



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 35 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, -03, -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, -11 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 *2735) 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 die Allele *2703 und *2704 von M. B.- Fällen aus Afrika und 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: Reagentien für die HLA B27- spezif. Amplifikation (hotstart PCR); „weit“
▪ PCR- Mix 2 anky. Spond. (M.B.)	1 x	550 µl (violett)	Test B: Reagentien für die M. B.- assoziierte Amplifikation (hotstart PCR); „eng“
▪ HLA B27- Positiv Kontroll DNA	1 x	30 µl (rot)	wässrige Lösung HLA B27- positiver humaner DNA (positiv in Test A und B)
▪ PCR Wasser	1 x	200 µl (weiß)	deionisiertes Wasser

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Reagentien und Instrumente:

- DNA-Extraktionskit (z.B. BLOOD MINIPREP: KBR3005)
- Reagentien für die Gelelektrophorese
- Thermocycler
- Variable Pipetten (0,1 -200 µl) und sterile Filtertips
- sterile Reagenzgefäße (für Master-Mix- Ansatz bei größerer Probenzahl)
- Geräte für die Gelelektrophorese

6. Stabilität und Aufbewahrung der Reagentien

Die Lagerung sollte bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ erfolgen. In den ungeöffneten Gefäßen sind alle Reagentien mindestens bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil. Die Reagentien nicht mehrmals auftauen und daher bei Bedarf aliquotieren.

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 Reagentien/ 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 %)

- je **20 µl** des hergestellten Master-Mix in PCR-Reaktionsgefäße vorlegen.
- Proben: jeweils **5 µl** der extrahierten **gDNA** (ca. 30 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 zupipettieren.
- Negativ-Kontrolle: **5 µl PCR-Wasser** zum Master-Mix im PCR-Gefäß der negativen Referenz zupipettieren.
- Die Gefäße in den Thermocycler einstellen.
- Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:

Anfangsphase:	95°C für 10 min
35 Zyklen:	95°C für 30 sec / 58°C für 30 sec / 72°C für 1 min
Strangverlängerung:	74°C für 10 min
Endphase:	10°C

10. Untersuchung des Genotyps und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **2 %** Agarose (oder 10 % Polyacrylamid) für ca. **120 Vh** (z.B. 80 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 (312nm) 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 krankheitsassoziiertes 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.



1. Intended Use	Code: KT0003
The test kit MutaGEL ϕ HLA B27 allows for the analysis of DNA in respect to detection of the HLA B27- alleles present in a human probe. <i>For research use only.</i>	

2. Introduction
<p>Patients with ankylosing spondylitis (Morbus Bechterew = M. B.) have cell surface molecules of the HLA- B27 group in 90 % of the cases, whereas the normal abundance is only up to 10 % positives. Absence of a B27- allele in a person can therefore diminish the probability of a M.B. diagnosis in the interistically demanding diagnosis of spondylarthropathies (especially in young people). Additionally segregation between certain "disease coupled" B27- types has been worked out by the modern molecular medical research (actually there are 35 human B27- alleles known differing in amino acid changes in their protein sequence – an "update" for MutaGELϕ HLA B27 is done periodical). Epidemiological relevant are only the alleles *2701 - *2710; all other HLA B27- types are described till now only in single cases.</p> <p>That means, only some of the B27- allele types are abundant: Types *2701, -02, -03, -04, -05, -07, -08 and -10 are associated with the chronic inflammatory rheumatic disease M. B. and population studies for them are already available. The types *2706, -09, -11 and -18 are not associated with M. B., most of the others having been reported only once. This variability characterizes the frame of the diagnostic demand and the possibility of occurrence of further new sequence findings must always be kept in mind.</p>

3. Principle of the Test
<p>The PCR kit Mutagelϕ HLA-B27 contains reagents for two types of DNA amplification: Test A is a "surveying" approach, which can detect all known sequences of the HLA B27 group contained in a human probe (= types *2701 - *2735). On the other hand Test B gives positive results with nearly all known M. B. associated B27- types (especially again alleles *2705 and *2702, who together asymptotically add to 100 % in Middle European B27 carriers and M.B. patients as well as alleles *2703 and *2704 from M.B. cases of Africa and Asia). Furthermore, in Test B the presumably protective *2706 and famous *2709 are excluded from its amplification.</p> <p>Therefore Test A should be done for the general HLA B27 search and Test B for the analysis of existence of HLA B27 disease associated alleles (of course the alleles seen by Test B are all detected by Test A also and the direct comparison allows conclusion for protective alleles).</p>

4. Material Supplied (24 determinations)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR-Mix 1 HLA-B27 1 x 550 μl (green) reagents for HLA-B27 specific amplifications (hotstart PCR); "wide" ▪ PCR-Mix 2 ankylosing spondylitis (M.B.) 1 x 550 μl (lilac) reagents for M.Bechterew associated amplifications (hotstart PCR); "close" ▪ HLA B27 Positive Control DNA 1 x 30 μl (red) solution with DNA amplicons from Test A and Test B positive PCRs ▪ PCR water 1 x 200 μl (white) deionized water (molecular biological grade)

5. Materials Required but not Supplied
<p>Reagents and Instruments:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA extraction kit (f. e. "BLOOD MINIPREP" kit; Code: KBR3005) ▪ Reagents for gel electrophoresis ▪ Thermal cycler ▪ Pipettes (0.5 - 200 μl) and sterile pipette tips ▪ Sterile micro tube (for master mix preparation) ▪ Instruments for gel electrophoresis

6. Storage and Stability
<p>Store at < -18°C. The reagents are stable in the unopened micro tubes until the expiration date indicated (see print on the package). Do not thaw out the content of the "HLA B27 Positive Control DNA" for more than two times. If necessary, make suitable aliquots.</p> <p><i>Before use:</i> Spin tubes briefly before opening (contents may become dispersed during shipment).</p>

7. Warning and Precautions
<ul style="list-style-type: none"> ▪ For research use only. ▪ PCR tests should be performed only by skilled persons considering GLP (Good Laboratory Practice) guidelines. ▪ Don't use the kit after its expiration date. ▪ After usage, dispose all reagents and test components included in the kit in conventional garbage. ▪ PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates million identical copies. Therefore set up three separate working areas for a) sample preparation, b) PCR reagent preparation and c) DNA detection. For each working area a different set of pipettes should be reserved. ▪ Wear separate coats and gloves in each working area. ▪ Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting. ▪ Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches. ▪ Avoid aerosols.



Procedure

The complete procedure is divided in three steps:

1. Sample preparation.
2. Amplification with two primer sets specific for the HLA B27- alleles and for Morbus Bechterew associated HLA B27- alleles (Tests A and B).
3. Analysis of genotype by gelelectrophoretic separation of the amplified DNA-products.

8. Sample Preparation

- For template use total genomic DNA which can be extracted (f. e. from 200 μ l whole blood) using a commercial available DNA isolation kit according to the manufacturers instruction.
- Start immediately with the amplification procedure or store the extracted DNA at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

9. Amplification

- Every set of amplifications should include a positive as well as a negative control.
- For each sample, positive control and negative control, prepare the following Master Mix (multiply the volumes necessary for each reaction with the number N of reactions and add 10 % more volume):

PCR -reagents	Reaction Volume: 25 μ l	Master Mix - Volume
PCR master mix	20 μ l	20 μ l x (N + 10%)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Add 20 μl of the prepared master mix to the necessary PCR tubes. ▪ Samples: add 5 μl each of the extracted gDNA (about 20 ng/μl) to the corresponding PCR tube. ▪ Positive control: add 5 μl of HLA B27 positive control DNA to the Master Mix of the positive reference PCR tube. ▪ Negative control: add 5 μl of PCR water to the Master Mix of the negative reference PCR tube. ▪ transfer the micro tubes into the thermal cycler. ▪ perform the following amplification protocol: 		
Initial hold:	95°C for 10 min	
35 cycles:	95°C for 30 sec / 58°C for 30 sec / 72°C for 1 min	
Strand completion:	74°C for 10 min	
Final hold:	10°C	

10. Detection of the amplified DNA and Interpretation of the Results

- Carry out gel electrophoresis in 2% agarose (or 10 % polyacrylamid) for about 120 Vh (f.e. 80 min at 90 volts) in 1x TBE-buffer: Mix about 15 μ l of each amplified material with 4 μ l loading buffer (f.e. KAN01070) and load the sample to the gel. The length of the detected DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (f. e. KBR311005). The separated DNA is coloured by ethidium bromide or SybrGreen (5 μ g/ml) for 5 - 10 min and visualised under UV-light (312 nm).
- The PCR results for positive samples (and positive control) in an allele-specific DNA-fragment of 100 bp length in Test A and of 105 bp in Test B as well as an internal control fragment of about 400 bp each. (*Please consider:* if HLA B*27 alleles are present, the internal control can be weaker).
- In any case the negative controls must be negative for any amplification product.
- Case 1: Test A and Test B are both positive: the probe contains one or two B27- alleles associated with occurrence of Morbus Bechterew (ankylosing spondylitis).
- Case 2: Test A is positive and Test B is negative: the probe contains one or two B27- alleles not associated with Morbus Bechterew (ankylosing spondylitis) consequently *2706 or *2709 (or a rare new sequence variant, which should be sequence when the clinical diagnosis of ankylosing spondylitis is obvious).
- (Case 3: Test A negative and Test B positive: not possible, technical failure.)

11. Restrictions

In very rare cases (1 % of populations from Iran, Mongolia, people from Oman) the Test A - PCR can produce false positives. This phenomenon is in general corrected for disease associated B27 types by Test B, which is not sensitive for the crossreactivity of this non HLA-B27 group. For such cases DNA sequence analysis is useful, which is available from the distributor.

Also Test B can produce false positives, because alleles of single case isolates like *2712 and *2718 reported from sane persons could prove protective in the future. This is on the other hand unlikely, because the Test B-PCR bases on detection of the disease associated amino acid 116 Asp and then the "protectivity" is more likely to be a result of B27s restricted disease penetrance.

The single surely disease associated type, which can not be detected by test B is HLA-B*2707 due to its amino acid tyrosine at position 116. This allele exists only in some populations of the world and is very rare in Middle European patients. If in general a discrepancy between the clinical diagnosis and the test results would occur, the person responsible is encouraged to ask Immundiagnostik AG for a sequence analysis.

If there are no positive control DNA fragments present, the chosen PCR conditions have to be corrected. The sample must be tested a second time or the complete analysis must be repeated with freshly isolated DNA.