

## 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 I<sup>1</sup>.

Il est admis que les allèles HLA-B27 sont associés à certaines maladies rhumatoïdes inflammatoires, la spondylarthrite (SpA), en particulier la spondylarthrite ankylosante (SA)<sup>2,3</sup>. 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<sup>4,5</sup>. La prévalence de HLA-B27 dans la population totale varie significativement d'un groupe ethnique à l'autre<sup>6</sup>. 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 inflammatoire<sup>7</sup>.

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<sup>®</sup>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 <sup>®</sup> RSC                                |
| Dispositif de PCR en temps réel : |   |
| Roche                             | LightCycler <sup>®</sup> 480II<br>Analyseur cobas z 480 |
| Agilent Technologies              | Mx3005P   |
| Bio-Rad                           | CFX96 <sup>™</sup>                                      |

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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- Le RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) lors de l'utilisation de LightCycler<sup>®</sup> 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](http://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'ADN<sup>8</sup>. 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<sup>®</sup> RSC [Promega]). Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Lors de l'utilisation d'instruments Maxwell<sup>®</sup> 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                   |
|             | <b>Total</b>                 | <b>20,0 µl</b>        | <b>220,0 µl</b>          |

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 /<br>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 /<br>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 /<br>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 /<br>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 :

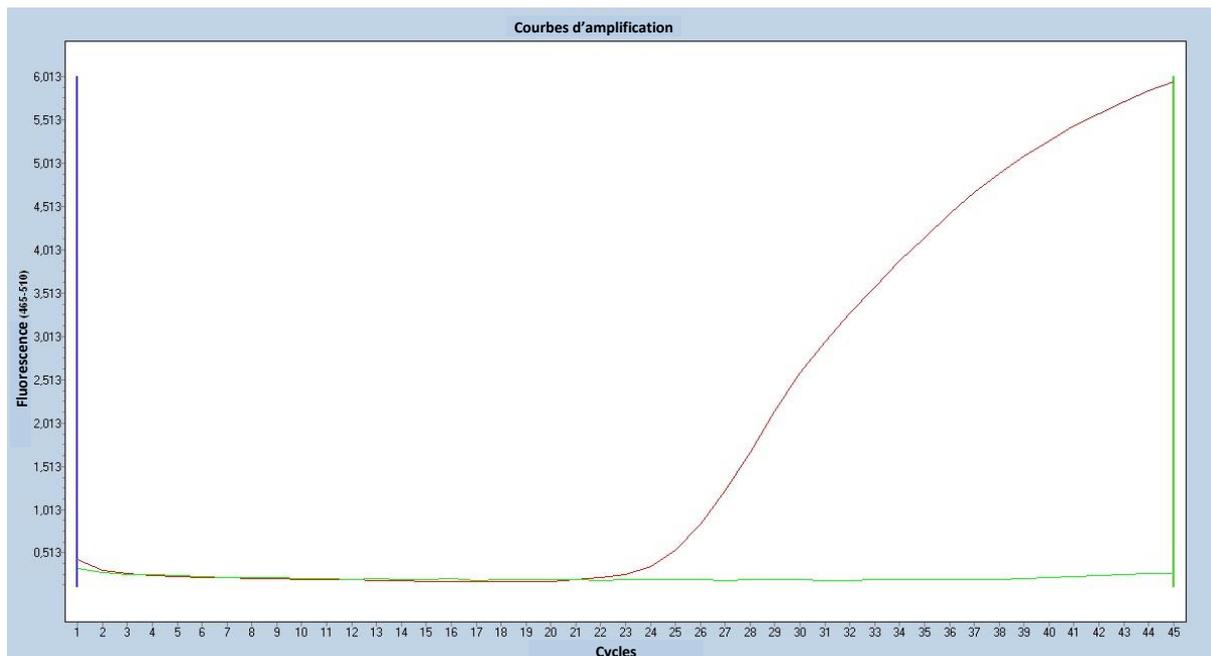
| Échantillon         | Résultats |         | Gène Ct cible                       |
|---------------------|-----------|---------|-------------------------------------|
|                     | HLA-B27   | IC      |                                     |
| Positive control    | Positif   | Positif | Voir 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.

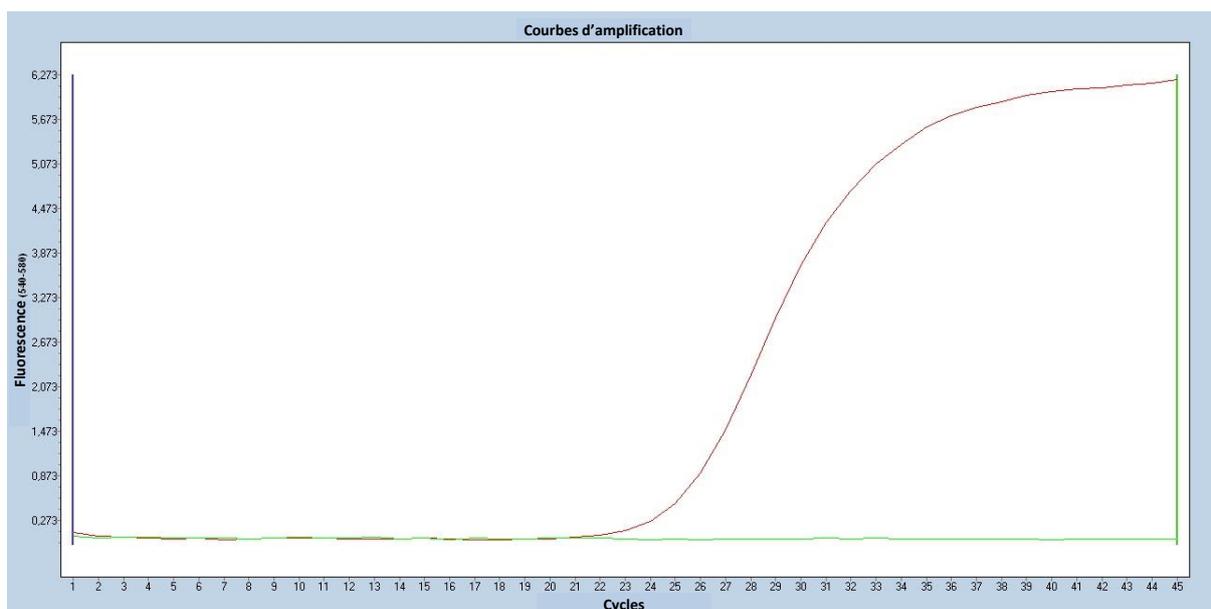
Le **Positive Control** contient une matrice synthétique d'une séquence de gène HLA-B27 et une séquence de gène humain IC. Les résultats du **Positive Control** et des échantillons humains doivent donc être positifs dans le canal de détection IC.

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

1. Le test ne doit pas être utilisé pour le typage tissulaire.
2. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
3. Ce test est seulement valide pour des échantillons de sang total EDTA.
4. 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/](http://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.
5. La présence d'inhibiteurs de la PCR ne permet pas d'évaluer les résultats.
6. 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 K<sub>2</sub>EDTA 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 <sub>2</sub> 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

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.