

attomol® HLA-B*27

Testkit zur Bestimmung von HLA-B*27
(Nicht zur Gewebetypisierung zu verwenden!)

In-vitro-Diagnostikum

40 Reaktionen

Best.-Nr.: 1030

**1. Einführung**

Die Humanen Leukozyten-Antigene (HLA) sind Glycoproteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. major histocompatibility complex = MHC), die auf nahezu allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden. Sie sind für die immunologische Individualität des Menschen (Erkennung von „körpereigen“ und „körperfremd“) mit verantwortlich. Die HLA-B-Antigene gehören gemeinsam mit den HLA-A und HLA-C zu den MHC-Klasse-I-Molekülen und sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert (Thomas, 2000, Labor und Diagnose, 5. erweiterte Auflage, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, S. 878-888).

Von HLA-B existieren verschiedene Formen, die man als Determinanten bezeichnet (z.B. HLA-B7, -B8, -B15, ...). Eine dieser Determinanten, das HLA-B27, wurde bereits 1973 eng mit rheumatischen Erkrankungen, insbesondere der ankylosierenden Spondylitis (Spondylitis ankylosans, SPA, Morbus Bechterew) in Zusammenhang gebracht (Brewerton et al., 1973, Lancet 1:904-907). Träger von HLA-B27 haben ein 87mal höheres Risiko an SPA zu erkranken, als Träger anderer HLA-B-Determinanten. Die Krankheit manifestiert sich sehr häufig zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr und tritt überwiegend bei Männern auf (ca. 90 %). HLA-B27 kommt bei etwa 7 % der westeuropäischen Bevölkerung vor. Bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis dagegen tritt es zu 80-90 % auf (Isselbacher et al., 1995, Harrison's Innere Medizin 1, 13. Auflage, Blackwell-Wissenschaftsverlag, S. 453-460). Der genaue Pathogenesemechanismus ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt (Taurog, J Rheumatol 2010, 37(12):2606-16).

Bisher war die serologische Bestimmung von HLA-B27 weit verbreitet. Sie wird jedoch zunehmend durch molekularbiologische Methoden ersetzt, da diese ohne lebende Zellen auskommen und in der Regel eine einfachere und schnellere Durchführung erlauben.

Testspezifität:

Die in diesem Test verwendeten Primer sind für die Detektion der HLA-B*27-Subtypen 1-145 konzipiert worden. Die HLA-B*27-Subtypen 12, 16, 18, 26, 27:05:09, 29, 31, 85, 92, 101, 109 und 119 können, vorbehaltlich einer in vitro-Testung, wahrscheinlich nicht detektiert werden, da bei Sequenzanalysen Fehlpaarungen innerhalb der Primerbindungsstellen festgestellt wurden. Zusätzlich erfasst der vorliegende Test auch HLA-B73-positive Proben. Die Häufigkeit des HLA-B73-Alles in Deutschland wird mit etwa 0,08 % angegeben (<http://www.allelefrequencies.net>, Recherchestand 15.09.2015).

2. Wichtige Hinweise

- angegebene Lagerungstemperatur des Testkits einhalten
- Testkit ausschließlich für *in-vitro*-Anwendungen benutzen
- Testkit stets anhand der beigefügten Bedienungsanleitung abarbeiten
- Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden
- zur Durchführung der Tests ist ein entsprechend eingerichtetes molekularbiologisches Labor sowie in *in-vitro*-DNS-Amplifikation geschultes Fachpersonal erforderlich
- bei der Abarbeitung des Tests sind stets Handschuhe zu tragen
- Patientenproben sollten als potentiell infektiös behandelt und nach der Verwendung dementsprechend entsorgt werden
- Reagenzien zur Durchführung der PCR getrennt von Patienten-DNS-Templates und Amplifikationsprodukten lagern, zum Pipettieren der PCR-Ansätze und der amplifizierten Proben unbedingt getrennte Pipettensätze mit gestopften Pipettenspitzen (Filtertips) in getrennten Räumen verwenden

3. Testbestandteile

Art.-Nr.	Reagenzienbezeichnung	Menge	Lagertemperatur
38	Deionisiertes PCR-H ₂ O	0,2 ml	-20 °C
107	PCR-Puffer III	1 ml	-20 °C
105	Primer HLA-B*27 (violette Tubes)	2 Tubes mit lyophilisierten Primern, zu lösen mit 450 µl PCR-Puffer III (Art.-Nr. 107) je Tube	-20 °C

Die Haltbarkeit des gesamten Reagenziensatzes ist auf dem äußeren Etikett des Testkits angegeben.

4. Benötigte Reagenzien, Geräte und Hilfsmittel, die nicht mitgeliefert werden

- zu untersuchende Patienten-DNS-Proben präpariert mit Reinigungsbestecken der Firma Qiagen oder Fujifilm (genomische DNS, Konzentration ca. 20 ng/µl, gelöst in Aqua dest. bzw. TE-Puffer)
- HotStarTaq DNA-Polymerase der Firma Qiagen
- Kontrolltemplate (HLA-B27-positive DNS)

- Mikropipetten (Volumenbereich 0,5-1000 µl) mit sterilen, gestopften Pipettenspitzen (Filtertips)
- Thermocycler, Eppendorf-Tubes (0,2 ml; 1,5 ml)
- Elektrophoresesystem für Agarosegele und dazugehörige Chemikalien (Agarose oder 3 %ige Agarosefertiggele, Elektrophoresepuffer, Probenpuffer, DNS-Farbstoff, UV-Tisch)

5. Testprinzip

Mit dem vorliegenden Test kann festgestellt werden, ob der untersuchte Patient die Determinante HLA-B27 ausgebildet hat oder nicht. Es kann keine Aussage über eine andere HLA-B-Determinante oder über HLA-B27-Subtypen getroffen werden. **Der Test ist nicht zur Bestimmung von HLA-B-Gewebetypen vorgesehen, sondern dient ausschließlich zur Abschätzung des Risikos an den unter 1. genannten rheumatischen Erkrankungen, insbesondere der SPA, zu erkranken.**

Nach Isolierung der DNS aus Patientenblut erfolgt deren Einsatz in einer Amplifikationsreaktion. Die Ergebnisse der Reaktion werden durch eine Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Ist eine Patientenprobe HLA-B27-positiv, erhält man im Agarosegel eine 284 bp große HLA-B27-spezifische Amplifikatbande. Bei HLA-B27-negativen Proben fehlt diese Bande.

In allen Proben (ausgenommen der Negativkontrolle = PCR-Leerwert) muß eine HLA-B27-unspezifische Kontrollbande zu erkennen sein, die als interner Standard dient (Amplifikationskontrolle). Die Größe der Kontrollbande beträgt 383 bp (siehe Abb.). Ist in einer Bestimmung die Kontrollbande nicht sichtbar, muß davon ausgegangen werden, daß die Amplifikation fehlgeschlagen ist. In diesem Fall kann keine Genotypisierung der Probe vorgenommen werden und eine erneute Bestimmung ist erforderlich. Zur eindeutigen Zuordnung der Banden sollte in jeder Probenserie eine Positivkontrolle mitgeführt werden.

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnoseerstellung sollten vom Arzt alle möglichen klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

6. Arbeitsanleitung

Es ist notwendig, in jeder Probenserie folgende Kontrollen mitzuführen:

1. Negativkontrolle (PCR-Leerwert)
2. Positivkontrolle (HLA-B27-positives Kontrolltemplate)

Das Kontrolltemplate kann separat vom Hersteller dieses Testkits bezogen werden (Art.-Nr. 106). Bereits beim Anwender als positiv bestimmte Patientenproben können auch als Kontrolltemplate verwendet werden.

Arbeitsschritte:

- **DNS-Präparation** aus Patientenblut nach Standardverfahren
- **Lösen der Primer** mit 450 µl PCR-Puffer III (Art.-Nr. 107) je Tube, gut mischen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren, ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren; man erhält den **PCR-Prämix**
Hinweis: Werden für eine Probenserie weniger als 450 µl PCR-Prämix gebraucht, kann der nicht benötigte PCR-Prämix bei -20 °C bis zur späteren Verwendung aufbewahrt werden.
- **Herstellung des PCR-Mixes** durch Zugabe einer HotStartTaq DNS-Polymerase (Qiagen) zum PCR-Prämix: Die Menge an PCR-Prämix für 1 Reaktionsansatz (20 µl) ist mit der Anzahl der durchzuführenden Bestimmungen zu multiplizieren und ein angemessenes Überschußvolumen zu berücksichtigen (Bsp. für 8 Reaktionen: 8 x 20 µl + 10 µl Überschußvolumen = 170 µl PCR-Prämix). Anschließend ist die HotStartTaq DNS-Polymerase (5 U/µl) im benötigten PCR-Prämix 1:100 zu verdünnen (Bsp.: 170 µl PCR-Prämix + 1,7 µl 5 U/µl Polymerase). Der PCR-Mix muß abschließend gut gemischt werden.
- **Pipettieren der Reaktionsansätze** in 0,2 ml-Tubes:

Negativkontrolle:	Positivkontrolle:	Patientenbestimmung:
20 µl PCR-Mix	20 µl PCR-Mix	20 µl PCR-Mix
+ 5 µl PCR-H ₂ O	+ 5 µl Kontrolltemplate (ca. 20 ng/µl)	+ 5 µl DNS (ca. 20 ng/µl)

- **PCR-Inkubation** der Ansätze im Thermocycler unter folgendem Temperaturregime:

initiale Aktivierung:	15 min 95 °C		
5 Zyklen:	1 min 94 °C	1 min 60 °C	1 min 72 °C
30 Zyklen:	30 s 94 °C	30 s 60 °C	30 s 72 °C
finaler Syntheseschritt:	2 min 72 °C		
Halteprogramm:	4 °C ohne zeitliche Begrenzung		
- **Auswertung** durch Auftragen von je 10 µl der PCR-Ansätze auf ein Agarosegel (2,5 - 3 %ig) nach laborinterner Verfahrensweise

- **Genotypisierung** der Patientenproben durch Zuordnung der entstandenen Banden (siehe Abb.)

HLA-B*27:

-- = HLA-B*27 negativ
 + = HLA-B*27 positiv

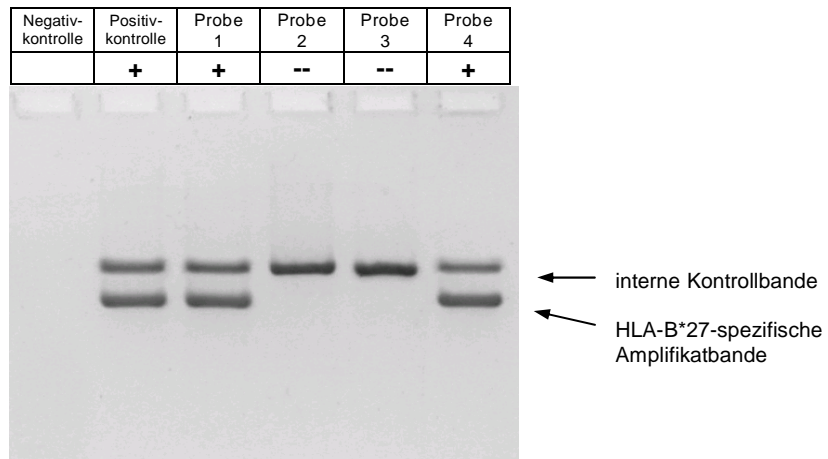


Abb.: Beispiel für die Auswertung eines 3 %igen Agarosegels

Bei eventuell auftretenden Problemen während der Testdurchführung oder -auswertung wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

Anhang 1

Übersicht über die verwendeten Etikettensymbole

	Erklärung der Symbole	explanation of symbols
	Hersteller	manufacturer
	Chargennummer	batch number
	verwendbar bis	expiry date
	Lagerung zwischen +2 °C und +6 °C	store between +2 °C and +6 °C
	Lagerung bei maximal -20 °C	store at a maximum of -20 °C
	Bestellnummer	catalogue number
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum	<i>in vitro</i> diagnostic medical devices
	Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen	content sufficient for <n> determinations
	Gebrauchsanweisung beachten	consult instructions for use