



EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6

**REF** 90060-C6 (pro 192 stanovení)

Složení soupravy:

1 x 580 µl HLA-B27 Mix
1 x 150 µl PC DNA HLA-B27
Návod k použití

Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Zbývající komponenty musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

Účel použití

Souprava EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 slouží ke genotypizaci HLA-B27 alely (subtypy B*2701-2759) z izolované DNA.

Princip metody

Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR. Pro detekci alely HLA-B27 a interní kontroly jsou použity primery a značené sondy (FAM a HEX).

Obecný úvod

Human Leukocyte Antigen (HLA) B27 (podtypy B * 2701 - 2759) je povrchový antigen třídy HLA I, který je kódován B lokusem hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) na krátkém raménku chromozómu 6. Přítomnost antigenu HLA-B27 je asociována s ankylozující spondylitidou (AS) a spondyloartrózi (SPA). Zvýšený výskyt tohoto antigenu je spojován i s dalšími onemocněními, jako jsou Reiterův syndrom nebo uveitida. Asociační studie zjistily asociaci mezi HLA-B27 antigenem a AS ve všech etnických a rasových skupinách po celém světě, nicméně prevalence HLA-B27 antigenu a míra jeho spojení s AS se liší. Například výskyt antigenu HLA-B27 u bělochů je asi 8%, u Severoafričanů 4%, u Číňanů 2-9% a u Japonců 0,1-0,5%. U Severoevropanů je pak pouze 8% osob z celkové populace nositelem alely HLA-B27, ale více než 90% pacientů s AS nese tuto variantu genu. Naproti tomu mezi Afroameričany nese tento gen 2% - 4% z celkové populace, ale pouze 50% - 60% pacientů s AS nese tuto variantu genu.

Z těchto důvodů není vhodné použít HLA-B27 test pro vyšetření asymptomatické populace pro detekci AS, ale test ukazuje na zvýšenou pravděpodobnost výskytu AS u symptomatického pacienta. Navíc přítomnost HLA-B27 antigenu ovlivňuje klinické projevy AS, protože u HLA-B27 pozitivních pacientů je nástup onemocnění ve výrazně mladším věku a je evidován vyšší výskyt očních zánětů (akutní přední uveitida) a zasažení kyčelních kloubů.

Souprava EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 detekuje alelu HLA-B27 (podtypy B*2701-2759). Jako vnitřní kontrola je použit gen SYPL2 (synaptophysin-like 2).



Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Doporučená izolace DNA:

Krev

Automatická: cobas[®] 6800/8800 Systems (Roche)

Automatická izolace:

Izolujte DNA ze vzorku 200 µl plné krve, 3x, 5x nebo 7x zředěného PBS pufrém nebo fyziologickým roztokem na minimální objem 350 µl pomocí cobas[®] 6800/8800 Systems (Roche), dle protokolu. Ředění nemá vliv na kvalitu výsledků.

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Sterilní automatická pipeta a sterilní špičky (1 ml – 10 ml) s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- PBS pufr nebo fyziologický roztok.
- Zařízení pro Real Time – kit je optimalizován pro přístroj **cobas[®] 6800/8800 Systems (Roche)**.
 - cobas omni Utility Channel Reagent kit obsahující Utility Channel Master Mix Reagent 2 (UC MMx-R2) a Utility Channel Reagent Cassete with Protease, internal control, elution buffer, Master Mix Reagent 1 (MMx-R1) a prázdný kontejner (kazetu) pro připravený MasterMix Reagent 2
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodné pro daný Real Time přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

Konfigurace RealTime PCR přístroje

- Pro detekci HLA-B27 alely je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci genu SYPL2 (interní kontrola) alel je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – emise 548 nm)

cobas[®] 6800/8800 Systems (Roche):

1. V nabídce “Utility channel tool” (UC), vytvořte novou “UC analysis package” nebo otevřete již existující nepublikovanou analýzu.

V nabídce “UC analysis package” aktualizujte informace o názvu UC analysis package a/nebo ID reagenční kazety, pokud je to zapotřebí.



2. Zvolte tlačítko "PCR profile" v nabídce "UC analysis package" a nastavte následující teplotní profil pro PCR:

Pre-PCR step

55°C 120 s

94°C 5 s

1st Measurement – 5 cycles

95°C 5 s

62°C 30 s *Data collection

2nd Measurement – 45 cycles

91°C 5 s

62°C 20 s *Data collection

3. Zvolte tlačítko "Parameter" a definujte nebo editujte následující parametry: sample material, processing volume, target channel names a target calling sensitivity.

V menu "Pipetting profiles group" nastavte "U_Simple sample" jako "Sample material" a 200 µl v drop-down menu "Processing volume". Volbou "Add" přidejte profil.

4. V menu "Channel", zvolte Channel 2 a Channel 3 a vyplňte pole "Target name" a "Sensitivity (RFI min)" následujícími parametry:

Channel 2 pro "target" HLA-B27, RFI (min)= 2.5

Channel 3 pro "target" IC (SYPL2), RFI (min)= 2.5

5. Nakonec uložte pomocí volby "Save as" nebo "Save".

Příprava reagentů

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagenty zcela rozmrazené, krátce promíchané na vortexu a stočené.

Příprava reakčního mixu

UPOZORNĚNÍ: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

Vezměte jednu zkumavku s HLA-B27 Mixem a po rozmrazení napipetujte **564 µl HLA-B27 Mixu** do nové zkumavky s **9,4 ml UC MMx-R2**. Po smíchání napipetujte **9,96 ml tohoto mastermixu** do 2. řady reakční kazety.

Pro detailní instrukce, prosím, použijte manuály cobas® omni Utility Channel Reagent Kit a cobas® omni Utility Channel CE-IVD (Roche) od výrobce přístroje cobas® 6800/8800 Systems (Roche).

Detekce: Připravte minimálně 350 µl zředěné plné krve a analyzujte dle protokolu výše.

Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s PC DNA HLA-B27 a po rozmrazení smíchejte 10 µl pozitivní kontroly s 400 µl of fyziologického roztoku nebo PBS puřem a analyzujte stejným způsobem jako vzorky plné krve.



Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. Nezamrazujte mikrozkušavky s MasterMixem opakovaně. Za těchto podmínek je souprava stabilní nejméně 14 dní.

Vložte reagenční kazetu a vzorky do přístroje cobas® 6800/8800 System (Roche) a spusťte program dle kapitoly „Konfigurace RealTime PCR přístroje“ výše.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Po smíchání HLA-B27 Mixu s UC MMx-R2 a napipetování do reakční kazety musí být kazeta skladována při 2 – 8 °C v lednici nebo chlazená v cobas® 6800/8800 System (Roche). Při dodržení těchto podmínek je mastermix stabilní 1 měsíc. Reakční kazeta s mastermixem může být použita 10krát a 30 dní po prvním použití nebo do expirace jednotlivých komponent.

Pozitivní kontrola PC DNA HLA-B27 je stabilní 10 zamrazovacích cyklů a má být skladována při -20 °C.

Odečet výsledků

cobas® 6800/8800 Systems (Roche)

V nabídce „Analysis Settings“ vyberte možnosti „Automatic Threshold“ a „Automatic Baseline“ a zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek pro HLA-B27 alelu: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu „Channel 2“ (FAM) specifického pro HLA-B27 alelu. Hodnota „RFI min.“ musí být nastavena na 2.5 (Sensitivity). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci, nezobrazí se ct hodnota.

Interní kontrola je amplifikována pokaždé. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu „Channel 3“ (HEX) specifického pro SYPL2 gen. Hodnota „RFI min.“ musí být nastavena na 2.5 (Sensitivity).

Interpretace výsledků

Negativní výsledek:

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-B27 Mixu v kanálu FAM, lze výsledek interpretovat jako HLA-B27 negativní. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) musí být pozitivní – viz odstavec Kontrolní postup.

Pozitivní výsledek:

Amplifikační signál v FAM kanálu se objeví před 35. cyklem. HLA-B27 alela byla detekována ve vzorku. Vzorek je HLA-B27 pozitivní.

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

Inhibovaný vzorek:

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu u HLA-B27 Mixu v obou kanálech FAM a HEX, je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky DNA.



Kontrolní postup

Souprava EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 využívá jako vnitřní izolační kontrolu detekci lidského genu SYPL2 (synaptophysin-like 2) v HLA-B27 Mixu v kanálu HEX. Gen pro SYPL2 je přítomen v každém vzorku lidské DNA, tudíž není nutné přidávat ke vzorku Vnitřní kontrolu. Inhibiční izolační kontrola sleduje kvalitu izolace DNA a detekuje případné chyby v procesu izolace DNA. Detekuje také případné inhibice amplifikačního procesu. V případě že vzorek je HLA-B27 negativní, Ct vnitřní kontroly musí mít hodnotu 35 nebo méně.

Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující DNA izolaci a RealTime PCR detekci můžete použít referenční materiál pozitivní pro HLA-B27 alelu. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

Řešení problémů

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly, může jít o závadu v postupu izolace DNA, použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.
2. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.

Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

Souprava EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 specificky detekuje přítomnost alely HLA-B27. Kit je určen pro detekci lidské DNA o koncentraci vyšší než 1 ng/μl.

V rámci testování funkčních charakteristik EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 kitu bylo analyzováno 166 vzorků. EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 kit diagnostikoval všech 124 vzorků jako HLA-B27 pozitivní. Celkem 42 bylo správně kitem EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 určeno jako HLA-B27 negativní.

Výpočet specifity a sensitivity EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 kitu je uvedeno v Tabulce 1. Sensitivita a specifita EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 kitu je 100%.

Analytická citlivost je 1 ng DNA v reakční směsi.

Analytická specifita metodiky je 100% a byla ověřena prohledáváním DNA databází.

Klinická specifita soupravy EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 byla testována na 166 vzorcích lidské DNA izolovaných z plné krve.

Tabulka 1. Výpočet sensitivity a specifity EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 kitu

A = 124 Skutečně pozitivní	B = 0 Falešně pozitivní
C = 0 Falešně negativní	D = 42 Skutečně negativní

$$\text{Sensitivita} = A/(A+C) = 124/(124+0) = 100\%$$

$$\text{Specifita} = D/(D+B) = 42/(42+0) = 100\%$$



Diagnostické funkční charakteristiky:

Specifita soupravy EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 byla testována na 166 vzorcích lidské DNA izolovaných z plné krve. Všechny 166 vzorků kit EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 vyhodnotil správně. Klinická specifita soupravy EliGene® Spondylitis HLA-B27 C6 je 100%.

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci ≥ 1 ng DNA molekul v reakční směsi.

Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola (SYPL2 gen) pro kontrolu procesu izolace a amplifikace společně s pozitivní kontrolou sledující funkčnost mastermixu.

Limitace testovacího postupu

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace DNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.

Upozornění

Obsah zkumavky s HLA-B27 Mixem je jednorázový a stabilní při -20°C do uplynutí expirace. Nezamrazujte zkumavky s HLA-B27 Mixem opakovaně! Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121°C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započatím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.



- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagenty poskytované v rámci kitu a reagenty doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagenty z různých šarží!
- Nepoužívejte reagenty ze souprav jiných výrobců!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagenty musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

- Mikrozkmavky obsahující mix (HLA-B27 Mix) jsou určeny pouze pro jedno použití a musejí být použity pouze pro přípravu reakční směsi.
- S tímto mixem pracujte podle bezpečnostních vět (P):

P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

Literatura

Khan MA. Remarkable Polymorphism of HLA-B27: An Ongoing Saga. Curr Rheumatol Report. 2010; 12: 337-41

Robinson PC, Brown MA. 2012. The genetics of ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. Rheum Dis Clin North Am. 38(3):539-53



Thomas GP, Brown MA. Genetics and Genomics of Ankylosing Spondylitis. Immunol Rev. 2010; 233:162-180.

Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98/79/EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: info@elisabeth.cz