

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
�ndice da temperatura de transição / �ndice 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
�ndice da temperatura de transição / �ndice 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
�ndice da temperatura de transição / �ndice 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

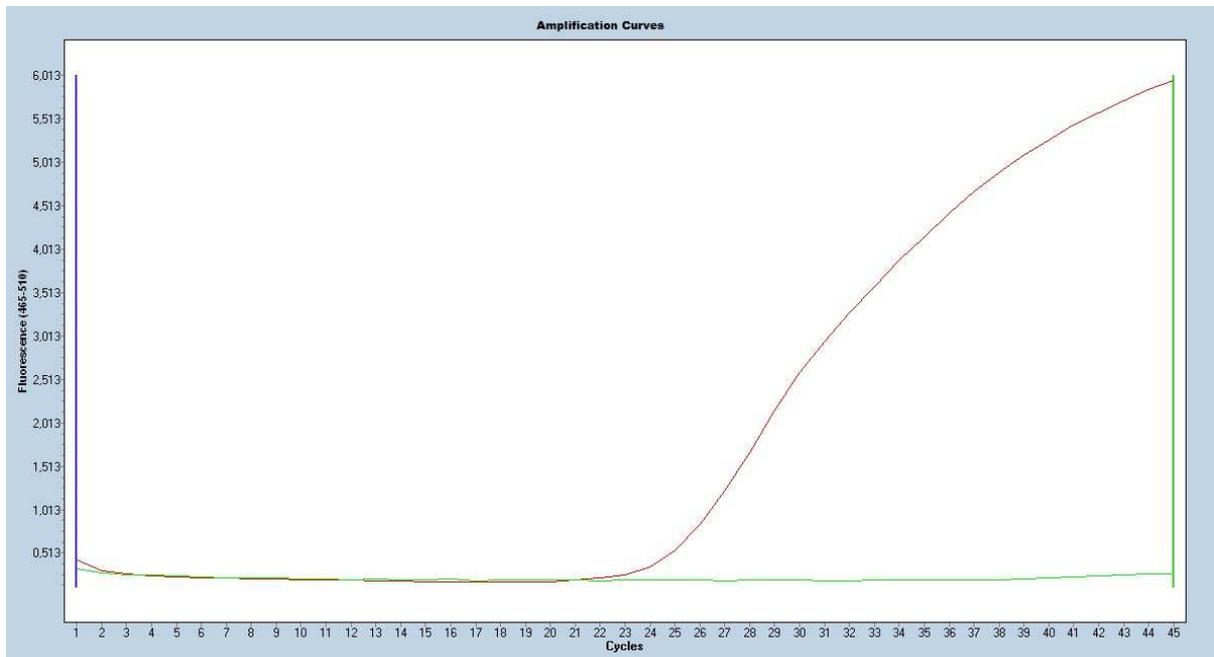


Fig. 1: Desempenho correto do **Positive Control** e **No Template Control** no cobas z 480 Analyzer (canal de detecção 465/510)

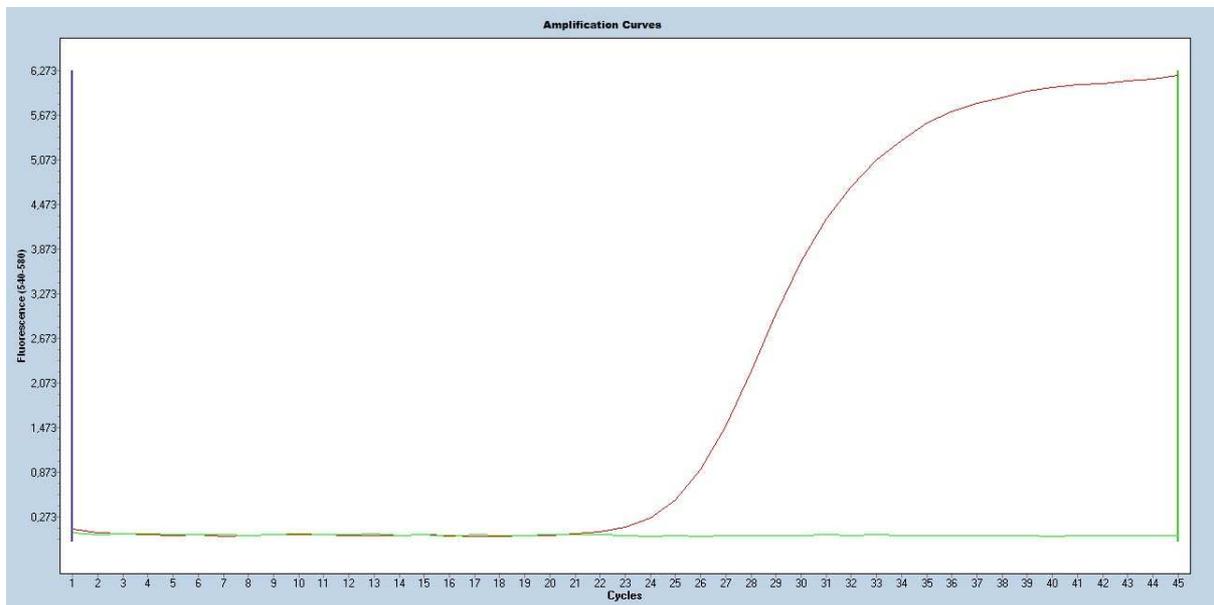


Fig. 2: Desempenho correto do **Positive Control** e **No Template Control** no cobas z 480 Analyzer (canal de detecção 540/580)

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.