

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

Tampone 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 vorticatore
- 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

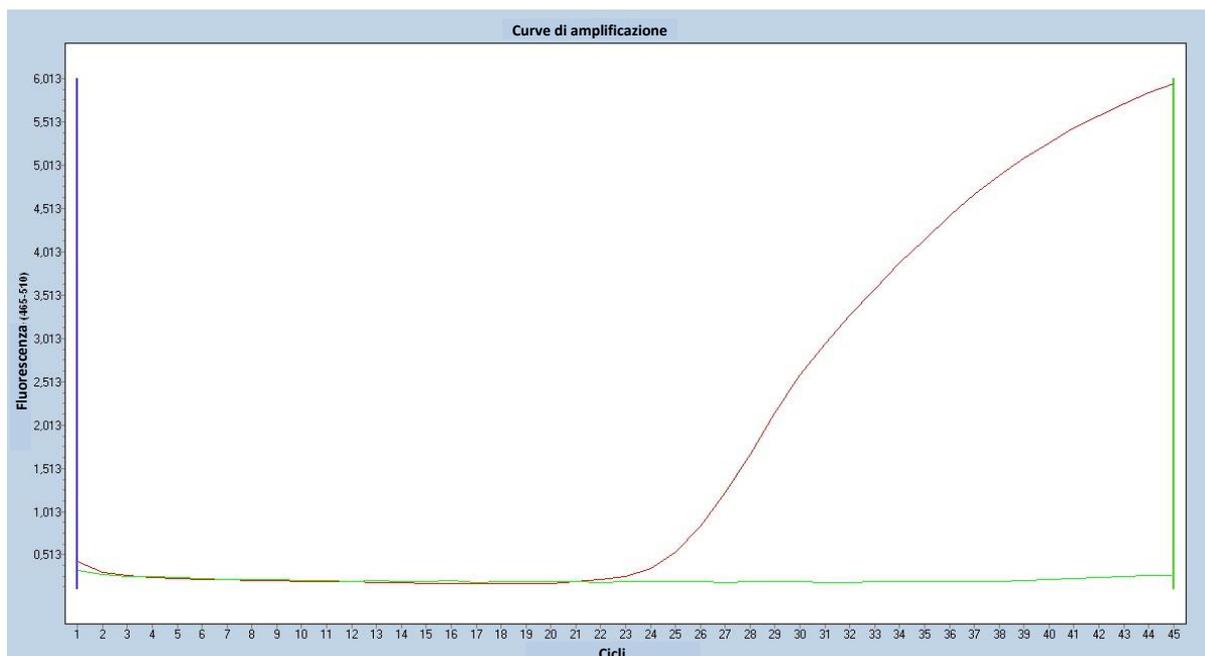


Fig. 1: Prestazioni corrette del **Positive Control** e di **No Template Control** sull'Analizzatore cobas z 480 (canale di rivelazione 465/510)

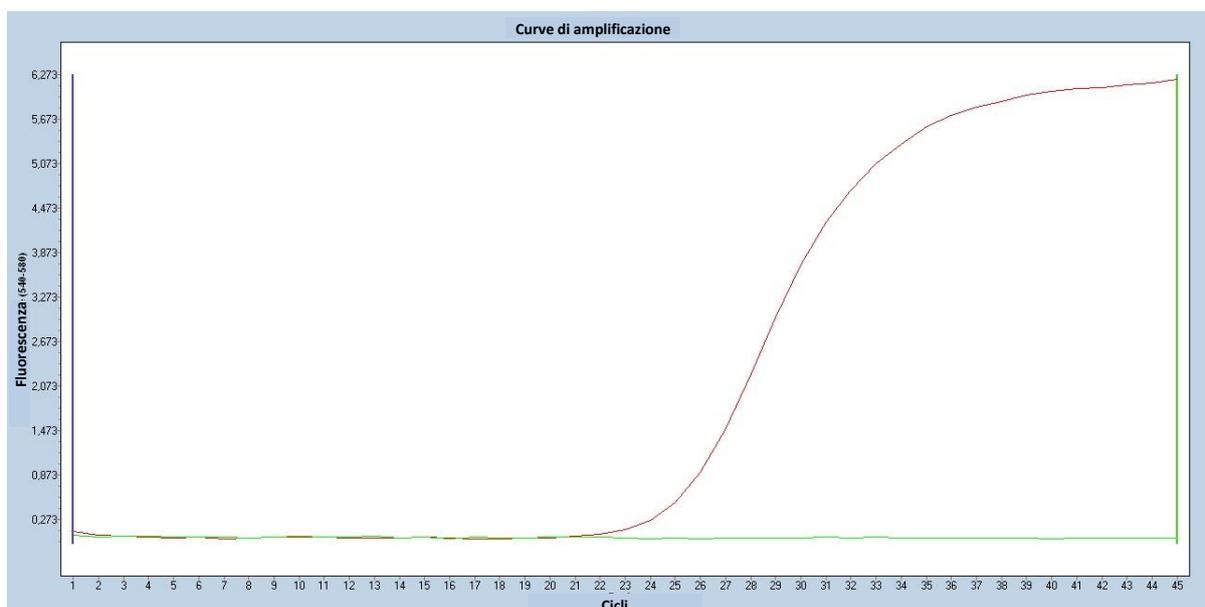


Fig. 2: Prestazioni corrette del **Positive Control** e di **No Template Control** sull'Analizzatore cobas z 480 (canale di rivelazione 540/580)

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

1. Il test non deve essere utilizzato per la tipizzazione tissutale.
2. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
3. Questo test è valido solo per i campioni di sangue intero con EDTA.
4. 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.
5. La presenza di inibitori della PCR non può condurre a risultati valutabili.
6. 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. 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.