

DE

Gebrauchsinformation

HISTO TYPE B*27 Q

Testkit zur Typisierung von HLA Allelen auf molekulargenetischer Basis

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-healthcare.com

IVD

REF 728200 HISTO TYPE B*27 Q

CE 0123

Inhalt

1. PRODUKTBESCHREIBUNG	2
2. TESTPRINZIP	2
3. MATERIAL	2
3.1 Inhalt des HISTO TYPE B*27 Q Kits	2
3.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte	2
3.3 Validierte Cyclers und Reaktionsgefäße	3
4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT	3
5. TESTDURCHFÜHRUNG	3
5.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	3
5.2 DNA Isolation	3
5.3 Amplifikation	4
5.4 Interpretation der Ergebnisse	5
6. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE	5
7. LEISTUNGSMERKMALE	6
8. GRENZEN DER METHODE	6
9. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	7
10. PROBLEMBEHANDLUNG	8
11. VERWENDETE MARKENNAMEN	8
12. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN	9
13. LITERATUR	9

Version: 01/2018 / Stand: 2018-03

1. PRODUKTBESCHREIBUNG

Das **HISTO TYPE B*27 Q** Kit wird zum molekulargenetischen Nachweis von HLA-B*27 Allelen eingesetzt. Das HLA-B27 Protein ist eine Variante des Human Leucocyte Antigen-B (HLA-B). Das HLA-B27 Protein ist mit dem Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen (Morbus Bechterew bzw. Spondylitis ankylosans, Morbus Reiter, reaktive Arthritiden) assoziiert und der Nachweis von HLA-B*27 wird daher für die Diagnostik genutzt (1, 2). Ein positiver HLA-B27 Befund ist mit einem sehr hohen Krankheitsrisiko verbunden. Vor allem bei unklarem Verdacht auf M. Bechterew liefert eine gesicherte HLA-B*27 Diagnostik einen entscheidenden Beitrag für die Therapie eines Patienten. Etwa 3 bis 6% der Träger des HLA-B*27-Gens erkranken an Spondylitis ankylosans und mehr als 90% aller Patienten mit seronegativen Arthritiden sind Träger dieses Gens.

Im **HISTO TYPE B*27 Q** Kit werden alle häufigen HLA-B*27-Subtypen erfasst. Außerdem wird zwischen den krankheitsassoziierten Allelen und den Subtypen HLA-B*27:06 oder HLA-B*27:09, die beide nicht mit dem Auftreten der Spondylitis ankylosans assoziiert sind (3), differenziert.

2. TESTPRINZIP

Der Test wird mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die DNA wird in einer PCR mit sequenz-spezifischen Primern (SSP) amplifiziert. Die Primer wurden speziell zur selektiven Amplifikation der Exons 2 und 3 des HLA-B*27 Gens, die nur die B*27 Subtypen erfassen, entwickelt. Die Amplifikate werden mit ebenfalls genortspezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Hydrolyse-Sonden (TaqMan®-Sonden) nachgewiesen (qPCR), wodurch die diagnostische Sensitivität und Spezifität des Test im Vergleich zur klassischen SSP erhöht wird.

Wenn Amplifikate vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq Polymerase hydrolisiert und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge des PCR-Produkts ansteigt. Die Fluoreszenzsignale werden von der optischen Detektionseinheit des RT-PCR-Cyclers gemessen. Der Test wird in einer einzigen PCR-Reaktion durchgeführt, in der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen die interne Kontrolle (humanes HBB Gen), die krankheitsassoziierten Subtypen und die nicht krankheitsassoziierten Subtypen nachgewiesen werden.

3. MATERIAL

3.1 Inhalt des HISTO TYPE B*27 Q Kits

- **230 µl Q Primermix B27**, gebrauchsfertig, enthält Primer und Sonden
- **230 µl Q Mastermix**, gebrauchsfertig, enthält dNTPs, Taq Polymerase, Reaktionspuffer
- **Gebrauchsinformation**

3.2 Zusätzlich erforderliche Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur DNA Isolation (validierte Extraktionskits siehe 5.2)
- Real-Time PCR-Cycler (validierte Cycler s. 3.3)
- RT-PCR Reaktionsgefäße mit Deckeln oder Abdeckfolien (validierte Produkte s. 3.3)
- Aqua dest.
- Variable Pipetten (0,5 – 1000 µl) und Pipettenspitzen

3.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	Software Version	RT-PCR Reaktionsgefäße	RT-PCR Verschlusssystem
CFX96™ Real-Time PCR Detection System Fa. Bio-Rad	3.1.1517.0823.	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, 96 clear wells, clear frame, Product No. 4ti-1200/C, Fa. 4titude	4titude Crystal Strips, Product No. 4ti-0755 Fa. 4titude
		Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/white #HSP9655, Fa. Bio-Rad	0.2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips, optical, ultraclear #TCS0803, Fa. Bio-Rad
LightCycler® 480 System Fa. Roche	LCS480 1.5.0.39	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, Product No. 04729692001 Fa. Roche	LightCycler® 480 Sealing Foil, Product No. 04729757001 Fa. Roche

Hinweis: Bei Verwendung von anderen Real-Time-Thermocyclern, Reaktionsgefäßen und Verschlusssystemen müssen diese vom Anwender validiert werden.

4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Die Kits werden mit Kühlelementen versandt. Nach Erhalt müssen alle Reagenzien bei ≤ -20 °C in temperaturüberwachten Geräten gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der jeweiligen Reagenzien angegeben. Das auf dem Außenetikett angegebene Verfallsdatum bezieht sich auf den Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Die Testung der Auftau-Gefrierzyklen hat ergeben, dass bis zu 15 Zyklen keinen nachteiligen Effekt auf die Qualität des Kits haben.

5. TESTDURCHFÜHRUNG

5.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Tests dürfen nicht als alleinige Grundlage für klinische Entscheidungen verwendet werden.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- ◆ prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- ◆ bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- ◆ wenn möglich zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion) einrichten
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen.

5.2 DNA Isolation

Das Probenmaterial für die Isolation der genomischen DNA muss in geeigneten Abnahmesystemen verschickt werden. Für den Test ist EDTA- oder Citrat-Blut erforderlich. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen (4), derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet und dürfen nicht verwendet werden.

Es wird empfohlen, für die DNA-Isolation $\text{C}\epsilon\text{IvD}$ zugelassene Extraktionskits zu verwenden.

Validierte DNA Extraktionskits:

- Qiagen QIAamp DNA Blood Kits (Säulen)
- Chemagic™ 360 (chemagic DNA Blood Kit, Beads)
- EXTRA-GENE I (Aussalzungsmethode)

Wenn die im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden soll, und dafür keines der genannten Testkits verwendet wird, muss diese vom Anwender validiert werden.

Für den HISTO TYPE B*27 Q Test ist eine DNA-Konzentration von 10-150 ng/μl erforderlich.

Die Reinheitsindices müssen sich im folgenden Bereich befinden:

- $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = > 1,5 \text{ und } < 2,0$
Höhere Werte deuten auf das Vorhandensein von RNA hin, niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen.
- $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{230} = > 1,8$
Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln hin.

5.3 Amplifikation

Es sollten die vom Hersteller des Realtime PCR-Geräts empfohlenen Reaktionsgefäße verwendet werden bzw. die empfohlenen Materialien (siehe Punkt 3.3).

Für jede Probe die folgenden Reagenzien in ein Reaktionsgefäß pipettieren:

2 μl Q Primermix
2 μl Q Mastermix
1 μl Proben DNA (10-150 ng/μl)
5 μl Aqua dest.

Das Reaktionsvolumen für jeden Q-PCR-Ansatz beträgt 10 μl.

Wenn ein Prä-Mix aus Q Primermix, Q Mastermix und Aqua dest. für mehr als eine Probe hergestellt wird, bitte ein angemessenes Zusatzvolumen für Pipettierverluste einrechnen.

Wenn eine **Negativkontrolle (NTC)** mitgeführt werden soll, eine PCR Reaktion mit Aqua dest. anstatt der Proben-DNA ansetzen.

Die Reaktionsgefäße verschließen und die Flüssigkeit kurz herunterzentrifugieren. Sicherstellen, dass sich keine Blasen in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen auftreten, die Gefäße vorsichtig auf den Labortisch klopfen, um diese zu entfernen. Dann die PCR-Reaktion mit den folgenden Parametern durchführen.

Programm-Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl Zyklen
Initiale Aktivierung	10 Min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 Sek	96°C	40 Zyklen
Annealing + Extension	40 Sek + Messung	64°C	

Die folgenden Realtime-Geräte wurden für HISTO TYPE B*27 Q validiert:

Biorad: CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Roche: LightCycler® 480 System

Hinweis: Bei der Benutzung eines LightCycler® 480 Systems ist eine Einstellung der Ramp Rate (Heizrate) auf 4,4 °C/s für die Denaturierung bzw. 2,2 °C/s für den Annealing + Extension Schritt erforderlich. Zusätzlich muss eine „color compensation“ durchgeführt werden. Beim CFX96™ Real-Time PCR Detection System ist die Grundeinstellung des Geräts zu verwenden. Wenn andere Real-Time-Thermocycler verwendet werden, sind diese vom Anwender zu validieren.

5.4 Interpretation der Ergebnisse

Alle Testansätze mit humaner gDNA müssen Fluoreszenzsignale im gelben Kanal der internen Kontrolle aufweisen. HLA B*27 positive Proben zeigen ein positives Farbsignal im grünen Kanal. Im roten Farbkanal werden die unabhängig detektierten B*27:06, B*27:09 Allele nachgewiesen.

Farbkanal	Spezifität
Grün (B*27 positiv)	B*27:01-17,19-21,24-28,30-47,76-84,86-156,158-164
Rot (B*27:06, *27:09 positiv)	B*27:06,09 [#]

[#] Folgende Allele können nicht ausgeschlossen werden: B*27:91,106,136,154. Diese Allele sind extrem selten und keine CWD-Allele.

Die Amplifikationssignale von Negativkontrollen (B*27 negativ) sollten sich für die zwei Farbkanäle jeweils außerhalb der definierten Cq-Werte befinden. Eine Negativkontrolle mit Aqua dest. entwickelt über den gesamten Q-PCR Lauf keine Fluoreszenzsignale und dient als Kontaminationskontrolle.

Es gelten die folgenden Werte für positive Signale:

	Farbkanal	Vordefinierter Threshold	Cq-Level	LOD-Cq	Wellenlänge in nm
Interne Positivkontrolle	Gelb (VIC)	15	21	29	Excitation: 538 Emission: 554
B*27, positiv	Grün (FAM)	50	27	35	Excitation: 495 Emission: 520
B*27:06,positiv B*27:09,positiv	Rot (Texas Red)	50	23	31	Excitation: 597 Emission: 616

Hinweis: Der vordefinierte Threshold ist nur bei der Kombination von CFX96 Cycler mit klaren PCR Reaktionsgefäßen zu wählen. Werden ausschließlich weiße PCR Reaktionsgefäße verwendet, so ist die automatische Threshold Berechnung der jeweiligen Software zu wählen.

Cq-Level ist der PCR-Zyklus bei dem ein positiver Nachweis des Farbkanals vom Hintergrund erfolgt.

LOD-Cq ist der maximale PCR-Zyklus bei dem ein positiver Nachweis des Farbkanals vom Hintergrund korrekt gewertet werden kann.

6. WARN- UND ENTSORGUNGSHINWEISE

HISTO TYPE B*27 Q ist für den Gebrauch als In vitro Diagnostikum konzipiert und sollte nur von speziell ausgebildetem, qualifiziertem Personal verwendet werden. Alle Arbeiten sollten unter Berücksichtigung der guten Laborpraxis durchgeführt werden.

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut) 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).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots sollte vermieden werden. Der Gebrauch von sterilen Einmalpipetten und Pipettenspitzen wird empfohlen. Keine Reagenzien mit Trübung oder Anzeichen für mikrobielle Kontamination verwenden.

Ein Sicherheitsdatenblatt bzw. eine Erklärung zu Sicherheitsdatenblättern (SDB) kann unter www.bag-healthcare.com heruntergeladen werden.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die Kombination der Primer und Sonden gewährleistet eine eindeutige Bestimmung der in Kapitel 5.4 spezifizierten B*27 Allele. Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität des Testkits wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten HLA-Allelen überprüft.

Für den HISTO TYPE B*27 Q Kit wurden Leistungsstudien mit insgesamt 126 vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen anderer CE-zertifizierter Typisierungsreagenzien (u.a. Serologie, SSO, SSP) und/oder Sequenzierung verglichen. Dabei sind keine Diskrepanzen bei der Bestimmung des Merkmals HLA-B27 aufgetreten (100%).

DNA-Proben	Gesamtzahl (Interne und externe Studie)	Interne Studie Gesamt	Externe Studie Gesamt	Übereinstimmung in Prozent [%]
B27 negativ	101	74	27	100
B27 positiv	25	21	4	100
Gesamt	126	95	31	100

Tabelle: Zusammenfassung der Probenanzahl für die internen und externen Leistungsstudien, der Ergebnisse mit Angabe der Übereinstimmung in Prozent zur Referenztypisierung und Nachweis von HLA-B27.

8. GRENZEN DER METHODE

Da das Q-PCR Verfahren sehr empfindlich auf Kreuz-Kontaminationen von DNA reagiert, ist bei der Isolation hierauf zu achten. Validierungstests innerhalb der Leistungsbewertungsstudie des HISTO TYPE B*27 Q Kits haben gezeigt, dass DNA Mengen von 10 ng bis 150 ng pro Reaktion keinen signifikanten Einfluss auf den spezifischen Nachweis des Gewebemerkmals HLA B*27 haben.

Es sollte besonders darauf geachtet werden, Kontaminationen der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien mit Amplikons oder DNA zu vermeiden. Die regelmäßige Durchführung von

Wischtest (z.B. BAG Wischtest, REF 7091) und die Mitführung einer Negativkontrolle mit Aqua dest. bei jedem Testlauf werden empfohlen.

In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Cq > N.A.).

Im Fall einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle (gelber-Farbkanal) ist der PCR-Laborplatz von DNA zu dekontaminieren und gegebenenfalls die Reagenzien auszutauschen.

Alle Geräte (z.B. Pipetten, Realtime-Geräte) müssen entsprechend der Herstellervorgaben kalibriert werden.

9. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Interne Qualitätskontrollen für neue Lots des HISTO TYPE B*27 Q Kits können mit einer Kombination von DNA Proben mit bekannten HLA Typ durchgeführt werden. Eine interne Kontrolle zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation ist im Q Primermix enthalten.

Die Mitführung von Negativkontrollen zum Nachweis möglicher Kontaminationen wird empfohlen. Zu diesem Zweck wird eine PCR Reaktion ohne DNA angesetzt (NTC).






10. PROBLEMBEHANDLUNG

Fehler	mögliche Ursache	mögliche Lösung
Schlechtes bzw. kein Signal	Vorhandensein eines Inhibitors.	Frische Reagenzien verwenden.
	Keine gDNA im Reaktionsansatz.	Test wiederholen. Auf richtiges Pipettieren achten.
	Falsche Amplifikationsparameter.	PCR-Programm sowie Ramp Rate (Heizrate) überprüfen.
	Verunreinigte oder degradierte DNA.	DNA-Konzentration/Qualität überprüfen. DNA auf einem Gel überprüfen. DNA-Isolierung wiederholen.
	Fluoreszenzsonden bzw. Primer degradiert.	Neuen Primer Mix verwenden. Lichtexposition sowie häufiges Einfrieren/Auftauen vermeiden. Lagerungsbedingungen beachten!
	Bläschen im Reaktionsansatz / Restflüssigkeit an der Innenwand.	Vorsichtiges Pipettieren. Abzentrifugieren der PCR Platte.
	Nicht kompatible bzw. qualitativ minderwertige qPCR Plastikware.	Verwendung von kompatibler und hochwertiger Plastikware. Siehe Punkt 3.3.
	Falsche Signalverrechnung durch abnormale Amplifikationssignale in den initialen Zyklen eines Laufes.	Anwendung von Korrekturmaßnahmen durch Software (z.B. "apply fluorescence drift correction"-Funktion von Bio-Rad oder Ausschluss der ersten fünf Cyclen aus der Analyse).
	Verdunstung der Reagenzien durch unsachgemäßes Verschließen der PCR Gefäße	Prüfung auf korrektes Verschließen. Vorsicht bei Klebefolien im Randbereich.
Signal in Negativkontrolle	Kontamination der Negativkontrolle mit DNA	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.

11. VERWENDETE MARKENNAMEN

TaqMan[®] ist ein Markenname der Firma Roche Molecular Systems Inc.

12. ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
HLA TYPING	Zweckbestimmung: HLA-Typisierung
IFU	Gebrauchsinformation
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nr.
Q Primermix B27	Primermix zur Bestimmung von HLA-B*27 mit dem HISTO TYPE B27*Q Kit
Q Mastermix	Mastermix für den HISTO TYPE B*27 Q Kit
REF	Bestell-Nr.

13. 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. Kahn, MA et al., 2007. Autoimmunity Reviews 6: 183–189
4. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

Instructions for use in other languages see <http://www.baq-healthcare.com>
<http://service.baq-healthcare.com> or phone +49 (0)6404-925-125