

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

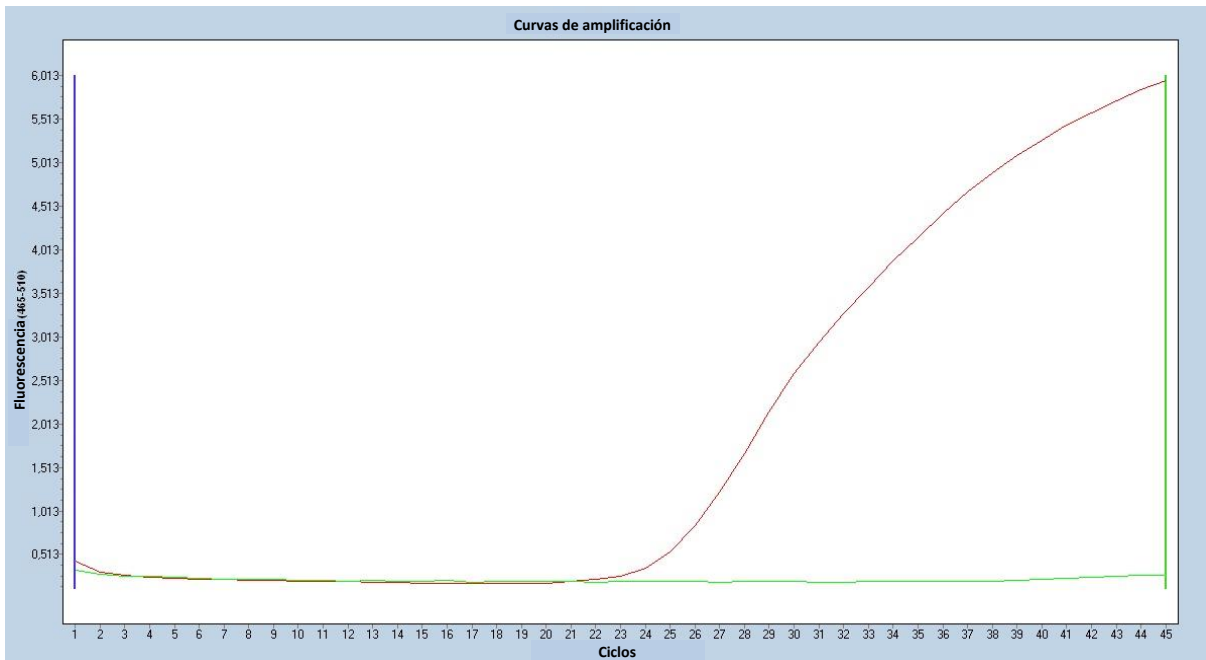


Figura 1: Desempeño correcto del **Positive Control** y el **No Template Control** en el analizador cobas z 480 (canal de detección 465/510)

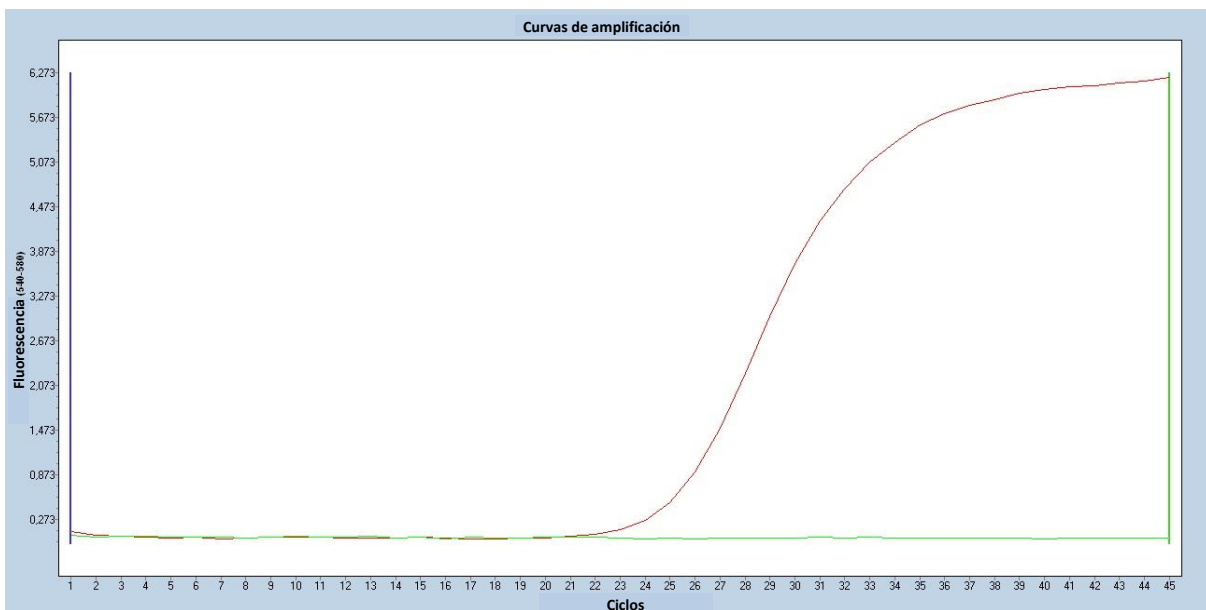


Figura 2: Desempeño correcto del **Positive Control** y el **No Template Control** en el analizador cobas z 480 (canal de detección 540/580)

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

1. El ensayo no debe usarse para la tipificación tisular.
2. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico completo.
3. Este ensayo es válido solo para muestras de sangre entera con EDTA.
4. 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.
5. La presencia de inhibidores de la PCR no puede conducir a resultados evaluables.
6. 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

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.