

GEBRAUCHSFERTIG VORGETROPFT

Gebrauchsinformation

HISTO TYPE B27

CE 0123

Testkit zur Typisierung der B*27 Allele
auf molekulargenetischer Basis

IVD

48 Typisierungen / REF 7070
96 Typisierungen / REF 7071

Inhalt:

1. Einführung	2
1.1 Klinische Bedeutung von B27	2
1.2 Testprinzip	2
2. Material	3
2.1 Inhalt des HISTO TYPE B27 Kits	3
2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material	3
2.2.1 Reagenzien	3
2.2.2 Geräte	3
2.3 Lagerung und Haltbarkeit	4
3. Leistungsdaten	4
4. Testdurchführung	4
4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	4
4.2 DNA-Isolierung	5
4.3 Amplifikation	5
4.4 Testablauf	5
4.5 Gelelektrophorese	6
4.6 Dokumentation und Auswertung	7
5. Interpretation	7
6. Warn- und Entsorgungshinweise	7
7. Fehlermöglichkeiten	8
8. Literatur	9
9. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	9

1. Einführung

1.1 Klinische Bedeutung von B27

Zusammenhänge von bestimmten HLA-Typen mit bestimmten Erkrankungen sind inzwischen in über 40 verschiedenen Kombinationen bekannt. Am bedeutendsten ist die Assoziation von HLA-B27 mit dem Krankheitsbild der seronegativen Arthritiden (Morbus Bechterew, Morbus Reiter, reaktive Arthritiden). So ist ein positiver HLA-B27 Befund mit einem sehr hohen Krankheitsrisiko verbunden (siehe Tabelle 1) [1,2]. Vor allem bei unklarem Verdacht auf M. Bechterew liefert eine gesicherte HLA-B27 Diagnostik einen entscheidenden Beitrag für die Therapie eines Patienten.

Erkrankung	B27 Frequenz in Patienten	relatives Risiko
Ankylosierende Spondylitis (Morbus Bechterew)	90,2 %	91
Morbus Reiter	78,8 %	37,6
Postinfektiöse reaktive Artheriden	70,2 %	

Tabelle 1: HLA-B27 Frequenzen und Risiken.

1.2 Testprinzip

Der Einsatz der Polymerase Chain Reaction (PCR) in der HLA Typisierung ist inzwischen zur Routine geworden. Die Sequenzbestimmung von allen HLA-Allelen [3] ermöglicht eine spezifische und eindeutige Typisierung auf DNA-Ebene mit einer hohen Auflösung und entscheidenden Vorteilen gegenüber den konventionellen serologischen Methoden. Ausgangsmaterial für die Typisierung mit **HISTO TYPE B27** ist gereinigte, leukozytäre DNA. Die Testdurchführung basiert auf der **Sequence Specific Primer- (SSP) PCR** (siehe Abb. 1). Diese Methode nutzt die Tatsache, dass für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer, speziell am 3'-Ende, keine Fehlpaarungen aufweisen dürfen [4]. Somit führt nur eine vollständige Übereinstimmung der Primer mit der Zielsequenz zu einem Amplifikat, welches durch eine anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird.

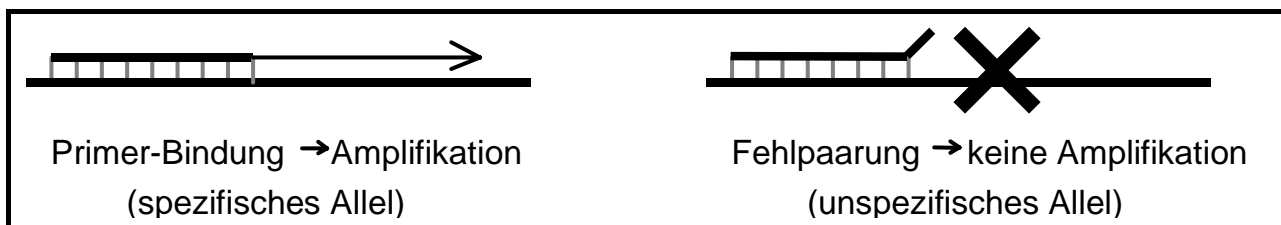


Abb. 2: Prinzip der SSP-PCR

Die verwendeten Primer wurden so gewählt, daß die häufigsten Subtypen (*2701-17, 19-21, 24-28, 30-32, 34-45) erkannt werden. Zusätzlich ist in jedem Reaktionsmix ein Kontrollprimerpaar vorhanden, welches immer ein Amplifikat bilden muss. Bei Ausfall dieser Bande liegt entweder ein Pipettierfehler vor, oder die DNA enthielt inhibitorische Substanzen (siehe Fehlermöglichkeiten). In diesem Fall ist der Test nicht auswertbar! Je Test wird ein **vorgetropfter** und **getrockneter** Reaktionsansatz benötigt. Das Endvolumen beträgt 10 µl.

2. Material

2.1 Inhalt des HISTO TYPE B27 Kit

- ◆ 6 (12) HISTO TYPE Streifen (á 8 dünnwandige PCR Gefäße) ausreichend für 48 (96) HLA-B27 Typisierungen. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze bestehen aus allelspezifischen Primern, internen Kontroll-Primern (spezifisch für das humane G3PDH Gen) und Nukleotiden.
- ◆ 1,1 ml 10 x PCR-Puffer
- ◆ Gebrauchsinformation

2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material

2.2.1 Reagenzien

- ◆ **BAG EXTRA-GENE** Kit (optional) zur DNA-Extraktion aus Blut / Lymphozyten / Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- ◆ Taq-Polymerase (5 U/µl) , (z.B. Qiagen)
- ◆ DNA-Agarose
- ◆ 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- ◆ DNA Längenstandard (Bestellnr.: 7097)
- ◆ Ethidiumbromid (EtBr)

2.2.2 Geräte

- ◆ DNA-Cycler (z. B. PTC 200-96V mit "Hot Bonnet"; Fa. BioRad)
- ◆ Flachgelkammer mit Kämmen und Spannungsgeber (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ UV-Leuchtplatte (220-310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System) mit Filmen (Polaroid Typ 667)
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5-250 µl) und sterile Spitzen, ggf. mit Filter

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Alle Kit-Reagenzien nach Erhalt bei -20...-80°C lichtgeschützt lagern. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit gilt für alle im Kit enthaltenen Reagenzien auch nach dessen erstem Gebrauch. Den 10x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen.

3. Leistungsdaten

Analytische Sensitivität: Eine zuverlässige Typisierung ist bei einer Einsatzmenge von 40 – 80 ng DNA pro Reaktionsmix gewährleistet.

Diagnostische Spezifität: Die Zusammensetzung des Primermix gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der im Testprinzip angegebenen B27 Subtypen basierend auf den zurzeit bekannten Sequenzdaten. Es werden regelmäßig Updates durchgeführt.

Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität des Mixes wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten HLA-Antigenen überprüft.

Für den HISTO TYPE B27 Kit wurde eine Leistungsstudie mit mindestens 50 DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen eines anderen Anbieters von SSP Kits verglichen. Bei den Typisierungsergebnissen konnten keine Diskrepanzen festgestellt werden.

4. Testdurchführung

4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Bei der PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode, die von geschultem, in Molekulartechnik und Histokompatibilitätstestung erfahrenem Personal durchgeführt werden sollte. Transplantationsrichtlinien und aktuelle EFI- / DGI-Standards sind zu beachten, um insbesondere bei diskrepanten Ergebnissen in serologischer und molekularbiologischer Testmethode, das Risiko von Fehlbestimmungen zu verringern. Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- ◆ prinzipiell mit Handschuhen (pudernfrei) arbeiten
- ◆ bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die **Prä-Amplifikation** (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die **Post-Amplifikation** (Amplifikation, Gel-Elektrophorese, Dokumentation) benutzen; möglichst zwei getrennte Räume
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nie austauschen

4.2 DNA-Isolierung

Für die Typisierung eines Patienten werden ca. 50 ng Leukozyten-DNA benötigt. Bestens geeignet für die Isolierung ist z.B. der **BAG EXTRA-GENE** Kit, welcher ohne Einsatz von giftigen Chemikalien oder Lösungsmitteln in kurzer Zeit reine DNA aus Vollblut liefert. Weiterhin sind andere in der Literatur beschriebene Methoden [5] wie die Chloroform-Triethylammoniumbromid (CTAB)-Methode oder Phenol-Chloroform Reinigung geeignet, DNA mit ausreichender Reinheit zu erhalten. Heparin kann unter Umständen die PCR Reaktion hemmen [6]. Es wird daher der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen. Die DNA sollte einen Reinheitsindex (Extinktionsverhältnis OD_{260}/OD_{280}) von > 1.5 und < 2.0 aufweisen.

4.3 Amplifikation

Die vorpipettierten Reaktionsmixe beinhalten bereits die allelspezifischen Primer, Nukleotide sowie die Primer der internen Amplifikationskontrolle und liegen in getrockneter Form vor. Die Amplifikationsparameter sind optimiert auf ein Endvolumen von 10 μ l.

4.4 Testablauf

Die gewünschte Anzahl der HISTO TYPE B27-Streifen aus dem Gefrierschrank entnehmen und den 10 x PCR-Puffer auftauen.

I. Taq-Vorverdünnung: **0,08 μ l** Taq Polymerase (5 U/ μ l) \times Anzahl Bestimmungen+1
(0,5 U je Reaktion)

1,0 μ l 10 x PCR-Puffer \times Anzahl Bestimmungen+1
gründlich mischen

II. Probenmix: **1,1 μ l** Taq-Vorverdünnung

1,0 μ l DNA-Lösung (ca. 50 ng)

7,9 μ l steriles H₂O (**auf 10 μ l**); gründlich mischen

III. Verteilung: **10 μ l** Probenmix in ein Reaktionsgefäß geben und das Gefäß mit dem anhängenden Deckeln sorgfältig verschließen. Die Reaktionslösung muß sich im Gefäßboden befinden! Ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl ist bei Verwendung eines beheizten Deckels nicht nötig!

IV. Reaktionsgefäße in den Cyclor stellen (auf festen Sitz achten!)

V. PCR - Programm starten

Amplifikationsprotokoll

Programm Schritt	Temp.	Zeit	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	96°C	5 Min	1 Zyklus
Denaturierung	96°C	20 Sek	5 Zyklen
Annealing+Extension	68°C	1 Min	
Denaturierung	96°C	20 Sek	10 Zyklen
Annealing	64°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Denaturierung	96°C	20 Sek	15 Zyklen
Annealing	61°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Letzte Extension	72°C	5 Min	1 Zyklus

Cycler-Typen:

PTC 100 / 200 (MJ Research/Fa. BioRad), GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (bitte Heizrate vom 9600 verwenden) (Fa. ABI) und Mastercycler epGradient S (Fa. Eppendorf)

Bei Cyclern mit sehr schnellen Heiz- und Kühlraten wird empfohlen eine etwas langsamere Heiz- und Kühlrate zu wählen.

Da Cycler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Cycler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert werden.

Prinzipiell kann folgendermaßen vorgegangen werden:

Bei **falsch positiven** Reaktionen (unspezifische Banden, zusätzliche Typen):

Erhöhung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten.

Bei **falsch negativen Reaktionen** (fehlende Banden und/oder Amplifikationskontrollen):

Erniedrigung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten und / oder Erhöhung der Annealing-Zeiten in 5-Sekunden-Schritten und / oder Erhöhung der Denaturierungs-Zeiten in 5-Sekunden Schritten.

Es wird empfohlen nur regelmäßig kalibrierte Cycler zu verwenden. Hierfür eignet sich gut der BAG-Cycler Check Kit (Bestellnr.: 7104).

Die Qualitätskontrollen wurde mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. 100 (MJ Research), 9700 (ABI) und Mastercycler epGradient S (Eppendorf) durchgeführt.

4.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Auswertung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Elektrophorese über ein (Horizontal-) Agarose-Gel. Als Laufpuffer wird 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) - Puffer empfohlen. Die Gelstärke sollte 2,0 - 2,5% Agarose betragen. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens 30 Min. polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die jeweiligen Proben dem Cycler entnommen und die kompletten Ansätze vorsichtig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Die Zugabe

von Probenpuffer ist nicht mehr nötig. Zusätzlich sollte eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard für den Größenvergleich beladen werden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10-12 V/cm (bei 20 cm Gel-Länge ca. 200-240 V) für 20-40 Min.. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30-45 Min. in einer Ethidiumbromid(EtBr)-Lösung (ca. 0,5 µg/ml EtBr in H₂O oder TBE-Puffer) gefärbt. Alternativ kann auch EtBr (0,5 µg/ml) dem Elektrophorese-Puffer oder dem Agarose-Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20-30 Min. in H₂O entfärbt werden.

4.6 Dokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (220-310 nm) gelegt und mit einer geeigneten Kamera (z.B. Polaroid, Film Typ 667) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben (Näherungswerte: Blende 11, Belichtungszeit 1 Sekunde).

5. Interpretation

Es werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich des DNA - Längenstandards die richtige Größe von **420 bp und/oder 85 bp** besitzen. In allen Spuren ohne spezifische Amplifikation muß in jedem Fall die interne Kontrolle bei **1070 bp** erscheinen. In den Ansätzen mit spezifischer (und unspezifischer) Reaktion fällt die interne Kontrolle meist schwächer aus oder kann gänzlich verschwinden! Bei nicht auswertbaren Ergebnissen siehe Fehlermöglichkeiten (7).

6. Warn- und Entsorgungshinweise

Ethidiumbromid ist ein stark mutagenes Reagenz. Hautkontakt und Kontaminationen vermeiden! Die Gebrauchsinformation sowie die Warn- und Entsorgungshinweise des entsprechenden Herstellers sind zu beachten!

Der Transilluminator sendet sehr kurzwelliges UV-Licht aus, das Verbrennungen der Haut und der Netzhaut hervorrufen kann. UV-Gesichtsschutz tragen!

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut, sonstige Körperflüssigkeiten) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die

Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

7. Fehlermöglichkeiten






Fehler	mögliche Ursache	Beseitigung
keine Amplifikation, Längenstandard sichtbar	DNA verunreinigt DNA degradiert	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch / zu niedrig	DNA-Konzentration ändern, DNA-Isolierung wiederholen
	Enzym fehlt oder Konzentration zu niedrig	Typisierung wiederholen, Enzym-Konzentration ändern
	DNA aus Heparin-Blut	Typisierung mit EDTA-/Citrat-Blut wiederholen
	falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.4)☆
Wiederholte Ausfälle (keine Kontroll- Bande) in einzelnen Spuren	Deckel der Reaktionsgefäße schließen nicht dicht; dadurch Wasserverlust und Konzentra- tionsänderung während PCR	Auf festen Sitz der Deckel achten
unspezifische Amplifikation, Zusatzbanden (zusätzliche Banden falscher Größe sind zu vernachlässigen)	Kontamination mit Amplifikaten	Typisierung wiederholen auf sauberes Arbeiten achten
	DNA mit Salzen verunreinigt	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch	weniger DNA einsetzen
	Enzym-Konzentration zu hoch	weniger Enzym einsetzen
	falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.4)☆
keine oder sehr schwache Banden sichtbar, Längenstandard kaum sichtbar	EtBr-Färbung zu schwach	Färbung wiederholen
Gel-Hintergrund leuchtet zu stark	Färbung zu lange, EtBr- Konzentration zu hoch	mit H ₂ O entfärben, EtBr niedriger konzentrieren
Verschmierte Banden im Gel	Laufpuffer zu heiß oder verbraucht; falscher Laufpuffer; Gel nicht ausgehärtet	Geringere Voltzahl wählen (frischen) 0,5x TBE Puffer verwenden mind. 30 Min. zwischen Präparation und Beladung des Gels warten

☆ Bei Verwendung der angegebenen Geräte und Materialien ist eine Optimierung der Amplifikationsparameter als letztes Hilfsmittel einzusetzen. In den meisten Fällen ist eine Auswertung durch die Eliminierung der Zusatzbanden aufgrund der Größenabweichung möglich.

8. Literatur

1. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
2. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706
3. Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens 49:297-321
4. Newton CR, 1989. Nucleic Acids Res. **17**:2503-2516
5. Maniatis et al., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166

9. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	In-vitro-Diagnostikum
	Lagertemperatur
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
REF	Bestell-Nr.
	Gebrauchsinformation beachten



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0 www.bag-healthcare.com
Fax: +49 (0) 6404 / 925-250 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450
Fax: +49 (0) 6404 / 925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125
Fax: +49 (0) 6404 / 925-421
service@bag-healthcare.com