



1. Verwendungszweck

Art.-Nr.: KT0003

Der MutaGEL[®] HLA B27 - Testkit ist für die Untersuchung humaner DNA-Proben bezüglich der Anwesenheit von HLA B27 - Allelen bestimmt. *Nur für Forschungszwecke.*

2. Einleitung

Patienten mit ankylosierender Spondylitis (Morbus Bechterew = **M. B.**) haben in > 90% der Fälle Zelloberflächenmoleküle der HLA B27- Gruppe (hingegen ist die normale Verteilung von HLA B27 in der kaukasischen Bevölkerung lediglich ca. 10%). Die Abwesenheit von HLA B27- Allelen in einer Person verringert daher die Wahrscheinlichkeit einer M. B.- Erkrankung deutlich. Entsprechend wird bei internistischen Fragestellungen durch den Nachweis bzw. Ausschluss von HLA B27- Allelen die Diagnose von Spondylarthropathien (insbesondere bei jungen Menschen) vereinfacht/ unterstützt. Eine zusätzliche Unterscheidung zwischen bestimmten „M. B. - krankheitsgekoppelten“ und auch „M. B. - protektiven“ B27-Typen konnte mittlerweile durch moderne molekularmedizinische Forschung herausgearbeitet werden (aktuell sind 45 humane B27- Allele bekannt, welche sich alle durch einen einzigen Aminosäureaustausch in ihrer jeweiligen Proteinsequenz unterscheiden – ein „Update“ für MutaGEL[®] HLA B27 wird regelmäßig durchgeführt. Epidemiologisch relevant sind aber lediglich die Allele *2701 - *2710; alle anderen HLA B27- Typen sind bislang nur in Einzelfällen beschrieben worden.

Die Typen *2701, -02, -04, -05, -07, -08 und -10 sind mit der chronisch-entzündlichen rheumatischen Erkrankung M. B. **assoziiert** und Populationsstudien hinsichtlich ihrer Verteilung sind allgemein verfügbar. Vor allem das **HLA B *2705** und **HLA B *2702** sind mit ca. 90 % bzw. 10 % hauptsächlich für die Entstehung des M. B.-Syndroms verantwortlich.

Hingegen sind die Typen *2706, -09, -12 und -18 **nicht** mit M. B. **assoziiert**, d.h. sie schließen M. B. aus!

Die beschriebene Variabilität der HLA B27- Allele charakterisiert den Rahmen der diagnostischen Fragestellung und es sollte stets bedacht werden, dass die Möglichkeit des Auffindens weiterer neuer HLA B27- Sequenzen besteht.

3. Testprinzip

Der Kit MutaGEL[®] HLA B27 enthält Reagentien für folgende zwei Typen der HLA B27- spezifischen DNA-Amplifikation: **Test A** ist ein rein „**orientierender**“ Ansatz, welcher **alle** bekannten Sequenzen der HLA B27- Gruppe (= Typen *2701 bis *2745) in humanen DNA-Proben erfasst. Hingegen ergibt **Test B** zwar ebenfalls mit **fast allen** bekannten M. B.- assoziierten B27- Typen ein positives Ergebnis (speziell die Allele *2705 und *2702, welche zusammen nahezu 100 % der mitteleuropäischen B27- Träger ausmachen sowie das Allel *2704 von M. B.- Fällen in Asien), darüberhinaus **schließt** er aber die Amplifikation der „**protektiven**“ HLA B27- Allele *2706 und *2709 definitiv **aus**.

Daher dient **Test A** dem allgemeinen HLA B27- Allelnachweis und **Test B** einer Analyse „M. B.- krankheitsgekoppelter“ HLA B27- Allele (dabei werden alle in **Test B** detektierbaren Allele auch im **Test A** amplifiziert und der direkte Vergleich erlaubt den Rückschluss auf protektive Allele.

4. Inhalt der Testpackung (für 24 Bestimmungen)

▪ PCR- Mix 1 HLA B27	1 x	550 µl (grün)	Test A: ready-to-use Mix für HLA B27- spezifische Amplifikation (hotstart PCR) „ weit “
▪ PCR- Mix 2 anky. Spond. (M.B.)	1 x	550 µl (violett)	Test B: ready-to-use Mix für die M. B.- assoziierte Amplifikation (hotstart PCR) „ eng “
▪ HLA B27- Positiv Kontroll DNA	1 x	30 µl (rot)	Lösung HLA B27- positiver humaner DNA (positiv in Test A und B)
▪ PCR Wasser	1 x	50 µl (weiß)	deionisiertes Wasser

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagenzien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- Reagenzien für die Gelelektrophorese
- Thermocycler
- Variable Pipetten (0,5 -200 µl) und sterile Filtertips
- sterile Reagenzgefäße (für Master-Mix- Ansatz bei größerer Probenzahl)
- Geräte für die Gelelektrophorese

6. Stabilität und Aufbewahrung der Reagenzien

Die Lagerung sollte bei ≤ -20°C erfolgen. **Nicht** für längere Zeit im Kühlschrank bei 4° -8°C aufbewahren (Raumtemperatur für 1Tag ist hingegen nicht kritisch). In den ungeöffneten Gefäßen sind alle Reagenzien mindestens bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil. *Vor Gebrauch:* Die Gefäße vor dem Öffnen kurz zentrifugieren, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln.

7. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke.
- Test nur durch geschultes Personal nach GLP (Good Laboratory Practice)- Richtlinien durchführen lassen.
- Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle in der Testpackung enthaltenen Reagenzien/ Reaktionsgefäße können nach ihrer Verwendung im Restmüll entsorgt werden.
- Die PCR-Technologie ist extrem sensitiv. Die Amplifikation eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Daher in drei räumlich voneinander abgetrennten Bereichen für a) Probenaufbereitung, b) PCR-Reagenz-Vorbereitung und c) DNA-Detektion arbeiten.
- Sterile Spitzen mit Filter und von für PCR-Zwecke geeigneten Pipetten verwenden (für jeden Bereich extra Pipettensatz reservieren).
- Für jeden separaten Arbeitsplatz neue Handschuhe und Kittel benutzen.
- Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden.
- Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden.



Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in drei Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung (DNA-Extraktion).
2. Amplifikation mit den beiden spezifischen Primer-Sets für die HLA B *27- Allele bzw. die M. B.- assoziierten HLA-B*27- Allele.
3. Analyse des Genotyps durch gelelektrophoretische Auftrennung der entstandenen DNA-Amplifikate.

8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA (aus z.B. 200 µl Vollblut) extrahieren, indem kommerzielle DNA-Extraktionskits entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers eingesetzt werden.
- Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die DNA bei ≤ -20°C aufbewahrt werden.

9. Amplifikation

- Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ-Kontrolle beinhalten.
- Für jede einzelne Probe, die Positiv-Kontrolle und die Negativ-Kontrolle sollte folgender Master-Mix hergestellt werden (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und weitere 10 % Volumen addieren).

PCR- Reagenzien	Reaktions- Volumen: 25 µl	Master-Mix- Volumen
PCR-Mastermix	20 µl	20 µl x (N + 10 %)
<ul style="list-style-type: none"> je 20 µl des hergestellten Master-Mix in PCR-Reaktionsgefäße vorlegen. Proben: jeweils 5 µl der extrahierten gDNA (ca. 20 ng/ µl) in die korrespondierenden PCR-Gefäße zupipettieren. Positiv-Kontrolle: 5 µl der HLA B27 Positiv-Kontroll-DNA zum Master-Mix in die PCR-Gefäße der positiven Referenzen dazu pipettieren. Negativ-Kontrolle: 5 µl PCR-Wasser zum Master-Mix im PCR-Gefäß der negativen Referenz dazu pipettieren. Die Gefäße in den Thermocycler einstellen. Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen: 		
Anfangsphase:	95°C für 15 min	
35 Zyklen:	95°C für 30 sec / 63°C für 30 sec / 72°C für 1 min	
Strangverlängerung:	74°C für 10 min	
Endphase:	20°C	

10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2 %** Agarose (oder 10 % Polyacrylamid) für ca. **100 Vh** (z.B. 70 min bei 90 volt) in 1x TBE-Puffer durchführen: ca. **15 µl** Amplifikat jedes PCR-Ansatzes mit ca. **4 µl** Ladepuffer (z.B. KAN01070) versetzen und auf das Gel laden. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard (z.B. KDBR311005) abgeglichen werden. Die im Gel getrennte DNA wird im Ethidiumbromid- bzw. SybrGreen- Bad (5 µg/ ml) für ca. 5-10 min angefärbt und unter UV-Licht (312 nm) visualisiert und das erhaltenen DNA-Bandenmuster (Foto)-dokumentiert.
- Die PCR liefert für die Positivkontrolle (bzw. bei Vorhandensein entsprechender HLA B27- Allele in den Proben) für **Test A** ein DNA-Fragment von **100 bp** und für **Test B** ein DNA-Fragment von **105 bp**. Zusätzlich wird bei beiden Tests jeweils eine interne Kontrollbande von ca. **400 bp** amplifiziert (welche bei vorhandenen HLA B27- Allelen jedoch auch schwächer ausgeprägt sein kann).
- In der Negativkontrolle darf auf keinen Fall ein Amplifikat nachgewiesen werden.
- Bei positiven Proben können folgende Fälle auftreten:
 - Fall 1: **Test A** und **Test B** sind **beide positiv** (d. h. beide zeigen B27- Amplifikate). Befund: die Probe enthält ein oder zwei HLA B27- Allele, welche mit Morbus Bechterew (ankylosierender Spondylitis) assoziiert sind.
 - Fall 2: **Test A** ist **positiv** und **Test B** ist **negativ**. Befund: die Probe enthält ein oder zwei der protektiven HLA B27-Allele, welche nicht mit Morbus Bechterew (ankylosierender Spondylitis) assoziiert sind (also *2706 bzw. *2709).
 - (Fall 3: **Test A = negativ** und **Test B = positiv** ist vom Testprinzip her technisch nicht möglich.)

11. Einschränkungen

In sehr seltenen Fällen (jeweils ca. 1% der Bevölkerung von Iran, Mongolei bzw. Oman) kann die PCR in Test A zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Dieses Phänomen wird aber generell durch die PCR in Test B (für die krankheitsassoziierten B27- Typen) korrigiert, welche keine Kreuzreaktivität zu diesen Nicht-HLA B27- Allelen dieser Bevölkerungsgruppen besitzt.

Auch die PCR in Test B (Nachweis krankheitsassoziierten B27- Allele) kann in ganz seltenen Ausnahmefällen zu falsch-positiven Ergebnissen führen, da die bislang nur in Einzelfällen beschriebenen Allele *2712 und *2718 erkannt werden können, obwohl sie M. B.- protektive Eigenschaften (in daher gesunden Personen) besitzen sollen. Dies ist andererseits unwahrscheinlich, da die Test B- PCR auf dem Nachweis der anscheinend krankheitsassoziierten Aminosäure 116Asp beruht und dann die auftretende „Protektivität“ eher das Resultat der begrenzten Krankheits-Penetranz M. B.- assoziierter HLA B27- Allele ist.

Auch wird das Allel *2707 vom Test B nicht erkannt, da dieses an Position 116 als Aminosäure ein Tyrosin besitzt. Allel *2707 existiert jedoch nur in wenigen Bevölkerungsgruppen und ist in mitteleuropäischen Patienten nicht zu finden. Generell sollte bei Diskrepanzen zwischen klinischer Diagnose und dem Testergebnis eine **Sequenzierung** durchgeführt werden. Diese kann über **Immundiagnostik** eingeleitet werden.

Die allelspezifische PCR liefert für die Positivkontroll-DNA die angegebenen DNA-Fragmente (HLA B27- spezifisch plus interne Kontrolle). Falls dies nicht der Fall ist, erfolgte keine korrekte DNA-Amplifikation und die gewählten PCR-Bedingungen müssen überprüft und korrigiert werden. In diesem Fall muss die Proben-DNA erneut getestet bzw. die Untersuchung mit neu isolierter DNA wiederholt werden.