

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

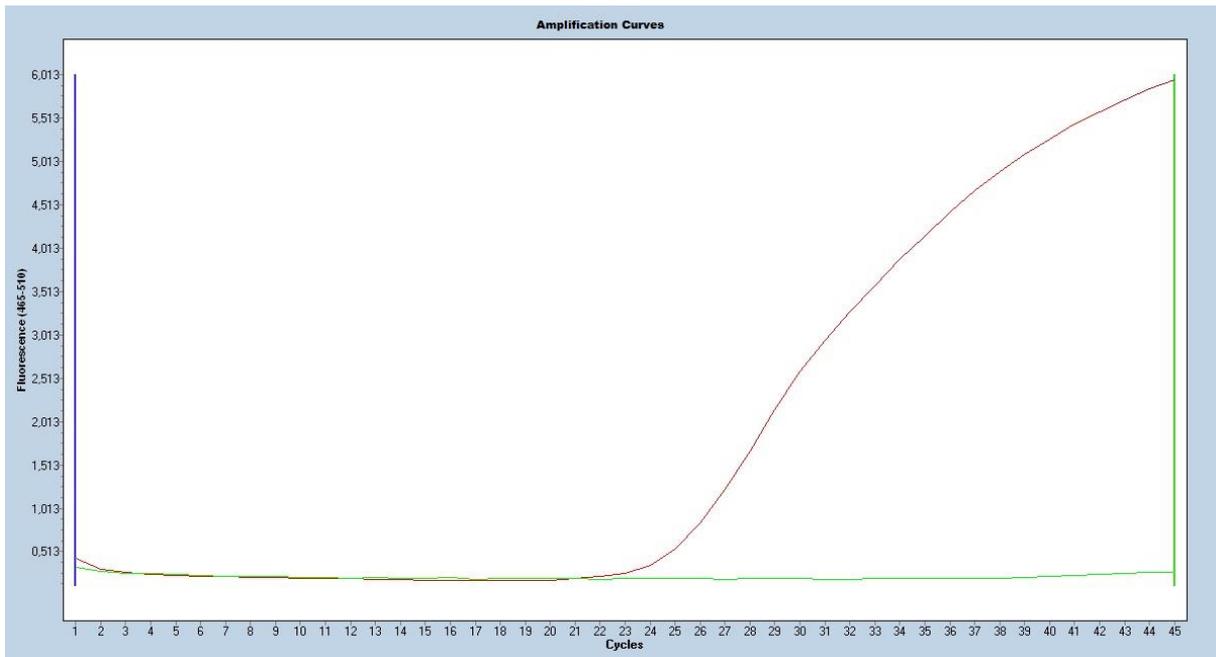


Abb. 1: Korrekter Verlauf der **Positive Control** und **No Template Control** auf dem cobas z 480 Analyzer (Detektionskanal 465/510)

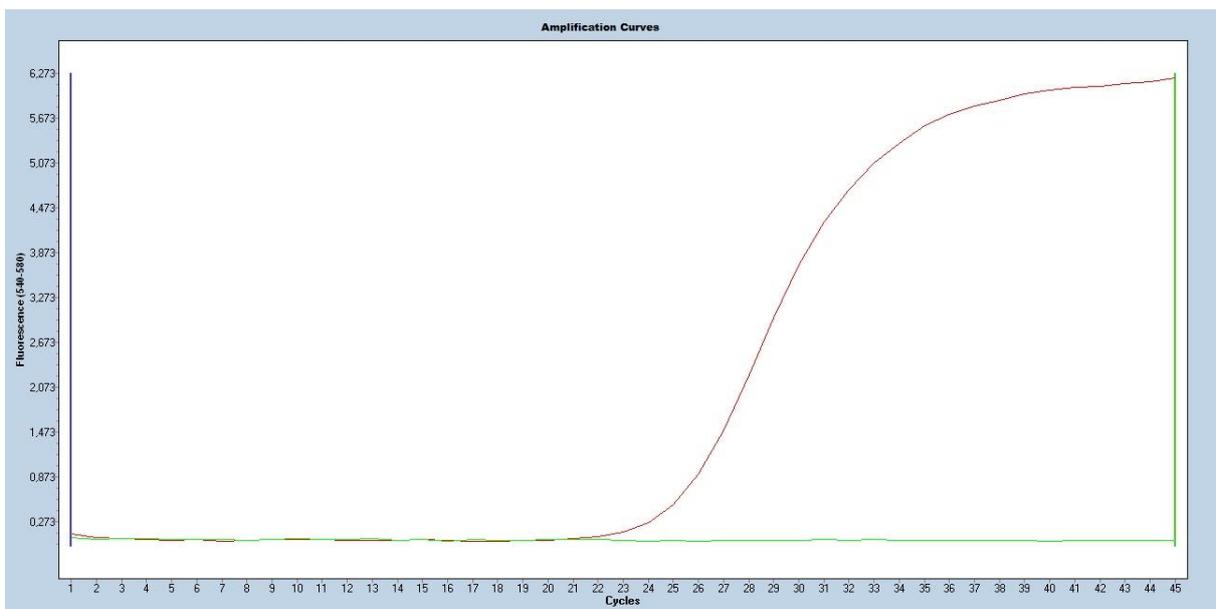


Abb. 2: Korrekter Verlauf der **Positive Control** und **No Template Control** auf dem cobas z 480 Analyzer (Detektionskanal 540/580)

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. *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.