLA-B27 by human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2001; 167:2619-24.
18. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing Spondylitis and HL-A 27. *Lance* 1973; 904-7.
19. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-6.
20. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2014; 53(4): 650-57.
21. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J, Wordsworth BP, Cornélis F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann. Rheum. Dis* 1996; 55(4): 268-70.
22. López-Larrea C, Conzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Current Opinion in Thrumatology* 1996; 8:296-308.
23. Brewerton DA, Nicholls A, Caffrey M, Waters D, James DCO. HL-A 27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis. *Lance* 1974; 956-58.
24. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.

RIDA®GENE HLA-B27

REF PY0205

1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le kit RIDA®GENE HLA-B27 permet la détection qualitative d'allèles HLA-B27 dans de l'ADN génomique isolé à partir d'échantillons de sang total humain EDTA en utilisant la réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel. Le kit RIDA®GENE HLA-B27 est conçu pour faciliter le diagnostic de patients chez qui une spondylarthrite ankylosante (maladie de Bechterew) et autres maladies auto-immunes sont suspectées. **Le test ne doit pas être utilisé pour le typage tissulaire.**

Les sous-types de HLA-B27 suivants sont théoriquement détectés (*in silico*) avec les amorces des séquences spécifiques suivantes : HLA-B*27:01 à 21, 23 à 152 et 154 à 164. Parmi ces sous-types, les sous-types suivants ont été détectés *in vitro* : HLA-B*27:01 à 05, 08 à 10, 12, 14, 23 et 26.

2. Résumé et explication du test

L'antigène B27 des leucocytes humains (HLA-B27) est un antigène de surface de classe I, codé par le complexe majeur d'histocompatibilité, sur le chromosome 6. Son rôle consiste à présenter les antigènes microbiens aux lymphocytes T. La quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme contiennent des molécules de HLA de classe I¹.

Il est admis que les allèles HLA-B27 sont associés à certaines maladies rhumatoïdes inflammatoires, la spondylarthrite (SpA), en particulier la spondylarthrite ankylosante (SA)^{2,3}. Cette association est particulièrement prononcée dans la population caucasienne avec une prévalence de 90 à 95 % de HLA-B27 chez les patients atteints de SA^{4,5}. La prévalence de HLA-B27 dans la population totale varie significativement d'un groupe ethnique à l'autre⁶. La SA est une inflammation rhumatoïde chronique qui touche principalement la colonne vertébrale et les articulations sacro-iliaques. D'autres maladies rhumatismales associées à HLA-B27 sont notamment le syndrome de Reiter, l'uvéite antérieure aiguë et la maladie intestinale inflammatoire⁷.

Le mécanisme pathogène selon lequel le HLA-B27 provoque une augmentation de la susceptibilité au développement d'une maladie arthritique est encore méconnu malgré des recherches intensives.

3. Principe du test

Le kit RIDA®GENE HLA-B27 permet la détection qualitative d'allèles HLA-B27 dans de l'ADN génomique isolé à partir d'échantillons de sang total humain EDTA en utilisant la réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel.

Après isolation de l'ADN, le fragment spécifique du gène et une séquence de gène humain (IC) en tant que gène de référence (si disponible) sont amplifiés.

Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes pour hydrolyse fixées à une extrémité avec l'extincteur et d'un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec la quantité d'amplicons formés.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de faire 100 déterminations)

| Code du kit | Réactifs | Quantité | | Couleur du capuchon |
|-------------|---------------------|----------|---------|---------------------|
| 1 | Reaction Mix | 2x | 1050 µl | jaune |
| 2 | Taq polymerase | 1x | 80 µl | rouge |
| N | No template control | 1x | 450 µl | blanc |
| P | Positive control | 1x | 200 µl | bleu |

5. Instructions de conservation des réactifs

- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière. Dans ces conditions, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 20 fois sans altérer les propriétés du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et congeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 à 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel RIDA®GENE HLA-B27 peut être utilisé avec les tampons d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 :Équipement validé

| | |
|-----------------------------------|---|
| Tampon d'extraction | |
| Promega | Maxwell® RSC |
| Dispositif de PCR en temps réel : | |
| Roche | LightCycler® 480II Analyseur cobas z 480 |
| Agilent Technologies | Mx3005P |
| Bio-Rad | CFX96™ |

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) lors de l'utilisation de LightCycler® 480II et de l'analyseur cobas z 480
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, flacons de réaction, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- Mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes pour pipette dotées de filtres
- Gants jetables non poudrés

7. Mesures de précaution

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé.

Respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Les instructions d'exécution du test doivent être rigoureusement appliquées. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.

- L'extraction, la préparation de la solution de PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.

- Éliminer le kit de test à l'échéance de la date de péremption.

Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Respecter les réglementations nationales applicables en matière d'élimination.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Conservation des échantillons

Ce test a été développé dans le but d'examiner des échantillons de sang total humain EDTA. Les échantillons doivent être conservés à température ambiante pendant 24 heures maximum et entre 2 et 8 °C pendant 72 heures maximum avant l'extraction de l'ADN⁸. Il faut éviter toute contamination microbienne des échantillons. L'utilisation d'échantillons inactivés par la chaleur, lipémiques, hémolytiques, ictériques ou troubles risque de donner lieu à des résultats erronés.

8.2 Préparation des échantillons

8.2.1 Isolation de l'ADN et sang total EDTA

Pour l'isolation de l'ADN du sang total EDTA, il est recommandé d'utiliser un kit d'isolation d'ADN ou un système d'extraction d'ADN du commerce (p. ex., Instrument Maxwell[®] RSC [Promega]). Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Lors de l'utilisation d'instruments Maxwell[®] RCS (Promega), il est recommandé de mélanger les échantillons de sang pendant au moins 5 minutes à température ambiante. Pour préparer les échantillons, il faut ajouter 30 µl de Protéinase K dans un flacon de réaction de 1,5 ml. Il faut aussi ajouter 200 µl de l'échantillon de sang et 300 µl de tampon de lyse. Agiter la solution au Vortex pendant 10 secondes et incubé à 56 °C pendant 20 minutes. Utiliser 100 µl de tampon d'élution pour l'extraction. Il convient de respecter les autres instructions du fabricant.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) pour la PCR.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir tableau 3). Avant l'utilisation, décongeler, mélanger et centrifuger brièvement le [Reaction Mix], le [Taq Polymerase], le [No Template Control] et le [Positive Control]. Toujours refroidir tous les réactifs pendant les étapes de travail (2 à 8 °C).

Tableau 3 : Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions

| Code du kit | Composants du mélange maître | Quantité par réaction | 10 réactions (plus 10 %) |
|-------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | Reaction Mix | 19,3 µl | 212,3 µl |
| 2 | Taq polymerase | 0,7 µl | 7,7 µl |
| | Total | 20,0 µl | 220,0 µl |

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans les flacons de réaction correspondants (tubes ou plaques).

Contrôle sans matrice : Ajouter 5 µl de No Template Control au mélange maître préparé.

Échantillon : Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître préparé de réactions de l'échantillon.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de Positive Control au mélange maître préparé dans le flacon de réaction fourni.

Fermer les flacons ou les plaques de réaction, les centrifuger brièvement et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon les réglages du dispositif (voir tableaux 4, 5, 6 et 7).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 4 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour le LightCycler® 480II et l'analyseur cobas z 480

| | |
|--|--------------|
| Dénaturation initiale | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Dénaturation | 10 s, 95 °C |
| Hybridation/extension | 15 s, 60 °C |
| Vitesse de transition de température / Vitesse de montée | Maximale |

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P et CFX96™

| | |
|---|--------------|
| Dénaturation initiale | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Dénaturation | 15 s, 95 °C |
| Hybridation/extension | 30 s, 60 °C |
| Vitesse de transition de température / Vitesse de montée | Maximale |

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel ADN **RIDA®GENE** et **ARN RIDA®GENE** sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 6 : Profil universel de PCR en temps réel de l'ADN pour le LightCycler® 480II et l'analyseur cobas z 480

| | |
|---|---------------|
| <u>Transcription inverse</u> | 10 min, 58 °C |
| Dénaturation initiale | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Dénaturation | 10 s, 95 °C |
| Hybridation/extension | 15 s, 60 °C |
| Vitesse de transition de température / Vitesse de montée | Maximale |

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P et CFX96™

| | |
|---|---------------|
| <u>Transcription inverse</u> | 10 min, 58 °C |
| Dénaturation initiale | 1 min, 95 °C |
| Cycles | 45 cycles |
| <u>PCR</u> Dénaturation | 15 s, 95 °C |
| Hybridation/extension | 30 s, 60 °C |
| Vitesse de transition de température / Vitesse de montée | Maximale |

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 8 : Sélection des canaux de détection adéquats

| Dispositif de PCR en temps réel | Enregistrement | Canal de détection | Commentaire |
|---------------------------------|----------------|--------------------|--|
| Roche LightCycler® 480II | HLA-B27 | 465/510 | Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire |
| | IC | 533/580 | |
| Analyseur Roche cobas z 480 | HLA-B27 | 465/510 | Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire |
| | IC | 540/580 | |
| Agilent Techn. Mx3005P | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |
| Bio-Rad CFX96™ | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |

10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel correspondant conformément aux instructions du fabricant.

Les **No Template Control** et **Positive Control** doivent être indiqués pour chaque exécution de PCR et doivent obtenir des résultats corrects (voir tableau 9).

Tableau 9 : Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes :

| Échantillon | Résultats | | Gène Ct cible |
|---------------------|-----------|---------|-------------------------------------|
| | HLA-B27 | IC | |
| Positive control | Positif | Positif | Voir Certificat d'assurance qualité |
| No Template Control | Négatif | Négatif | 0 |

Si l'un des deux contrôles, **No Template Control** ou **Positive Control** ne correspond pas aux spécifications, il faut recommencer l'exécution de la PCR dans son ensemble.

Le **Positive Control** contient une matrice synthétique d'une séquence de gène HLA-B27 et une séquence de gène humain IC. Les résultats du **Positive Control** et des échantillons humains doivent donc être positifs dans le canal de détection IC.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Performances fonctionnelles de l'équipement utilisé (par ex. étalonnage)
- Réalisation du test correcte

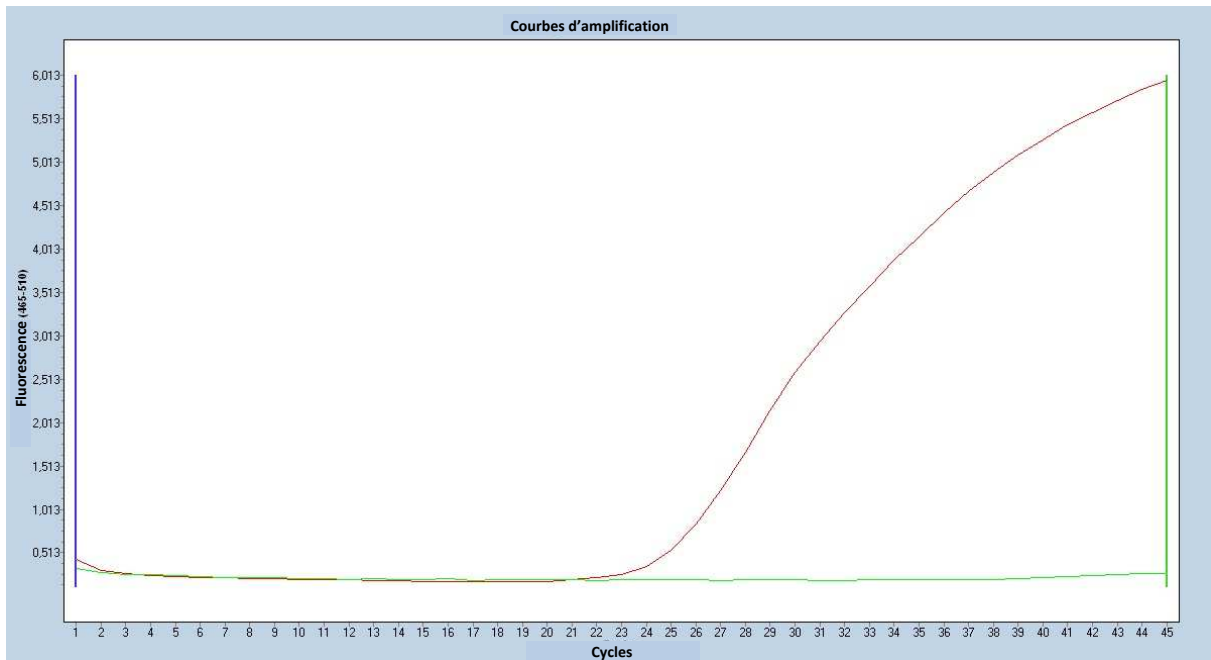


Figure 1 : Performance correcte du **Positive Control** et du **No Template Control** avec l'analyseur cobas z 480 (canal de détection 465/510)

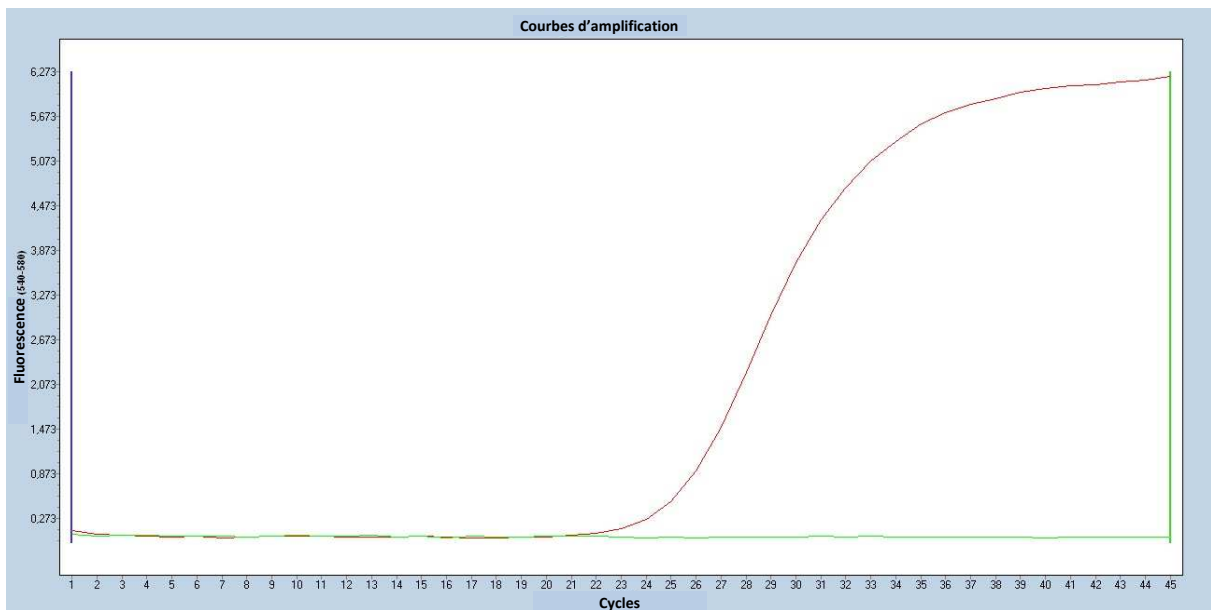


Figure 2 : Performance correcte du **Positive Control** et du **No Template Control** avec l'analyseur cobas z 480 (canal de détection 540/580)

11. Interprétation des résultats

Les résultats de l'échantillon sont évalués conformément au tableau 10.

Tableau 10: Interprétation des résultats (p. ex., LightCycler® 480II)

| Enregistrement | HLA-B27 | IC | Résultats |
|-----------------------|---------|---------|----------------------|
| Exemple échantillon 1 | Positif | Positif | Positif pour HLA-B27 |
| Exemple échantillon 2 | Négatif | Positif | Négatif pour HLA-B27 |
| Exemple échantillon 3 | Positif | Négatif | Non valide |
| Exemple échantillon 4 | Négatif | Négatif | Non valide |

Le résultat de la PCR ne peut pas être évalué si le **Positive Control** ne présente aucune amplification dans le système de détection. Il faut recommencer la PCR dans son ensemble.

Si le **Positive Control** montre une amplification conforme aux spécifications dans le système de détection et dans le système IC, mais que l'échantillon (voir tableau 10, exemple d'échantillon 2) ne montre pas d'amplification dans le système de détection, cela signifie que l'échantillon contient de l'ADN humain, mais que cet échantillon est négatif pour le HLA-B27.

Si le **Positive Control** montre une amplification conforme aux spécifications dans le système de détection et dans le système IC, mais que l'échantillon (voir tableau 10, exemple d'échantillon 3 ou 4) ne montre pas d'amplification de l'IC, cela peut indiquer que l'ADN n'a pas été ajouté ou qu'une matrice ADN inappropriée (qualité, inhibiteur de la PCR) a été utilisée. Il faut renouveler l'amplification de l'échantillon extrait ou améliorer l'isolation et le nettoyage de l'échantillon.

Les résultats du **Positive Control** et des échantillons humains doivent donc être positifs dans le canal de détection IC (voir section 10, Contrôle qualité).

12. Limites de la méthode

19. Le test ne doit pas être utilisé pour le typage tissulaire.
20. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
21. Ce test est seulement valide pour des échantillons de sang total EDTA.
22. Les types de HLA-B27 indiqués (HLA-B*27:01 à 21, 23 à 152 et 154 à 164) ont été déterminés comme pouvant être à 100 % détectés par un examen *in silico* avec la base de données IPD-IMGT/HLA (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/) (version : octobre 2017). Une comparaison régulière avec la base de données est effectuée, mais il n'est toutefois pas possible de garantir que des données supplémentaires n'ont pas été ajoutées ou retirées de la base de données entre-temps.
23. La présence d'inhibiteurs de la PCR ne permet pas d'évaluer les résultats.
24. La loi allemande sur le diagnostic génétique (GenDG) exige une explication approfondie et un consentement écrit des patients conforme à GenDG pour toutes les analyses génétiques.

13. Performances

13.1 Performances cliniques

Le test RIDA®GENE HLA-B27 a été validé pour les échantillons de sang total humain EDTA. À noter que pour le niveau de remplissage correct, la concentration d'EDTA dans les tubes de prélèvement de sang standards (par ex., Sarstedt Monovette® KE/9 ml) doit être de 1,6 mg par ml de sang total. Pour les tests sur les substances parasites, une concentration de 1,8 mg de K₂EDTA par ml a été ajoutée en sus. Aucune interférence avec les substances suivantes n'a été décelée (voir tableau 11) :

Tableau 11 : Liste des substances et concentrations utilisées dans le test










| Substances | Concentrations |
|---------------------|----------------|
| Héparine | 15 U/ml |
| Cholestérol | 3,0 mg/ml |
| Bilirubine | 0,1 mg/ml |
| Hémoglobine | 0,2 mg/ml |
| K ₂ EDTA | 3,4 mg/ml |

14. Historique des versions

| Numéro de version | Chapitre et désignation |
|-------------------|-----------------------------|
| 18/05/2018 | Version pour la publication |

15. Signification des symboles

Symboles généraux

| | |
|---|-----------------------------|
|  | Diagnostic <i>in vitro</i> |
|  | Respecter le mode d'emploi |
|  | Numéro de lot |
|  | Date de péremption |
|  | Température de conservation |
|  | Référence |
|  | Nombre de tests |
|  | Date de fabrication |
|  | Fabricant |

16. Bibliographie

25. Boyle L, Goodall J, Opat S, Gaston JS. The recognition of HLA-B27 by human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2001; 167:2619-24.
26. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing Spondylitis and HL-A 27. *Lance* 1973; 904-7.
27. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-6.
28. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2014; 53(4): 650-57.
29. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J, Wordsworth BP, Cornélis F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann. Rheum. Dis* 1996; 55(4): 268-70.
30. López-Larrea C, Conzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Current Opinion in Thrumatology* 1996; 8:296-308.
31. Brewerton DA, Nicholls A, Caffrey M, Waters D, James DCO. HL-A 27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis. *Lance* 1974; 956-58.
32. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.

RIDA®GENE HLA-B27

REF PY0205

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. Il kit RIDA®GENE HLA-B27 viene usato per la determinazione qualitativa degli alleli dell'antigene HLA-B27 nel DNA genomico, isolati da campioni di sangue intero umano con EDTA, mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) real-time. Il kit RIDA®GENE HLA-B27 è concepito per fungere da ausilio nella diagnosi di pazienti con sospetta spondilite anchilosante (morbo di Bechterew) e di altre malattie autoimmuni. **Il test non deve essere utilizzato per la tipizzazione tissutale.**

Teoricamente è possibile determinare (*in silico*) i seguenti sottotipi di HLA-B27 con i primer specifici per la sequenza: HLA-B*27:01-21, 23-152 e 154-164. Fra questi, i seguenti sottotipi sono stati determinati *in vitro*: HLA-B*27:01-05, 08-10, 12, 14, 23 e 26.

2. Sintesi e spiegazione del test

L'antigene leucocitario umano B27 (HLA-B27) è un antigene esposto sulla superficie delle cellule del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I ed è codificato sul cromosoma 6. Il suo compito è presentare gli antigeni microbici alle cellule T. Quasi tutte le cellule nucleate dell'organismo hanno molecole HLA di classe I.¹ Un'associazione con malattie infiammatorie e reumatiche specifiche, spondiloartrite (SpA), in particolare spondilite anchilosante (SA) costituisce un dato di fatto nei portatori degli alleli HLA-B27.^{2,3} L'associazione nella popolazione caucasica è particolarmente pronunciata, con una prevalenza del 90-95% dell'antigene HLA-B27 nei pazienti con SA.^{4,5} La prevalenza dell'HLA-B27 nella popolazione totale varia in maniera significativa tra i diversi gruppi etnici.⁶ La SA è un'inflammatione cronica, reumatica, che interessa soprattutto la colonna vertebrale e le articolazioni sacroiliache. Altre malattie reumatiche associate all'HLA-B27 includono la Sindrome di Reiter, l'uveite anteriore acuta e la malattia intestinale infiammatoria.⁷

Il meccanismo patogenetico in base al quale l'HLA-B27 causa un'aumentata predisposizione allo sviluppo di malattia artritica è ancora sconosciuto, nonostante l'intenso lavoro di ricerca.

3. Principio del test

Il kit RIDA®GENE HLA-B27 viene usato per la determinazione qualitativa degli alleli dell'antigene HLA-B27 nel DNA genomico, isolati da campioni di sangue intero umano con EDTA, mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) real-time. Dopo l'isolamento del DNA, il frammento di gene specifico e una sequenza genetica umana (IC) quale gene di riferimento (se disponibile) vengono sottoposti ad amplificazione.

Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi applicate a un'estremità con il quencher e a un marcatore reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale di fluorescenza che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

| Codice del kit | Reagenti | Quantità | | Colore del tappo |
|----------------|---------------------|----------|---------|------------------|
| 1 | Reaction mix | 2 | 1050 µl | giallo |
| 2 | Taq polymerase | 1 | 80 µl | rosso |
| N | No template control | 1 | 450 µl | bianco |
| P | Positive control | 1 | 200 µl | blu |

5. Istruzioni di conservazione

- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con attenzione prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2-8 °C).
- Il congelamento/scongelamento ripetuto fino a 20 volte non influisce sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e congelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (2-8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test per PCR real-time RIDA®GENE HLA-B27 è adatto per l'uso con i seguenti tamponi di estrazione e dispositivi per PCR real-time:

Tab. 2: Attrezzatura convalidata

| Tamponi di estrazione | |
|--------------------------------|--|
| Promega | Maxwell® RSC |
| Dispositivo per PCR real-time: | |
| Roche | LightCycler® 480II Analizzatore cobas z 480 |
| Agilent Technologies | Mx3005P |
| Bio-Rad | CFX96™ |

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) quando si utilizzano LightCycler® 480II e l'Analizzatore cobas z 480
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per provette o piastre di reazione
- Miscelatore con vorticolatore
- Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali per pipette con filtri
- Guanti monouso senza talco

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito solo da personale di laboratorio qualificato.

Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi

scrupolosamente alle istruzioni per l'uso per l'esecuzione del test. Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

- Assicurarsi che l'estrazione, la soluzione per PCR e la PCR avvengano in spazi separati per evitare contaminazione crociata.
- I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

- Dopo la data di scadenza smaltire il kit.

Gli utenti sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Seguire le norme nazionali sullo smaltimento.

Per ulteriori dettagli consultare le schede dati di sicurezza (SDS) alla pagina www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Conservazione dei campioni

Questo test è stato sviluppato per l'esame di campioni di sangue intero umano con EDTA. I campioni devono essere conservati a temperatura ambiente per un massimo di 24 ore e a 2-8 °C per un massimo di 72 ore fino all'estrazione del DNA.⁸ Evitare la contaminazione microbica dei campioni. L'uso di campioni inattivati dal calore, lipemici, emolitici, itterici o torbidi può dare risultati errati.

8.2 Preparazione dei campioni

8.2.1 Isolamento del DNA e sangue intero con EDTA

Per l'isolamento del DNA da sangue intero con EDTA si raccomanda un kit di isolamento del DNA o un sistema di estrazione del DNA disponibile in commercio (ad esempio Maxwell[®] RSC Instrument (Promega)). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Quando si utilizzano strumenti Maxwell[®] RCS (Promega), si raccomanda di miscelare i campioni di sangue per almeno 5 minuti a temperatura ambiente. Aggiungere 30 µl di proteinasi K a una provetta di reazione da 1,5 ml per la preparazione dei campioni. Aggiungere inoltre 200 µl dal campione di sangue e 300 µl dal tampone di lisi. Vorticare la soluzione per 10 secondi e incubare a 56 °C per 20 minuti. Per l'estrazione utilizzare 100 µl del tampone di eluizione. Attenersi alle ulteriori istruzioni del produttore.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo).

L'aggiunta di un ulteriore 10 % di volume alla master mix è consigliata per compensare la perdita della pipetta (vedere Tab. 3). Prima dell'uso, scongelare, miscelare e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq Polymerase**, il **No Template Control** e il **Positive Control**. Raffreddare tutti i reagenti durante le fasi di lavoro (2-8 °C).

Tab. 3: Esempio per il calcolo e la produzione di master mix per 10 reazioni

| Codice del kit | Componenti della master mix | Quantità per reazione | 10 reazioni (più 10%) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | Reaction mix | 19,3 µl | 212,3 µl |
| 2 | Taq polymerase | 0,7 µl | 7,7 µl |
| | Complessivamente | 20,0 µl | 220,0 µl |

Miscelare la master mix e quindi centrifugarla brevemente.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della master mix nelle rispettive provette di reazione (provette o piastre).

No template control: Aggiungere 5 µl del No Template Control alla master mix preparata.

Campione: Aggiungere 5 µl di estratto di DNA alla master mix delle reazioni campione preparata.

Controllo positivo: Aggiungere 5 µl di Positive Control per la master mix preparata nella provetta di reazione fornita.

Chiudere le provette o le piastre di reazione, centrifugare brevemente e trasferire nel dispositivo per PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni del dispositivo (Vedere Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo della PCR real-time per DNA

Tab. 4: Profilo della PCR real-time per DNA per LightCycler® 480II e Analizzatore cobas z 480

| | |
|---|--------------|
| Denaturazione iniziale | 1 min, 95 °C |
| Cicli | 45 cicli |
| <u>PCR</u> Denaturazione | 10 s, 95 °C |
| Appaiamento/Estensione | 15 s, 60 °C |
| Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa | Massima |

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 5: Profilo della PCR real-time per DNA per Mx3005P e CFX96™

| | |
|---|--------------|
| Denaturazione iniziale | 1 min, 95 °C |
| Cicli | 45 cicli |
| <u>PCR</u> Denaturazione | 15 s, 95 °C |
| Appaiamento/Estensione | 30 s, 60 °C |
| Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa | Massima |

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.3.2 Profilo della PCR real-time universale

Nota: Il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA®GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tab. 6: Profilo della PCR real-time per DNA universale per LightCycler® 480II e Analizzatore cobas z 480

| | |
|---|---------------|
| <u>Trascrizione inversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Denaturazione iniziale | 1 min, 95 °C |
| Cicli | 45 cicli |
| <u>PCR</u> Denaturazione | 10 s, 95 °C |
| Appaiamento/Estensione | 15 s, 60 °C |
| Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa | Massima |

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 7: Profilo della PCR real-time per DNA universale per Mx3005P e CFX96™

| | |
|---|---------------|
| <u>Trascrizione inversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Denaturazione iniziale | 1 min, 95 °C |
| Cicli | 45 cicli |
| <u>PCR</u> Denaturazione | 15 s, 95 °C |
| Appaiamento/Estensione | 30 s, 60 °C |
| Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa | Massima |

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 8: Selezione dei canali di rivelazione idonei

| Dispositivo per PCR real-time: | Record | Canale di rivelazione | Commento |
|--------------------------------|---------|-----------------------|---|
| Roche LightCycler® 480II | HLA-B27 | 465/510 | È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) |
| | IC | 533/580 | |
| Analizzatore Roche cobas z 480 | HLA-B27 | 465/510 | È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) |
| | IC | 540/580 | |
| Agilent Techn. Mx3005P | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |
| Bio-Rad CFX96™ | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |

10. Controllo qualità

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi del dispositivo per PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Per ogni ciclo di PCR è necessario che **No Template Control** e **Positive Control** siano elencati e presentino risultati corretti (vedere Tab. 9).

Tab. 9: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

| Campione | Risultati | | Gene Ct target |
|---------------------|-----------|----------|---|
| | HLA-B27 | IC | |
| Positive control | Positivo | Positivo | Vedere certificato di garanzia di qualità |
| No Template Control | Negativo | Negativo | 0 |

Se uno dei due controlli **No Template Control** o **Positive Control** non è in linea con le specifiche, l'intero ciclo di PCR dovrà essere ripetuto.

Il **Positive Control** contiene un template sintetico di una sequenza genetica HLA-B27 e un IC della sequenza genetica umana. La prova del **Positive Control** e dei campioni umani deve pertanto essere positiva nel canale di rivelazione IC.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Prestazioni funzionali dell'attrezzatura utilizzata (ad es. calibrazione)
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

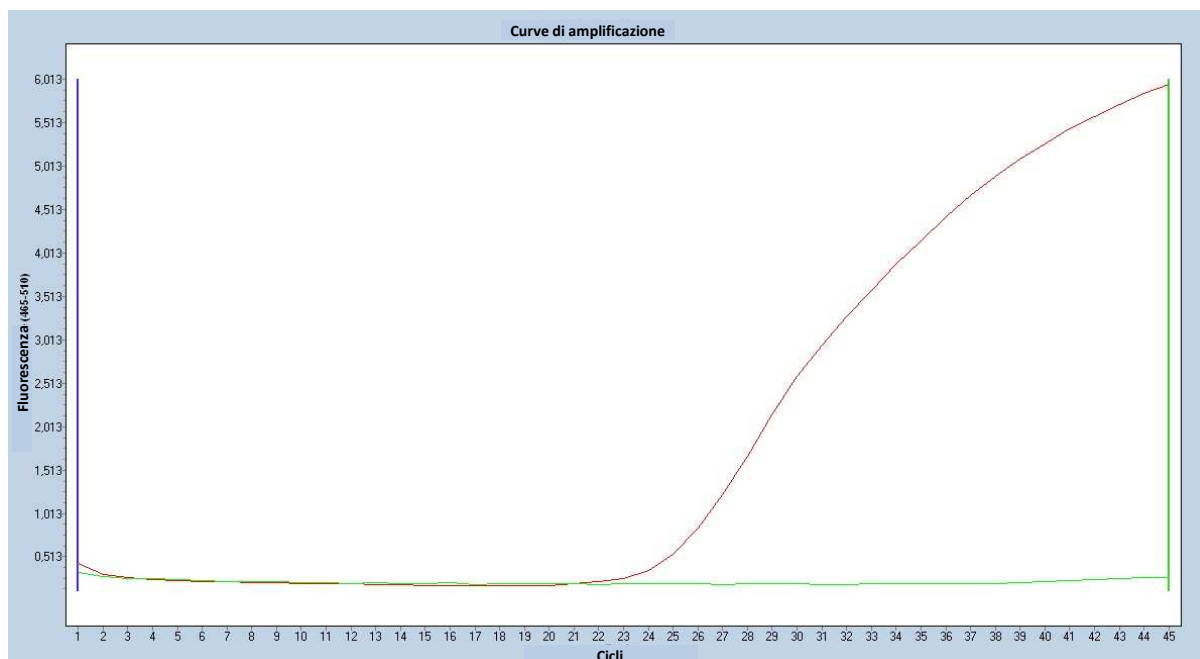


Fig. 1: Prestazioni corrette del **Positive Control** e di **No Template Control** sull'Analizzatore cobas z 480 (canale di rivelazione 465/510)

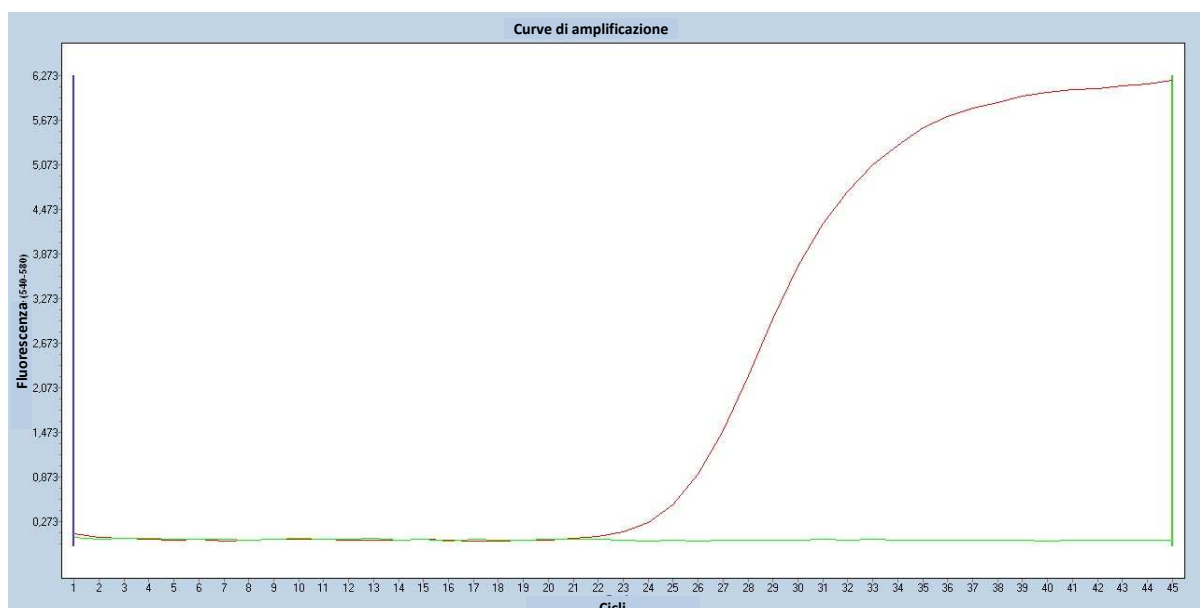


Fig. 2: Prestazioni corrette del **Positive Control** e di **No Template Control** sull'Analizzatore cobas z 480 (canale di rivelazione 540/580)

11. Interpretazione dei risultati

La valutazione campione dei risultati viene condotta sulla base della tabella 10.

Tab. 10: Interpretazione dei risultati (ad esempio LightCycler® 480II)

| Record | HLA-B27 | IC | Risultati |
|--------------------|----------|----------|------------------|
| Esempio campione 1 | Positivo | Positivo | HLA-B27 positivo |
| Esempio campione 2 | Negativo | Positivo | HLA-B27 |
| Esempio campione 3 | Positivo | Negativo | Non valido |
| Esempio campione 4 | Negativo | Negativo | Non valido |

Il ciclo di PCR non può essere valutato se il **Positive Control** non visualizza alcuna amplificazione nel sistema di rivelazione. L'intero ciclo di PCR deve essere ripetuto.

Se il **Positive Control** nel sistema di rivelazione e nel sistema IC mostra un'amplificazione in linea con le specifiche, ma il campione (vedere Tab. 10, esempio 2) non mostra un'amplificazione nel sistema di rivelazione, significa che il campione contiene DNA umano, ma è HLA-B27 negativo.

Se il **Positive Control** nel sistema di rivelazione e nel sistema IC mostra un'amplificazione in linea con le specifiche, ma il campione (vedere Tab. 10, esempio campione 3 o esempio campione 4) non mostra un'amplificazione dell'IC, significa che non è stato aggiunto DNA oppure è stato utilizzato un DNA template (qualità, inibitore della PCR) non idoneo. Il campione estratto deve essere nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la pulizia del campione.

La prova del **Positive Control** e dei campioni umani deve pertanto essere positiva nel canale di rivelazione IC (vedere paragrafo 10, Controllo di qualità).

12. Limiti del metodo

25. Il test non deve essere utilizzato per la tipizzazione tissutale.
26. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
27. Questo test è valido solo per i campioni di sangue intero con EDTA.
28. I tipi di HLA-B27 elencati (HLA-B*27:01-21, 23-152 e 154-164) sono stati determinati come rivelabili al 100% mediante esame *in silico* con il database IPD-IMGT/HLA (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/) (versione: ottobre 2017). Il confronto con il database avviene regolarmente, tuttavia non è possibile garantire se altri dati siano stati nel frattempo aggiunti o rimossi dal database.
29. La presenza di inibitori della PCR non può condurre a risultati valutabili.
30. La legge tedesca sulla diagnostica genetica (GenDG) richiede una spiegazione dettagliata e un consenso scritto dei pazienti per tutte le analisi genetiche ai sensi della GenDG.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni e caratteristiche cliniche

Il test RIDA®GENE HLA-B27 è stato convalidato per i campioni di sangue intero umano con EDTA. Si noti che al livello di riempimento corretto, la concentrazione di EDTA nelle provette di raccolta standard (ad esempio Sarstedt Monovette® KE/9 ml) deve essere pari a 1,6 mg per ml di sangue intero. Durante l'analisi delle sostanze interferenti, è stata aggiunta una concentrazione di 1,8 mg per ml K₂EDTA. Non sono state rivelate interferenze con le seguenti sostanze (vedere Tab. 11):

Tab. 11: Elenco delle sostanze e delle concentrazioni usate nel test










| Sostanze | Concentrazioni |
|---------------------|----------------|
| Eparina | 15 U/ml |
| Colesterolo | 3,0 mg/ml |
| Bilirubina | 0,1 mg/ml |
| Emoglobina | 0,2 mg/ml |
| K ₂ EDTA | 3,4 mg/ml |

14. Cronologia delle versioni

| Numero della versione | Capitolo e designazione |
|-----------------------|-------------------------|
| 18/05/2018 | Versione di rilascio |

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

| | |
|---|-------------------------------------|
|  | Diagnostica in vitro |
|  | Attenersi alle istruzioni per l'uso |
|  | Codice identificativo |
|  | Data di scadenza |
|  | Temperatura di conservazione |
|  | Numero articolo |
|  | Quantità di test |
|  | Data di produzione |
|  | Produttore |

16. Bibliografia

33. Boyle L, Goodall J, Opat S, Gaston JS. The recognition of HLA-B27 by human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2001; 167:2619-24.
34. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing Spondylitis and HL-A 27. *Lance* 1973; 904-7.
35. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-6.
36. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2014; 53(4): 650-57.
37. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J, Wordsworth BP, Cornélis F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann. Rheum. Dis* 1996; 55(4): 268-70.
38. López-Larrea C, Conzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Current Opinion in Thrumatology* 1996; 8:296-308.
39. Brewerton DA, Nicholls A, Caffrey M, Waters D, James DCO. HL-A 27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis. *Lance* 1974; 956-58.
40. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.

RIDA®GENE HLA-B27

REF PY0205

1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Com o kit RIDA®GENE HLA-B27, os alelos HLA-B27 no DNA genômico, isolados de amostras de sangue total humano de EDTA, são detectados qualitativamente usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O kit RIDA®GENE HLA-B27 foi projetado para auxiliar no diagnóstico de pacientes com suspeita de espondilite anquilosana (doença de Bechterew) e outras doenças autoimunes. **O teste não deve ser usado para tipagem de tecidos.**

Os seguintes subtipos HLA-B27 serão detectados teoricamente (*in silico*) com os iniciadores específicos de sequência: HLA-B*27:01 a 21, 23 a 152 e 154 a 164. Destes, os seguintes subtipos foram detectados *in vitro*: HLA-B*27:01 a 05, 08 a 10, 12, 14, 23 e 26.

2. Sumário e explicação do teste

O antígeno leucocitário humano B27 (HLA-B27) é o principal antígeno de superfície celular do complexo de histocompatibilidade de classe I e é codificado no cromossomo 6. Sua tarefa é apresentar antígenos microbianos às células T. Quase todas as células nucleadas do corpo têm moléculas HLA de classe I.¹

Uma associação com doenças reumáticas inflamatórias específicas, espondiloartrite (SpA), particularmente espondilite anquilosante (AS), é comum em portadores dos alelos HLA-B27.^{2,3} A associação na população caucasiana é particularmente pronunciada com uma prevalência de HLA-B27 de 90 a 95% em pacientes com AS.^{4,5} A prevalência de HLA-B27 na população total varia significativamente entre os grupos étnicos.⁶ AS é uma inflamação reumática crônica que afeta principalmente a coluna vertebral e as articulações sacroilíacas. Outras doenças reumáticas associadas ao HLA-B27 incluem a síndrome de Reiter, uveíte anterior aguda e doença inflamatória intestinal.⁷

O mecanismo patogênico, no qual o HLA-B27 causa um aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento da doença artrítica, ainda é desconhecido, apesar do intenso trabalho de pesquisa.

3. Princípio do teste

Com o kit RIDA®GENE HLA-B27, os alelos HLA-B27 no DNA genômico, isolados de amostras de sangue total humano de EDTA, são detectados qualitativamente usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Após o isolamento do DNA, o fragmento do gene específico e uma sequência do gene humano (IC) como um gene de referência (se disponível) são amplificados. As sequências alvo amplificadas são detectadas usando as sondas de hidrólise ligadas a uma extremidade com o inibidor e um marcador de fluorescência repórter (fluoróforo) na outra extremidade. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência alvo. Durante a extensão, a Taq-polymerase separa o repórter do extintor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados.

4. Reagentes fornecidos

Tab. 1: Reagentes fornecidos (os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações.)

| Código do kit | Reagentes | Quantidade | | Cor da tampa |
|---------------|---------------------|------------|---------|--------------|
| 1 | Reaction Mix | 2x | 1050 µl | amarelo |
| 2 | Taq polymerase | 1x | 80 µl | vermelho |
| N | No template control | 1x | 450 µl | branco |
| P | Positive control | 1x | 200 µl | azul |

5. Instruções de armazenamento

- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C e 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 20 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e congele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes durante a preparação da PCR (2 °C - 8 °C).

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste de PCR em tempo real RIDA®GENE HLA-B27 pode ser usado com os seguintes tampões de extração e dispositivos de PCR em tempo real:

Tab. 2: Equipamento validado

| Tampão de extração | |
|-----------------------------------|--|
| Promega | Maxwell® RSC |
| Dispositivo de PCR em tempo real: | |
| Roche | LightCycler® 480II cobas z 480 Analyzer |
| Agilent Technologies | Mx3005P |
| Bio-Rad | CFX96™ |

Se quiser usar outras plataformas de extração ou instrumentos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm em mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) ao usar LightCycler® 480II e cobas z 480 Analyzer
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos de ensaio, lâminas)
- Centrífuga com rotor para tubos de ensaio ou placas
- Vórtice misturador
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Pontas de pipeta com filtros
- Luvas descartáveis sem pó

7. Medidas preventivas

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. Observe as diretrizes para trabalho em laboratórios médicos. As instruções de uso para realizar este teste devem ser seguidas à risca. Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. e evite o contato com membranas mucosas ou pele lesionada. Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.

- Certifique-se de que a extração, a solução de PCR e a PCR estão espacialmente separadas para evitar contaminações cruzadas.
- As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.
- Descarte o kit de teste assim que o prazo de validade expirar.

Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Obedeça às regulamentações de descarte nacionais.

Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com.

8. Coleta e armazenamento de amostra

8.1 Armazenamento de amostras

Este teste foi desenvolvido para o exame de amostras de sangue total humano de EDTA. As amostras devem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 24 horas e entre 2 a 8 °C por até 72 horas até a extração do DNA.⁸ Deve ser evitada a contaminação microbiana das amostras. A utilização de amostras inativadas pelo calor, lipêmicas, hemolíticas, icteríticas ou opacas podem levar a resultados falsos.

8.2 Preparo das amostras

8.2.1 Isolamento de DNA e EDTA de sangue total

Um kit de isolamento de DNA disponível comercialmente ou sistema de extração de DNA (por exemplo, Maxwell[®] RSC Instrument (Promega)) é recomendado para o isolamento de DNA de EDTA de sangue total. As instruções do fabricante devem ser observadas.

Ao usar instrumentos Maxwell[®] RCS (Promega), é recomendável misturar as amostras de sangue por pelo menos 5 minutos em temperatura ambiente. 30 µl de proteinase K devem ser adicionados a um tubo de ensaio de 1,5 ml para o preparo das amostras. 200 µl da amostra de sangue e 300 µl do tampão de lise também devem ser adicionados. Misture no vórtice a solução por 10 segundos e incube a 56 °C por 20 minutos. Devem ser usados para a extração 100 µl do tampão de eluição. Maiores instruções do fabricante devem ser observadas.

9. Realização do teste

9.1 Preparação da mistura principal

Deve ser calculado o número total de reações (amostras e reações de controle) para a PCR.

É recomendável adicionar um volume adicional de 10% à mistura principal para equilibrar a perda de pipeta (consulte a Tab. 3). Antes de usar, descongele, misture e centrifugue brevemente o [Reaction Mix], a [Taq Polymerase], o [No Template Control] e o [Positive Control]. Sempre resfrie todos os reagentes durante as etapas de trabalho (2 a 8 °C).

Tab. 3: Exemplo para o cálculo e produção da master mix para 10 reações

| Código do kit | Componentes da mistura principal | Quantidade por reação | 10 reações (mais 10 %) |
|---------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | Reaction Mix | 19,3 µl | 212,3 µl |
| 2 | Taq polymerase | 0,7 µl | 7,7 µl |
| | Geral | 20,0 µl | 220,0 µl |

Misture a mistura principal e, finalmente, centrifugue por pouco tempo.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal no respectivo tubo de ensaio (frasco/placa).

Sem controle de modelo: Adicione 5 µl de **No Template Control** à mistura principal preparada.

Amostras: Adicione 5 µl de extrato de DNA à mistura principal preparada das reações de amostra.

Controle positivo: Adicione 5 µl de **Positive Control** para a mistura principal preparada no tubo de ensaio fornecido.

Fechar os tubos de ensaio ou placas, centrifugar brevemente e transferir para o dispositivo de PCR em tempo real. Inicie a PCR de acordo com as configurações do dispositivo (consulte a Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de PCR em tempo real do DNA

Tab. 4: Perfil de PCR em tempo real de DNA para LightCycler® 480II e cobas z 480 Analyzer

| | |
|---|--------------|
| Desnaturação inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| PCR Desnaturação | 10 s, 95 °C |
| Recozimento/Extensão | 15 s, 60 °C |
| Índice da temperatura de transição / Índice de subida | Máximo |

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Tab. 5: Perfil de PCR em tempo real de DNA para Mx3005P e CFX96™

| | |
|---|--------------|
| Desnaturação inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| <u>PCR</u> Desnaturação | 15 s, 95 °C |
| Recozimento/Extensão | 30 s, 60 °C |
| Índice da temperatura de transição / Índice de subida | Máximo |

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

9.3.2 Perfil de PCR em tempo real universal

Nota: O perfil de PCR em tempo real universal deve ser utilizado apenas em testes de DNA quando houver a combinação dos testes RIDA®GENE DNA e PCR em tempo real de RNA em uma execução.

Tab. 6: Perfil de PCR em tempo real de DNA universal para LightCycler®480II e cobas z 480 Analyzer

| | |
|---|---------------|
| <u>Transcrição reversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Desnaturação inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| <u>PCR</u> Desnaturação | 10 s, 95 °C |
| Recozimento/Extensão | 15 s, 60 °C |
| Índice da temperatura de transição / Índice de subida | Máximo |

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Tab. 7: Perfil de PCR em tempo real de DNA universal para Mx3005P e CFX96™

| | |
|---|---------------|
| <u>Transcrição reversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Desnaturação inicial | 1 min, 95 °C |
| Ciclos | 45 ciclos |
| <u>PCR</u> Desnaturação | 15 s, 95 °C |
| Recozimento/Extensão | 30 s, 60 °C |
| Índice da temperatura de transição / Índice de subida | Máximo |

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

9.4 Configuração do canal de detecção

Tab. 8: Seleção de canais de detecção adequados

| Dispositivo de PCR em tempo real | Registros | Canal de detecção | Comentário |
|----------------------------------|-----------|-------------------|--|
| Roche LightCycler® 480II | HLA-B27 | 465/510 | É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) |
| | IC | 533/580 | |
| Roche cobas z 480 Analyzer | HLA-B27 | 465/510 | É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) |
| | IC | 540/580 | |
| Agilent Techn. Mx3005P | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |
| Bio-Rad CFX96™ | HLA-B27 | FAM | - |
| | IC | HEX | |

10. Controle de qualidade

As amostras são avaliadas usando o software de análise do respectivo dispositivo de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante.

No Template Control e **Positive Control** devem ser listados para cada execução de PCR e devem ter resultados corretos (consulte a Tab. 9).

Tab. 9: Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

| Amostra | Resultados | | Gene alvo Ct |
|------------------------|------------|----------|---|
| | HLA-B27 | IC | |
| Positive control | Positivo | Positivo | Veja o Certificado de Garantia de Qualidade |
| Sem modelo Controle | Negativo | Negativo | 0 |

Se um dos dois controles, **No Template Control** ou **Positive Control**, não estiver de acordo com as especificações, toda a execução do PCR deve ser repetida.

O **Positive Control** contém um modelo sintético de uma sequência do gene HLA-B27 e uma sequência do gene humano IC. A prova do **Positive Control** e das amostras humanas deve, portanto, ser positiva no canal de detecção IC.

Se os valores especificados não forem obtidos, verifique o seguinte antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- O desempenho funcional do equipamento utilizado (por ex., a calibração)
- Realização correta do teste

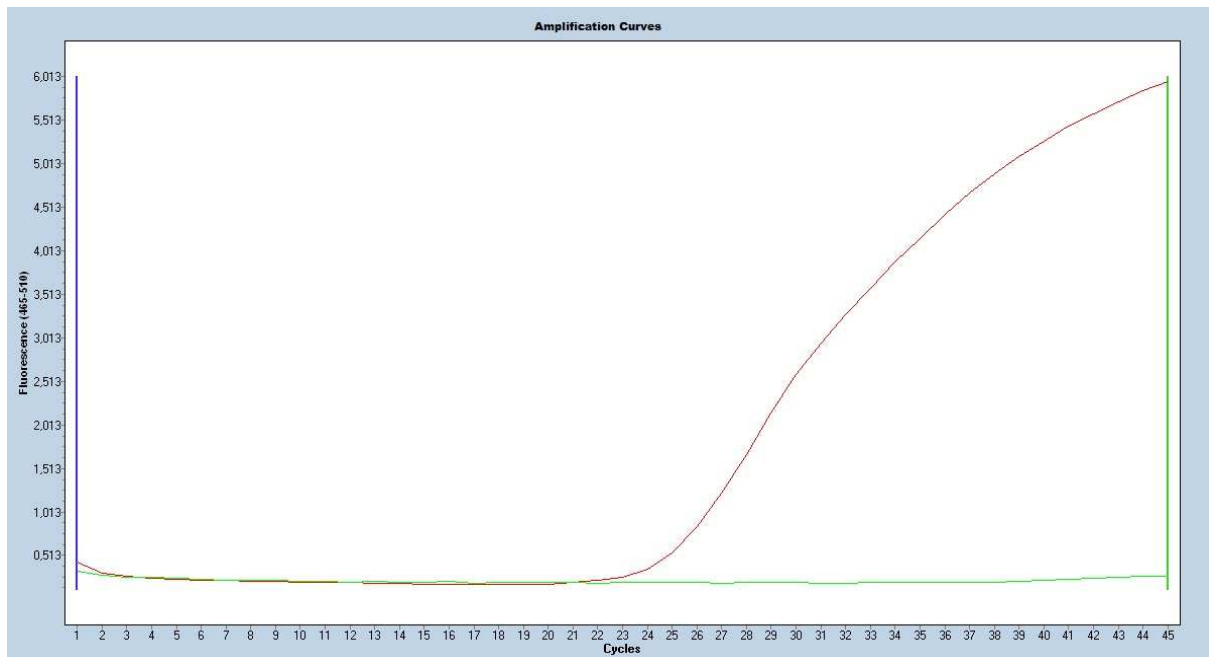


Fig. 1: Desempenho correto do **Positive Control** e **No Template Control** no cobas z 480 Analyzer (canal de detecção 465/510)

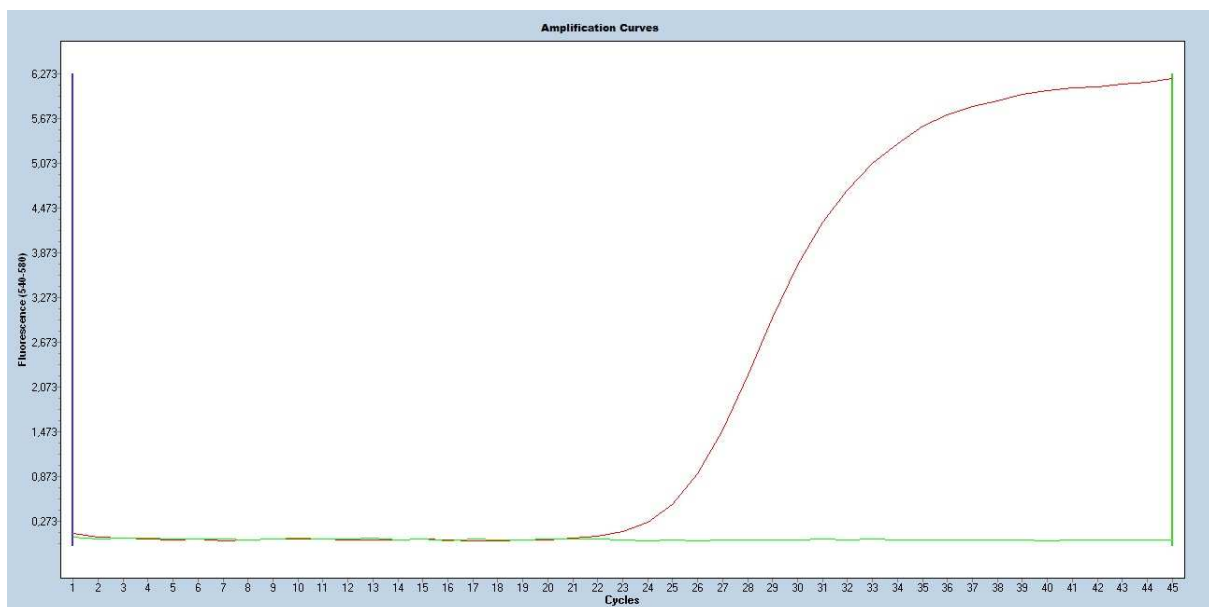


Fig. 2: Desempenho correto do **Positive Control** e **No Template Control** no cobas z 480 Analyzer (canal de detecção 540/580)

11. Interpretação dos resultados

A avaliação amostral dos resultados ocorre conforme tabela 10.

Tab. 10: Interpretação dos resultados (por exemplo, LightCycler®480II)

| Registros | HLA-B27 | IC | Resultados |
|----------------------|----------|----------|------------------|
| Exemplo de amostra 1 | Positivo | Positivo | HLA-B27 positivo |
| Exemplo de amostra 2 | Negativo | Positivo | HLA-B27 negativo |
| Exemplo de amostra 3 | Positivo | Negativo | Inválido |
| Exemplo de amostra 4 | Negativo | Negativo | Inválido |

A execução de PCR não pode ser avaliada se o **Positive Control** não exibir amplificação no sistema de detecção. Toda a execução do PCR deve ser repetida.

Se o **Positive Control** no sistema de detecção e no sistema IC mostra a amplificação de acordo com a especificação, mas a amostra (consulte a Tab. 10, amostra de exemplo 2) não mostra uma amplificação no sistema de detecção, isso significa que a amostra contém DNA humano, mas esta amostra é HLA-B27 negativa.

Se o **Positive Control** no sistema de detecção e no sistema IC mostra a amplificação de acordo com a especificação, mas a amostra (consulte a Tab. 10, amostra de exemplo 3 ou amostra de exemplo 4) não mostra uma amplificação do IC, então ou o DNA não foi adicionado ou um DNA modelo inadequado (qualidade, inibidor de PCR) foi usado. A amostra extraída deve ser re-amplificada, ou o isolamento e a limpeza da amostra devem ser melhorados.

A prova do **Positive Control** e das amostras humanas deve, portanto, ser positiva no canal de detecção IC (consulte a seção 10, Controle de qualidade).

12. Limitações do método

1. O teste não deve ser usado para tipagem de tecidos.
2. Os resultados que são obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com a situação clínica como um todo.
3. Este teste é válido apenas para amostras de sangue total com EDTA.
4. Os tipos de HLA-B27 listados (HLA-B*27:01 a 21, 23 a 152 e 154 a 164) foram determinados como 100% detectáveis usando o exame *in silico* com o banco de dados IPD-IMGT/HLA (www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/) (versão: Outubro de 2017). É efetuada uma comparação regular com a base de dados, mas não é possível garantir se entretanto foram acrescentados ou retirados dados adicionais da base de dados.
5. A presença de inibidores de PCR não pode levar a resultados avaliáveis.
6. A Lei de Diagnóstico Genético (GenDG) alemã exige uma explicação completa e consentimento por escrito dos pacientes para todas as análises genéticas de acordo com a GenDG.

13. Características de desempenho

13.1 Características de desempenho clínico

O ensaio RIDA®GENE HLA-B27 foi validado para amostras de sangue total humano com EDTA. Observe que, no nível de enchimento correto, a concentração de EDTA em tubos de coleta de sangue padrão (por exemplo, Sarstedt Monovette®KE/9 ml) deve ser de 1,6 mg por ml de sangue total. Durante o teste de substâncias interferentes, foi adicionada uma concentração de 1,8 mg por ml de K₂EDTA. Nenhuma interferência com as seguintes substâncias foi detectada (consulte Tab. 11):

Tab. 11: Lista de substâncias e concentrações usadas no teste










| Substâncias | Concentrações |
|---------------------|---------------|
| Heparina | 15 U/ml |
| Colesterol | 3,0 mg/ml |
| Bilirrubina | 0,1 mg/ml |
| Hemoglobina | 0,2 mg/ml |
| K ₂ EDTA | 3,4 mg/ml |

14. Histórico de versões

| Número da versão | Capítulo e designação |
|------------------|-----------------------|
| 2018-05-18 | Versão da edição |

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

| | |
|---|------------------------------|
|  | Diagnóstico In-vitro |
|  | Observe as instruções de uso |
|  | Número de lote |
|  | Data de validade |
|  | Temperatura de armazenamento |
|  | Referência do produto |
|  | Número de testes |
|  | Data de fabricação |
|  | Fabricante |

16. Literatura

1. Boyle L, Goodall J, Opat S, Gaston JS. The recognition of HLA-B27 by human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2001; 167:2619-24.
2. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing Spondylitis and HL-A 27. *Lance* 1973; 904-7.
3. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-6.
4. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ. Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2014; 53(4): 650-57.
5. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Calin A, Darke C, Bell J, Wordsworth BP, Cornélis F. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann. Rheum. Dis* 1996; 55(4): 268-70.
6. López-Larrea C, Conzalez-Roces S, Alvarez V. HLA-B27 structure, function, and disease association. *Current Opinion in Thrumatology* 1996; 8:296-308.
7. Brewerton DA, Nicholls A, Caffrey M, Waters D, James DCO. HL-A 27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis. *Lance* 1974; 956-58.
8. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.