



IVD

HLA B27 Strip

Souprava pro detekci alel B*27

HLA B*27 STRIP

Souprava pro detekci alel HLA B*27

POUŽITÍ

Test HLA B*27 Strip umožňuje stanovení alely HLA B*27. Tato skupina alel je spojována s celou řadou patologických stavů, jako je ankylozující spondylitida (88-95% pacientů), akutní přední uveitida (50-60% pacientů), reaktivní artritida (60-85% pacientů) a zánětlivé onemocnění střev (50-60% pacientů).

Tento test je pouze nástrojem, který pomáhá odborníkům v diagnostice indikovaných patologií. Tato souprava nemůže být jediným diagnostickým nástrojem.

PRINCIP:

Hlavní histokompatibilní systém zahrnuje soubor genů, většinou vysoce polymorfních, jejichž produkty jsou exprimovány v široké škále buněk a jsou odpovědné za „adaptivní“ imunitní odpověď. Tyto geny jsou přítomny u všech obratlovců a u lidí jsou známy jako systém HLA (Human Leukocyte Antigen). Proteiny kódované těmito geny se nazývají „molekuly HLA“ nebo „antigeny HLA“.

Byla prokázána existence genetické predispozice k různým onemocněním u jedinců nesoucích antigen histokompatibility HLA-B*27: ankylozující spondylitida (1, 2, 3, 4), akutní přední uveitida (1, 3, 4), reaktivní artritida (1, 4), zánětlivé onemocnění střev (4).

Ankylozující spondylitida (nebo ankylozující spondylartritida, AS) je chronické, invalidizující revmatické onemocnění, které je častější zejména u bílých lidí (0,5–1% populace). Obvykle se objevuje u mužů ve věku 20 až 30 let.

Akutní přední uveitida je nejčastější formou endogenní uveitidy. Uveitida je zánět uveálního traktu, pigmentovaná vaskulární vrstva, která leží mezi bělmem a sítnicí. Hlavními příznaky jsou fotofobie, bolest, erytém, snížené vidění a slzení.

Reaktivní artritida je zánět jednoho nebo více kloubů, který se projevuje jako reakce na infekci a který obvykle způsobuje zánět močových a pohlavních cest, kloubů a očí.

Zánětlivé onemocnění střev označuje skupinu poruch, které postihují převážně střeva a které jsou charakterizovány chronickým zánětem, který nemá tendenci ustupovat. Spojuje různá onemocnění, zejména však Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. Byla prokázána existence genetické predispozice k různým onemocněním u jedinců, kteří jsou nositeli histokompatibilního antigenu HLA-B * 27: ankylozující spondylitida, akutní přední uveitida, reaktivní artritida, zánětlivé střevní onemocnění.

Postup soupravy HLA B27 Strip má tři kroky: a) extrakce DNA, b) amplifikace PCR ac) hybridizace / vývoj.

a) Extrakce DNA (činitla, která nejsou součástí soupravy).

b) PCR amplifikace

V tomto kroku probíhá simultánní amplifikace fragmentu kontrolního genu (HCP5) a exonu 2 alel HLA-B * 27.

c) Hybridizace a vývoj

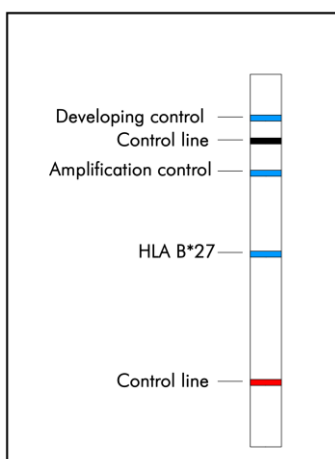
Během tohoto kroku dochází ke specifické vazbě fragmentů DNA amplifikovaných pomocí PCR za použití řady sond, které jsou kovalentně vázány na nylonovou membránu.

Každá membrána má následující sondy:

- sonda pro různé alely HLA B * 27.
- sonda pro gen HCP5, používaná jako interní kontrola PCR,
- kontrolní sonda vývoje.

Kromě toho tyto membrány obsahují černou a červenou čáru pro sledování polohy na proužku během interpretace výsledků.

Detekce fragmentů, které hybridizují s různými sondami, se provádí pomocí konjugátu streptavidin-peroxidáza, který se váže na biotinový marker přidaný k fragmentům DNA amplifikovaným pomocí PCR. Po přidání peroxidázového substrátu (TMB) se v místech, kde proběhla hybridizace, objeví modrá sraženina. Konečným výsledkem testu je vzor pásů, které lze interpretovat pomocí kontrolního proužku.



OBSAH SOUPRAVY:

HLA B27 STRIP			16 testová souprava	48 testová souprava
	Membrány	STRIPS	16	48 TESTŮ
	8-pozic rámeček	PL	2	--
PCR Reagent REAG PCR	PCR směs	REAG PCR MIX	0,8 ml	1,2mlx2
	Primery	REAG PRIMER	0,11 ml	0,275 ml
	Taq	REAG TAQ	0,030 ml	0,070 ml
	Denaturace	SOLN DN	1 ml	1 ml
	Hybridizační pufr	BUF HYB	60 ml	125 ml
	Promývací pufr 1	BUF WASH 1	100 ml	250 ml
	Konjugát	CONJ HRP	60 ml	125 ml
	Promývací pufr 2	BUF WASH 2	130 ml	250 ml
	Substrát	SUBS TMB	30 ml	65 ml
	Návod		1	1
	Interpretační tabulka		1	1

MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY:

Pro použití soupravy je potřeba následující materiál, který není součástí soupravy:

1. Mikrozkmavky pro PCR
2. Mikropipety a příslušné špičky (sterilní nebo ošetřené UV, ideálně s filtrem)
3. Pinzeta/kleštičky a tužka (volitelné)
4. Hodiny
5. Teploměr

VYBAVENÍ, KTERÉ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY:

Při použití je potřeba další materiál,:

1. Thermoshaker – třepačka pro destičky
Souprava byla validována pro: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio).
2. Termocykler
Následující přístroje byly úspěšně používány se soupravou: MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad), G -Storm GS1 (Gene Technologies), GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) and FlexCycler (Analytikjena)).

UPOZORNĚNÍ

1. Pouze pro *in vitro* použití.
2. Přesně následujte pracovní postup. Modifikace předepsaných **kroků a teplot** může významně ovlivnit výsledek
3. Všechny materiál musí být bez kontaminace DNA. Doporučuje se použití špiček s filtrem pro zamezení kontaminace aerosolem. Ujistěte se, že byla provedena všechna obvyklá opatření pro amplifikaci. Používejte autoklávovaný materiál pro hybridizaci a vývoj.
4. Součásti soupravy skladujte podle návodu
5. Nekombinujte části souprav různých šarží
6. Nepoužívejte reagentie po datu expirace
7. Stripy jsou pro jedno použití.
8. Dodávaná plata jsou pro jedno použití.
9. Do každého žlábků dejte pouze jeden strip.
10. V případě, že je poškozený vnější obal soupravy, ale komponenty nebyly poškozeny, je možné soupravu používat
11. Jednotlivé komponenty je třeba likvidovat podle místních zákonů o odpadu.
12. Se vzorky pacientů je třeba vždy nakládat jako s potenciálně infekčním. Je třeba dodržet standardy ochrany prostředí a bezpečnosti práce.
13. Po použití doporučujeme se stripy manipulovat se stejnou opatrností, jako se vzorky. Je třeba je pokládat za nebezpečný biologický materiál.
14. Denaturační roztok obsahuje <2 % NaOH a může podráždit zrak i kůži (H314 a P280, P305, P351, P338, P310).

SKLADOVÁNÍ

Všechny reagentie skladujte při 2-8 °C. V některých roztocích se během skladování při nízké teplotě mohou objevit precipitáty (hybridizační pufr, promývací pufr 1 a 2, konjugát), to neovlivní kvalitu testu. Při temperování reagentií dojde k opětovnému rozpuštění: při laboratorní teplotě (konjugát) nebo při 42 °C (hybridizační pufr a promývací pufr 1 a 2).

Datum expirace je vytištěno na nálepce.

VZORKY

Základním materiálem pro provádění testu je DNA o známé koncentraci. Tato DNA může být extrahována z krve (EDTA nebo citrát), ze slin nebo z tkáně a měla by mít dostatečnou kvalitu na PCR amplifikaci. ($R_{260/280} > 1,5$)

Některé extrakční protokoly, které zajišťují dobrý výsledek HLA B27 Stripu byly následující:

- Periferní krev získaná venepunkcí; purifikované DNA metodou solení.
- Krev odebraná vpichem prstu; purifikované DNA pomocí soupravy pro extrakci DNA Operon (odkazy 3.149.020.64.000 a 3.149.050.64.000).
- Vzorky slin odebrané a extrahované pomocí soupravy Norgen Biotek
- Vzorky DNA purifikované z periferní krve pomocí robotické pracovní stanice "Saliva DNA collection, isolation and purification kit".
- Stanice pro automatické čištění DNA Qiacube a soupravy QIAamp DNA Blood MiniKit (Qiagen).
- Vzorky DNA purifikované z periferní krve pomocí robotické pracovní stanice pro automatizované čištění DNA AmpliPrep (Roche) a soupravy TNAI (Roche).

DNA vzorky uchovávejte při 2-8 °C pro použití ihned nebo při -20 °C pro delší dobu skladování.

HLA B27 STRIP – PRACOVNÍ POSTUP

1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Příprava PCR:

Důležité: před otevřením víček reagentie krátce centrifugujte. To zajistí, že celý obsah bude na dně zkumavky.

- Připravte potřebný počet PCR zkumavek podle počtu DNA na amplifikaci
- Do každé PCR zkumavky přidejte:

39 μ l PCR premixu + 5 μ l primerů + 1 μ l Taq + 5 μ l DNA (50 ng/ μ l).

Kdekoliv je možné během přípravy udržujte reagentie a směsi při 2-8 °C

Pokud budou amplifikovány různé vzorky DNA, připravte běžnou směs tak, aby bylo možné přidat 45 μ l směsi + 5 μ l DNA (50 ng/ μ l).

Například:

Počet PCR	PCR premix	Primery	Taq
1	39 μ l	5 μ l	1 μ l
3	136.5 μ l	17.5 μ l	3.5 μ l
5	214.5 μ l	27.5 μ l	5.5 μ l
8	351 μ l	45 μ l	9 μ l

* směs obsahující všechny PCR komponenty by měla být vždy připravena v nadbytku s ohledem na kompenzaci ztráty během pipetování.

Vzhledem k požadavkům „správné laboratorní praxe“ by měla být v každé sérii zařazena negativní kontrola, aby byly vyloučena kontaminace a je-li vyžadováno, také pozitivní kontrola.

Amplifikace:

Odpovídající koncentrace DNA je důležitá pro dobý výsledek.

Umístěte zkumavky do termocykleru, pokud je třeba, přidejte kapku Nujol mineral oil do každé PCR reakce a amplifikujte podle následujícího programu:

94 °C, 3 min	
35 cyklů:	96 °C, 30 s
	61 °C, 30 s
	72 °C, 30 s
72 °C, 5 min	
4 °C	

Verifikace PCR

Výsledek může být ověřen na 2 % agarózovém gelu. Aplikujte 5 µl z každé PCR do jamky na gelu.. Elektroforéza probíhá při 100 V 80 min a odečítá se pod UV světlem. Velikosti amplifikovaných produktů jsou následující:

Kontrolní gen:	149 bp
HLA B*27 :	190 bp

Po ukončení amplifikace proveďte buď ihned vyvíjení stripu nebo vzorky uchovejte po dobu 24 hod. při 2-8 °C nebo po delší dobu zmražené při -20°C.

2. Hybridizace/ Vývoj stripu

Na vyžádání Operon poskytne pracovní postup na specifický přístroj (Profiblot oř Autoblot3000H) nebo pro manuální provádění analýzy (PST-60HL manuální – thermoshaker – postup na konci pracovního návodu).

V denaturačním kroku se pipetuje do žlábků

12,5µl denaturačního roztoku + 12,5 µl směsi PCR

Produkt byl testován na řadě různých obecných platform komerční názvy ověřených byly výše specifikované nicméně nejsou určeny výlučně. Souprava a pracuje korektně na kterémkoliv systému, důležité je zajištění správné teploty a dodržení pracovního protokolu.

3. - Interpretace stripů

Interpretaci stripů lze provést vizuálně pomocí hodnotící tabulky obsažené v soupravě (viz pracovní postupy pro každý přístroj) nebo automaticky pomocí skenerů BLOTRix R2 nebo BLOTRix SI (BioSciTec). OPERON, S.A. na požádání poskytne uživateli pokyny pro automatickou interpretaci proužku se skenery (DO-09053002 / „Návod k použití BLOTRix R2 SI“).

Můžete se také podívat na následující webovou adresu: <http://www.OPERON.es/es/products/protocols>.

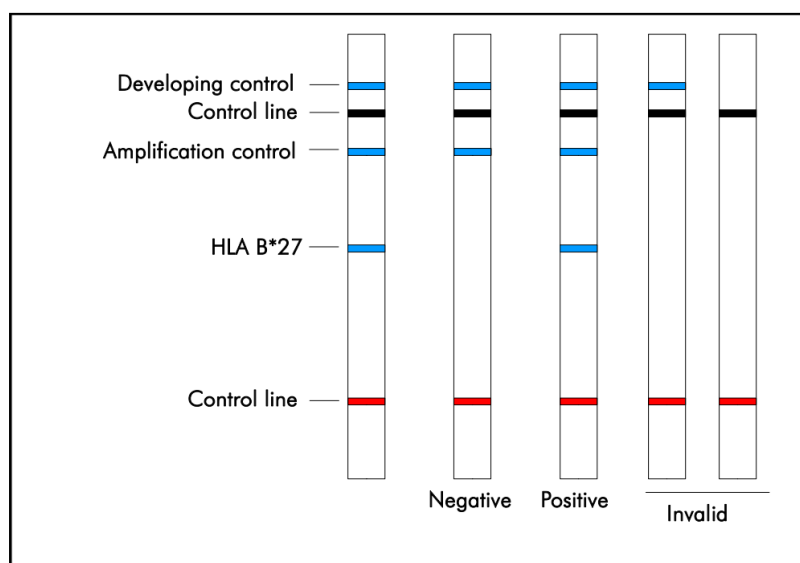
Důležité: výsledky interpretace proužků se skenery musí být vždy vizuálně ověřeny; velmi slabé linie nebyly nástroji detekovány.

VÝSLEDKY:

Na proužku lze zobrazit následující výsledky:

- Negativní pro HLA-B * 27: vzhled linie odpovídající kontrole amplifikace (HCP5) spolu s rozvíjející se kontrolou.
- Pozitivní na HLA-B * 27: vzhled linií odpovídajících kontrole amplifikace (HCP5) a HLA-B * 27, spolu s vyvíjející se kontrolní linií.
- Neplatné: všechny případy, kdy se řádek odpovídající kontrole amplifikace neobjeví (svědčící o problémech během amplifikace PCR), budou považovány za neplatné. Podobně bude test neplatný v těch případech, kdy se neobjeví žádný řádek, včetně vyvíjejícího se ovládacího řádku.

Následující obrázek ukazuje možné výsledky, získané pomocí stripu HLA B27:



KONTROLA KVALITY

Kontrolní linie vývoje stripu by se měla vždy zobrazit nad horní černou čarou. Její absence bude svědčit o problémech, které se vyskytly během fáze hybridizace / vývoje produktu.

Strip odpovídající negativní kontrole amplifikace zobrazí pouze kontrolní linii vývoje stripu. Pokud jde o vzorky DNA, linie odpovídající s interní kontrole amplifikace (HCP5) se musí objevit ve všech vzorcích. Její nepřítomnost bude svědčit o problémech během fáze amplifikace DNA (absence DNA, DNA ve špatném stavu, problémy s PCR).

VLASTNOSTI/ EXTERNÍ A INTERNÍ HODNOCENÍ:

Použití tohoto testu je omezené na školené odborníky, zběhlé v molekulárně biologických metodách.

Souprava byl ověřen a DNA vzorky s genotypem nebo fenotypem určeným jinými metodami a také vzorky od mezinárodní pracovní skupiny pro Histokompatibilitu. Byly získány následující uspokojivé výsledky:

- **Vyhodnocení citlivosti a specifity se vzorky z Mezinárodní pracovní skupiny pro histopatibilitu (IHWG).**

Citlivost / specifita proužku HLA B27 byla hodnocena analýzou celkem 58 vzorků IHWG, kde byl genotyp určen sekvenováním nebo SSP. Bylo dosaženo shody citlivosti a specifity 100%.

• **Hodnocení citlivosti a specifity se vzorky typizovanými průtokovou cytometrií.**

Hodnocení zahrnovalo celkem 99 vzorků krve charakterizovaných průtokovou cytometrií a testem GenoQuick HLA-B * 27 (neprůkazné vzorky cytometrie). Bylo dosaženo shody citlivosti a specifity 100%.

• **Hodnocení citlivosti a specifity se vzorky typizovanými průtokovou cytometrií v laboratořích CatLab (Terrassa).**

Externí hodnocení zahrnovalo celkem 100 vzorků krve, charakterizovaných průtokovou cytometrií a pomocí PCR v reálném čase pomocí soupravy Fluorotype HLA B27 od Hain Lifesciences (neprůkazné vzorky cytometrie). Bylo dosaženo shody citlivosti a specifity 100%.

MOŽNÉ PROBLÉMY

1. Na stripu se neobjeví žádný proužek, ani kontrolní

- Konjugát nebo substrát nebyl vytemperován na správnou teplotu
- Nebyl přidán konjugát nebo substrát nebo byl v příliš nízké koncentraci

2. Objeví se pouze kontrolní proužek

- PCR amplifikace neproběhla správně (ověřte na agarózovém gelu)
- Nebyl přidán vzorek nebo byl v příliš nízké koncentraci pro hybridizaci
- Nesprávná hybridizace nebo teplota promývacího pufru 1 (vyšší než v návodu)
- Nesprávná teplota inkubace (vyšší než v návodu)

3. Na stripu je silné barevné pozadí

- Promývací krok nebyl proveden efektivně (špatné načasování, malý objem promývacího pufru, studený pufr)

4. Nehomogenní zbarvení stripu

- Neadekvátní třepání (zkontrolujte program thermoshakeru – třepačky)
- Stripy nebyly dobře ponořeny během inkubace

5. Neočekávané výsledky

- Neadekvátní inkubace nebo teplota reagensů
- Kontaminace PCR (ověřte pomocí negativní kontroly)
- Kontaminace žlábků během přenášení reagensů během přidávání hybridizačního pufru

Test byl proveden a ověřen změnou teploty kroků hybridizace / vývoje na teplotu mezi 39 a 45 ° C. Bylo zjištěno, že test funguje správně mezi 39 a 45 ° C. Přesto je optimální teplota pro provedení testu 42 ° C a doporučuje se tuto pracovní teplotu dodržovat a přísně kontrolovat.

SENZITIVITA a SPECIFICITA

Citlivost soupravy HLA B27 Strip byla hodnocena pomocí několika šarží produktu. Minimální množství DNA na PCR, které lze správně genotypovat, je 1 ng (linie s dobrou intenzitou). Nižší množství DNA způsobuje slabé pruhy, v některých případech obtížně viditelné.

Teoretická citlivost a specifita soupravy byla vypočtena s přihlédnutím ke všem alelám HLA-B popsaným Mezinárodní pracovní skupinou pro histopatibilitu (108 alel B * 27 a 2332 alel jiných než B * 27. Srpen 2012).

Teoretická citlivost (alely HLA B * 27 teoreticky zjištěné oproti celkovým alelám HLA B * 27): 97,2%

Teoretická specifita (alely HLA B * 27 teoreticky detekované oproti celkovým alelám HLA B): 99,7%

Alela	Total	Alela	Total	Alela	Total
B07	195	B41	24	B54	27
B08	105	B42	17	B55	68
B13	70	B44	197	B56	40
B14	39	B45	14	B57	71
B15	296	B46	39	B58	46
B18	87	B47	10	B59	6
B27	108	B48	31	B67	4
B35	264	B49	22	B73	2
B37	41	B50	17	B78	9
B38	48	B51	125	B81	5
B39	91	B52	42	B82	3
B40	241	B53	35	B83	1

HOOKŮV EFFECT

Byl posuzován vliv vysoké koncentrace DNA (až 1000 ng) na výsledky HLA B27Strip souprav. Nebyl zjištěn inhibiční vliv PCR ani se nezměnila intenzita zbarvení.

Nebyl pozorován Hookův efekt

INTRA-ASSAY PRECISION SPOLEHLIVOST MEZI SÉRIEMI

Přesnost intra-assay soupravy HLA B27 byla studována pomocí pěti replik 16 vzorků DNA a tří různých šarží produktu. Analýza byla provedena jednou osobou a výsledky replik byly ve všech případech identické, což dokazuje vysokou přesnost produktu v rámci testu.

INTER-DAY PRECISION SPOLEHLIVOST MEZI DNY

15 vzorků DNA bylo analyzováno duplikátně jednou šarží produktu HLA B27 Strip po dobu 5 po sobě jdoucích dnů. Analýzu provedla jedna osoba a výsledky získané pro každou DNA byly ve všech případech identické, což dokazuje vysokou přesnost produktu během dne.

INTER-LABORATORY PRECISION SPOLEHLIVOST NA PROVEDENÍ











Tři lidé analyzovali 15 vzorků DNA s jednou šarží HLA B27 Strip. Analýza byla provedena ve stejný den a získané výsledky byly identické, což dokazuje vysokou intralaboratorní přesnost produktu.

INTER-LOT PRECISION SPOLEHLIVOST VÝSLEDKŮ U RŮZNÝCH ŠARŽÍ

16 vzorků DNA bylo analyzováno trojmo se třemi šaržemi produktu HLA B27 Strip. Analýza byla provedena stejnou osobou ve stejný den, přičemž byly získány shodné výsledky se všemi třemi šaržemi, což prokazuje vysokou přesnost mezi šaržemi.


LITERATURA:

1. Van der Berg R. "How should we diagnose spondyloarthritis according to the ASAS classification criteria". *Polskie Archiwum Medycyny Wewnethznej* (2010). 120 (11): 452-457.
2. Brown M.A. "HLA Class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom". *Annals of the rheumatic disease* (1996). 55: 268-270.
3. Monnet D. et al. "Ophthalmic findings and frequency of extraocular manifestations in patients with HLA-B27 uveitis: a study of 175 cases. *Ophthalmology* (2004). 111 (4): 802-809.
4. Di Lorenzo A.L. "HLA B27 Syndromes". *MedScape*. emedicine.medscape.com/article/1201027-overview.

	Expirace
	Šarže
	Pro <i>in vitro</i> diagnostiku
	Tento výrobek splňuje požadavky direktivy 98/79/EC pro In vitro diagnostické zdravotnické prostředky
	Katalogové číslo
	Čtěte prosím příbalový leták
	Výrobce
	Určeno pro <n> vyšetření
	Skladujte při
	Žíravina



DO-09051018 Rev.06 – 25.10.2018

 OPERON S.A.- Camino del Plano, 19- E-50410 Cuarte de Huerva- (Zaragoza) – SPAIN

Distribuce a zastoupení v ČR:

ASCO-MED, spol. s.r.o.

Pod Cihelnou 23/532,

161 00 Praha 6

tel: (+420) 2 333135 78, 79, 80

www.ascomed.cz

asco@ascomed.cz

Mgr. Irena ŠEJBOVÁ

tel: 602 653 640

e-mail: irena.sejbova@ascomed.cz