

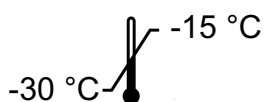
# HLA-B27 RealFast<sup>™</sup> Assay

Gebrauchsanweisung

**REF**



7-620	100 Reaktionen
7-623	32 Reaktionen
7-620-TRIAL	20 Reaktionen



**IVD**



Version: Rev 1.0 / Deutsch  
eIFU und weitere Sprachen verfügbar auf  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

**CE** 0123



**ViennaLab Diagnostics GmbH**

Gaudenzdorfer Guertel 43-45, A-1120 Vienna, Austria

t: +43 1 8120156-0

e: [info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

w: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

**INHALTSVERZEICHNIS**

I. ZWECKBESTIMMUNG ..... 3

II. HINTERGRUND ..... 3

III. METHODEN ..... 3

IV. KIT-BESTANDTEILE ..... 5

V. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN ..... 5

VI. DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS ..... 6

VII. DATENANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE ..... 8

VIII. LEISTUNGSBEWERTUNG ..... 10

IX. STÖRSUBSTANZEN ..... 11

X. GRENZEN DES ASSAYS ..... 11

XI. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN ..... 11

XII. SICHERHEIT ..... 12

XIII. TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG ..... 12

XIV. REFERENZEN ..... 12

XV. RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER ..... 12

XVI. SYMBOLE ..... 13

XVII. BEISPIELE DER TESTERGEBNISSE ..... 14

XVIII. VERWANDTE PRODUKTE ..... 16

**REVISIONSVERLAUF:**

Version	Datum	Beschreibung
Rev. 1.0	2022-11	Erstversion

---

---

---

Ein Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (SSP, Summary of Safety and Performance) des RealFast™ Assays kann von der europäischen Datenbank für Medizinprodukte (EUDAMED): <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> abgerufen oder beim Hersteller angefordert werden.

## I. ZWECKBESTIMMUNG

Der HLA-B27 RealFast™ Assay ist ein nicht automatisierter Real-Time PCR-Test für die Detektion von *HLA-B\*27*-Allelen, spezifischen Genvarianten des *humanen Leukozytenantigens B* (*HLA-B*, *human leukocyte antigen B*). *HLA-B\*27*-Allele sind stark mit seronegativen Spondyloarthropathien assoziiert. Der Assay ist ein diagnostisches Hilfsmittel, um einen Verdacht auf ankylosierende Spondylitis, reaktive Arthritis, juvenile idiopathische Arthritis oder anteriore Uveitis zu bestätigen. Der qualitative Assay unterscheidet das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von *HLA-B\*27*-Allelen in genomischer, aus humanem Blut extrahierter DNA und detektiert die Mehrzahl der krankheitsrelevanten *HLA-B\*27*-Subtypen.

Für die *In-vitro*-Diagnostik in der Humanmedizin.

## II. HINTERGRUND

HLA-B-Moleküle sind Zelloberflächenproteine, die eine wichtige Rolle bei der Immunität spielen. Die Häufigkeit der *HLA-B\*27*-Variante beträgt etwa 8 % in der allgemeinen kaukasischen Population, während sie bei über 90 % der Patienten zu finden ist, die unter ankylosierender Spondylitis (AS, ankylosing spondylitis) leiden. Die Krankheit, die überwiegend Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren betrifft, ist durch eine Entzündung des Iliosakralgelenks und fortschreitende Steifigkeit der Wirbelsäule gekennzeichnet. Aufgrund der hohen Korrelation mit der Krankheit ist eine *HLA-B\*27*-Genotypisierung für die Differenzialdiagnose von AS geeignet. Andere Untergruppen von Spondyloarthritiden sind ebenfalls mit *HLA-B\*27* assoziiert, wenn auch in geringerem Maß.

## III. METHODEN

Der HLA-B27 RealFast™ Assay basiert auf dem fluorogenen 5' Nuklease-Assay, auch TaqMan® Assay genannt. Jede Reaktion enthält genspezifische Primer, die ein 202-bp-Fragment des *HLA-B*-Gens amplifizieren. Weitere Komponenten sind doppelt markierte, genspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz des entsprechenden Fragments hybridisieren. Die Nähe des 5'-Fluoreszenz-Reporters und des 3'-Quencherfarbstoffs auf intakten Sonden verhindert ein Fluoreszieren des Reporters. Während der Extensionsphase der Polymerase Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) spaltet die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase den 5'-Fluoreszenz-Reporter von der hybridisierten Probe ab. Die physikalische Trennung des Fluorophors vom Quencherfarbstoff erzeugt ein Fluoreszenz-Signal in Echtzeit, das proportional zum akkumulierten PCR-Produkt ist. In *HLA-B\*27*-positiven Proben binden die **FAM-markierte *HLA-B\*27***-Sonde sowie die **HEX-markierte PCR-Kontroll**-Sonde an das PCR-Fragment. Ein starkes Fluoreszenz-Signal wird im FAM-Kanal (520 nm) und im HEX-Kanal (556 nm) detektiert. In *HLA-B\*27*-negativen Proben hybridisiert nur die HEX-markierte PCR-Kontrollsonde am Komplementärstrang des Genfragments. Ein starkes Fluoreszenz-Signal wird im HEX-Kanal detektiert und kein oder nur ein basales Signal im FAM-Kanal.

Der HLA-B27 RealFast™ Assay ist so ausgelegt, dass die meisten bekannten *HLA-B\*27*-Allele und Subtypen (Tabelle 1) detektiert werden können.

**Tabelle 1: Vom HLA-B27 RealFast™ Assay detektierte *HLA-B\*27*-Allele**

<i>HLA-B*27</i> -Allele	vermutlich verhinderte oder reduzierte Detektion
<i>B*27:01</i> bis <i>B*27:05:57</i>	<i>B*27:05:09</i> , <i>B*27:05:23</i> , <i>B*27:05:51</i>
<i>B*27:06</i>	
<i>B*27:07:01</i> bis <i>B*27:08</i>	<i>B*27:07:06</i>
<i>B*27:09</i>	
<i>B*27:10</i> bis <i>B*27:15</i>	<i>B*27:12:01:01</i> bis <i>B*27:12:01:03</i>
<i>B*27:16</i>	<i>B*27:16</i>
<i>B*27:17</i> bis <i>B*27:19</i>	<i>B*27:18</i>
<i>B*27:20</i> bis <i>B*27:21</i>	
<i>B*27:23</i> bis <i>B*27:25</i>	<i>B*27:23</i>
<i>B*27:26</i> bis <i>B*27:27</i>	<i>B*27:26</i>
<i>B*27:28</i>	
<i>B*27:29</i> bis <i>B*27:48</i>	<i>B*27:29</i> , <i>B*27:31</i>
<i>B*27:49</i>	
<i>B*27:50:01</i> bis <i>B*27:256</i>	<i>B*27:59N</i> , <i>B*27:77</i> , <i>B*27:85</i> , <i>B*27:91</i> , <i>B*27:92</i> , <i>B*27:101</i> , <i>B*27:109</i> , <i>B*27:119</i> , <i>B*27:129</i> , <i>B*27:140</i> , <i>B*27:153</i> , <i>B*27:157</i> , <i>B*27:204</i> , <i>B*27:239</i> , <i>B*27:242</i> , <i>B*27:246N</i>





Referenzsequenz (RefSeq, Reference Sequence):

NG\_023187.1 (*HLA-B*)

**Hinweis:** Der HLA-B27 RealFast™ Assay detektiert die *HLA-B*-Allele *B\*27:03*, *B\*27:05:12*, *B\*27:06:02*, *B\*27:07:03*, *B\*27:17*, *B\*27:65N*, *B\*27:94N*, *B\*27:111*, *B\*27:139*, *B\*27:151*, *B\*27:170*, *B\*27:182*, *B\*27:237*, *B\*27:243N* und *B\*27:250*, aber die entsprechende HEX-markierte TaqMan®-Sonde, die an das Kontrollfragment bindet, kann in homozygoten Proben ausfallen.

## IV. KIT-BESTANDTEILE

REF

				7-620	7-623	7-620-TRIAL
1. RealFast™ 2x <b>Genotyping Mix</b>	1 Röhrchen	weißer Verschluss		1000 µl	320 µl	200 µl
2. HLA-B27 <b>Assay Mix</b>	1 Röhrchen	lila Verschluss		550 µl	550 µl	550 µl
3. HLA-B27 <b>Positive Control</b>	1 Röhrchen	grüner Verschluss		75 µl	75 µl	75 µl
4. HLA-B27 <b>Negative Control</b>	1 Röhrchen	roter Verschluss		75 µl	75 µl	75 µl
5. <b>Gebrauchsanweisung</b>				1	1	1

Der Kit enthält Reagenzien für 100/32 Reaktionen in einem Endvolumen von jeweils 20 µl. Der RealFast™ 2x Genotyping Mix umfasst Hot-start Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der HLA-B27 Assay Mix besteht aus genspezifischen Primern und doppelt markierten Hydrolysesonden für *HLA-B\*27* und ein Kontrollgen. Eine positive und eine negative Kontrolle für *HLA-B\*27* sind im Lieferumfang des Kits enthalten.

**Hinweis:** Der HLA-B27 RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Kit nach Erhalt bei -30 °C bis -15 °C lagern. Alternativ kann der Kit für die kurzzeitige Anwendung innerhalb eines Monats bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der Kit hält bis zu 20 Frost-Tau-Zyklen ohne Verlust der Aktivität aus. Intensive Lichtexposition vermeiden.

## V. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Neben der üblichen molekularbiologischen Laborausstattung ist Folgendes erforderlich:

- Real-Time PCR-Gerät mit FAM- (520 nm) und HEX- (556 nm) Filtern
- mit dem Instrument kompatible Reaktionsgefäße
- puderfreie Einweg-Handschuhe
- Vortex-Mixer
- Minizentrifuge für 2,0-ml-Röhrchen
- Röhrchengestelle
- kalibrierte Mikropipetten (0,5 – 1000 µl)
- sterile Spitzen mit Aerosolbarrierefilter
- hochreines Wasser
- DNA-Extraktionssystem. GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System (REF 2-014, ViennaLab) oder Spin Micro DNA Extraction Kit (REF 2-020, ViennaLab) empfohlen
- Behälter für biologische Gefahrstoffe

## VI. DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS

### 1. Probenvorbereitung

**Probe:** Frisches oder gefrorenes Blut mit EDTA-Antikoagulans verwenden. Blut, das Heparin oder Citrat enthält, wurde nicht getestet. Blut vor der Verwendung nicht länger als 3 Tage bei Umgebungstemperatur oder länger als 1 Woche bei 2 °C bis 8 °C lagern. Blut, das mehr als ein Jahr lang eingefroren oder mehr als drei Frost-Tau-Zyklen ausgesetzt war, darf nicht verwendet werden. Bei Probennahme und -transport die Gebrauchsanweisung des EDTA-Blutentnahmeröhrchens und allgemeine Empfehlungen für die Blutentnahme befolgen.

**DNA-Extraktion:** DNA-Extraktionsreagenzien sind nicht im Lieferumfang des Kits enthalten. Aus peripherem Vollblut isolierte DNA kann verwendet werden. Es muss sichergestellt werden, dass die extrahierte DNA hinsichtlich Konzentration, Reinheit und Integrität für die Amplifikation geeignet ist. Für die präzise Genotypbestimmung sollte DNA in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 10 ng/µl liegen und ein OD<sub>A260/280</sub>-Verhältnis von 1,7 bis 2,0 aufweisen. Höhere DNA-Konzentrationen müssen vor PCR-Einsatz auf den empfohlenen Bereich verdünnt werden.

Extrahierte DNA muss bei 2 °C bis 8 °C (bis zu eine Woche) oder bei -30 °C bis -15 °C (für längere Zeiträume) bis zur Durchführung der Analyse gelagert werden.

### 2. PCR-Kontrollen

- **Stets** eine **No-template control** (NTC) in jedes Experiment einbeziehen, um das Nichtvorhandensein einer möglichen Kontamination zu bestätigen. Es ist ratsam, die NTC doppelt durchzuführen (hochreines Wasser statt DNA verwenden).
- **Stets** die HLA-B27 **Positive Control** als positives Referenzsignal einbeziehen.
- **Stets** die HLA-B27 **Negative Control** als negatives Referenzsignal für die Schwellenwerteinstellung im FAM-Kanal einbeziehen.

**Hinweis:** Die Kontrollen sind potenzielle Quellen für Kreuzkontaminationen. Sie müssen sorgfältig behandelt werden.

### 3. Vorbereitung des HLA-B27 RealFast™ Master Mix

- Alle Lösungen nach dem Auftauen vorsichtig vortexen und kurz zentrifugieren.
- PCR bei Raumtemperatur ansetzen.
- Ausreichend **Master Mix** für alle Ihre Reaktionen (N Proben + positive Kontrolle + negative Kontrolle + NTC) plus mindestens eine zusätzliche Reaktion zum Ausgleichen von Pipettierungenauigkeiten vorbereiten:

Komponente	pro Reaktion	z. B. 24+1 Reaktionen
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B27 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

**Hinweis:** Der Kit wird ohne ROX geliefert. Für die Verwendung mit Real-Time PCR-Geräten, die hohe ROX-Konzentrationen für die Normalisierung von Daten erfordern (z. B. Applied Biosystems®-Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT) ROX mit einer Endkonzentration von 1 µM zum 2-fachen Genotyping Mix zugeben.

- **15 µl Master Mix** in jede Vertiefung pipettieren.
- **5 µl** gereinigte Ausgangs-**DNA** oder **Kontroll**-Template zugeben, um ein endgültiges Reaktionsvolumen von 20 µl zu erreichen. Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, Templates stets in der folgenden Reihenfolge pipettieren: erst NTC, dann Proben, zuletzt Kontrollen. Reaktionsgefäße sofort schließen.

**Hinweis:** Vermeiden Sie die Entstehung von Blasen in dem finalen Reaktionsgemisch und das Berühren der optischen Oberfläche des Verschlusses oder der Versiegelungsfolie ohne Handschuhe. Beides kann die Fluoreszenzmessungen stören. Bei Bedarf kurz zentrifugieren.

#### 4. PCR-Programm

Real-Time PCR-Gerät gemäß den Anweisungen des Herstellers für Quantifizierungsexperimente mit zwei Zielen/Reporterfarbstoffen programmieren. Proben in den Thermocycler geben und das folgende Programm ausführen:

Zyklen	Temp.	Zeit	Schritte
1	95 °C	3 Min.	initiale Denaturierung
40	95 °C	15 Sek.	Denaturierung
	60 °C	1 Min.	Annealing/Elongation <b>Datenerfassung</b> im FAM- und HEX-Kanal

Der HLA-B27 RealFast™ Assay ist validiert für die Geräte AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P, MIC qPCR Cycler und Rotor-Gene® 6000.

#### Wichtig!

Ein angepasstes Programm ist erforderlich für **Rotor-Gene® 6000**-Geräte, die einen **36-Well-Rotor** verwenden:

Zyklen	Temp.	Zeit	Schritte
1	95 °C	3 Min.	initiale Denaturierung
40	95 °C	15 Sek.	Denaturierung
	56 °C	1 Min.	Annealing/Elongation <b>Datenerfassung</b> im Kanal „green“ und „yellow“

**Hinweis:** Für MIC qPCR Cycler- und Rotor-Gene® 6000-Geräte lautet die für FAM- und HEX-Kanäle verwendete Terminologie Kanal „green“ bzw. „yellow“.

## VII. DATENANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des *HLA-B\*27*-Allels wird dadurch definiert, ob ein Signal im **FAM-Kanal** detektiert wird oder nicht. Eine erfolgreiche PCR wird durch die Amplifikation von PCR-Produkten verifiziert, die im **HEX-Kanal** detektiert werden. Deshalb zeigen sowohl *HLA-B\*27*-positive genomische DNA-Proben als auch die HLA-B27 Positive Control eine Amplifikation sowohl im HEX- als auch im FAM-Kanal. *HLA-B\*27*-negative Proben sowie HLA-B27 Negative Control zeigen eine Amplifikation nur im HEX-Kanal. Fluoreszenzwerte und entsprechende Amplifikationskurven werden automatisch in grafischen Amplifikationsdarstellungen in der Real-Time PCR-Software dargestellt.

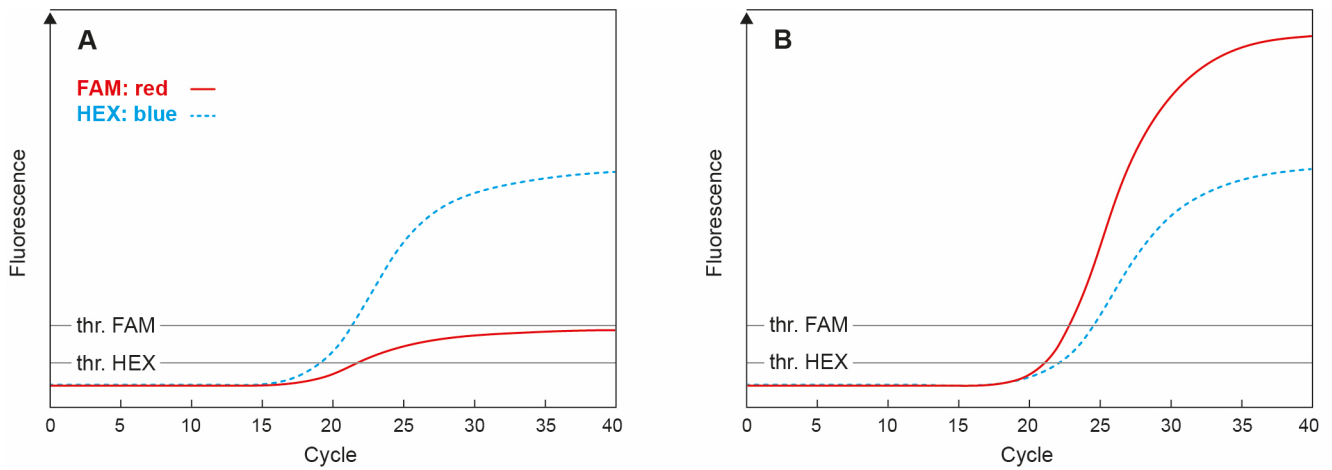
<b>Probentyp</b>	Amplifikation im <b>FAM</b> -Kanal (520 nm)	Amplifikation im <b>HEX</b> -Kanal (556 nm)
<i>HLA-B*27</i> positiv	<b>JA</b>	<b>JA</b>
<i>HLA-B*27</i> negativ	NEIN	<b>JA</b>
HLA-B27 Positive Control	<b>JA</b>	<b>JA</b>
HLA-B27 Negative Control	NEIN	<b>JA</b>
NTC	NEIN	NEIN

**Hinweis:** Einige Gerätesoftwares können manuelle Schwellenwerteneinstellungen für die akkurate Analyse erfordern.

**Empfehlungen für Schwellenwerteneinstellungen (Cq):** Der Schwellenwert für den FAM-Kanal sollte etwas über dem Hintergrund-Fluoreszenz-Signal eingestellt werden, das von der HLA-B27 Negative Control (Abb. 1) erzeugt wird. Proben, die die Schwellenwertlinie nach Cq 37 überschreiten, liefern ungültige Ergebnisse und müssen wiederholt werden. Um die erfassten Daten zu analysieren, befolgen Sie bitte die Anweisungen Ihrer Gerätesoftware.

**Siehe Beispiele** von RealFast™-Ergebnissen auf Seite 14 (Abb. 2).





**Abb. 1: Korrekte SchwellenwertEinstellung auf Basis der bereitgestellten PCR Negative Control-Probe.**

**A.** HLA-B27 Negative Control

**B.** HLA-B27 Positive Control

EN	DE
Fluorescence	Fluoreszenz
Cycle	Zyklus
thr. FAM	Schwellenwert FAM
thr. HEX	Schwellenwert HEX
red /blue	rot/blau

### VIII. LEISTUNGSBEWERTUNG

Die **Genauigkeit** des HLA-B27 RealFast™ Assay wurde durch Analyse von 198 vortypisierten genomischen DNA-Proben bestimmt. Die Ergebnisse stimmten mit den Referenzmethoden überein, die sequenzspezifische Primer-PCR und einen handelsüblichen *HLA-B\*27* Real-Time-PCR-Kit beinhalteten. Der Assay detektierte 66 *HLA-B\*27*-Positive (= 100 % positive prozentuale Übereinstimmung) und 132 *HLA-B\*27*-Negative (= 100 % negative prozentuale Übereinstimmung) korrekt.

Die **Präzision** des HLA-B27 RealFast™ Assay wurde als Variabilität zwischen Replikaten, Anwendern, Tagen und Real-Time PCR-Thermocyclern beurteilt. Tests beinhalteten ferner unterschiedliche RealFast™ 2x Genotyping Mix-Chargen und HLA-B27 Assay Mix-Chargen sowie DNA-Proben, die mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden gewonnen wurden. Insgesamt wurden 296 Tests mit den untersuchten Parametern durchgeführt. Alle 296 Tests zeigten die erwarteten Genotypisierungsergebnisse. Der HLA-B27 RealFast™ Assay wurde am ABI 7500 FAST, ABI StepOne, BioRad CFX96, Mx3005Pro, LightCycler 480 II, RotorGene 6000 (72-Well-Rotor und 36-Well-Rotor) und MIC Cycler validiert. Diese Geräte haben eine Aufheizrate von 2,0 bis 5,9 °C/Sek. und eine Kühlrate im Bereich von 2,4 bis 3,9 °C/Sek. Bei manchen Geräten ist eine manuelle Basislinien- und Schwellenwerteinstellung nötig. Daher können sich die Cq-Werte zwischen den Cyclern unterscheiden. Die Verwendung anderer Thermocycler muss vom Anwender verifiziert werden.

Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection): Das LoD wird bei 0,2 ng DNA-Einsatz pro Reaktion erreicht. Die empfohlene DNA-Konzentration beträgt 2 bis 10 ng/µl genomische DNA.

Die **analytische Spezifität** wird durch sorgfältige Auswahl der Primer und Sonden für die Detektion von *HLA-B\*27*-Allelen sowie die Auswahl stringenter Reaktionsbedingungen sichergestellt. Alle Oligonukleotide wurden mittels Sequenzvergleichsanalyse gegenüber öffentlich verfügbaren Sequenzen in der IPD-IMGT/HLA-Datenbank geprüft ([www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla); Release 3.47.0, 2022-01), um sicherzustellen, dass alle *HLA-B\*27*-Varianten, die in Tabelle 1 gelistet sind und die interne Kontrolle detektiert wird. Eine *In-silico*-Analyse der ausgewählten PCR-Primer und Sonden wurde in Bezug auf störende Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) in ihren Bindungsstellen und zur Beurteilung des Risikos falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse in Verbindung mit dem *HLA-B*-Locus durchgeführt. In den meisten Fällen steht die experimentelle Bestätigung aufgrund begrenzter Zugänglichkeit geeigneter Probenmaterialien aus. Auf Basis der *In-silico*-Analyse führen die Nicht-*HLA-B\*27*-Allele *B\*07:428*, *B\*14:57*, *B\*15:594*, *B\*37:60*, *B\*44:97* und *B\*55:121* wahrscheinlich zu einer Kreuzreaktivität. Eine Kreuzreaktivität von *B\*73:01:01:01*- bis *B\*73:03*-Allelen in heterozygoten Proben ist unwahrscheinlich, aber sehr späte Cq-Werte im FAM-Kanal in homozygoten *B\*73:01:01:01*- bis *B\*73:03*-Proben sind möglich. Tabelle 1 in Abschnitt III fasst die vorhergesagte Abdeckung bekannter *HLA-B\*27*-Allele auf Basis veröffentlichter Sequenzen zusammen.

#### Klinische Leistung

Die Beurteilung der klinischen Leistung des HLA-B27 RealFast™ Assay zur Unterstützung des klinischen Nachweises wurde anhand einer systematischen Literaturrecherche durchgeführt. Eine Querschnittsstudie wurde als relevant für die Sicherheit und Leistung des HLA-B27 RealFast™ Assay identifiziert. Der klinische Nutzen des HLA-B27 RealFast™ Assay wurde durch Analyse von 83 Patienten mit ankylosierender Spondylitis gezeigt. *HLA-B\*27* wurde in 66,3 % der AS-Patienten detektiert, was mit anderen Studien in der Region vergleichbar war. Die Studie zeigte, dass der HLA-B27 RealFast™ Assay in einer klinischen Umgebung verwendet wurde. Es wurden keine unerwünschten Vorkommnisse oder Abweichungen identifiziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die klinische Leistung, der Nutzen und die Sicherheit des HLA-B27 RealFast™ Assay bestätigt werden, wenn der Assay wie vorgesehen eingesetzt wird.

## **IX. STÖRSUBSTANZEN**

Fünf Störsubstanzen (Hämoglobin, Immunglobulin G, Spuren von Blut, Ethanol und EDTA), die potenziell in DNA-Präparationen aus EDTA-Blut vorhanden sind, wurden getestet. Ihre Auswirkungen auf die PCR wurden in drei gereinigten DNA-Proben, die mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen versetzt waren, bewertet und mit den Kontrollen ohne Zusatz von Störsubstanzen verglichen. Alle Proben wurden dreifach analysiert.

Eine Endkonzentration von <0,2 µM Hämoglobin, 0,1 µM Immunglobulin G, <0,02 % peripherem Blut, 2 % Ethanol oder 0,1 mM EDTA in der Reaktion beeinträchtigte die Leistung des RealFast™ Assay nicht.

## **X. GRENZEN DES ASSAYS**

Der HLA-B27 RealFast™ Assay ist ausschließlich für die Detektion von *HLA-B\*27*-Allelen wie in Tabelle 1, Abschnitt III, aufgelistet, bestimmt. Andere genetische Varianten, die möglicherweise in der Probe eines Patienten vorhanden sind, können durch den Assay nicht detektiert werden. Das Vorhandensein eines seltenen oder privaten Polymorphismus, der sich in der durch Primer oder Sonden eingeschlossenen Sequenz befindet, kann zu einem Verlust der Amplifikationsprodukte und/oder Fluoreszenz-Signale führen.

Der HLA-B27 RealFast™ Assay ist nur für die professionelle Verwendung in Labors gedacht.

## **XI. QUALITÄTSÜBERLEGUNGEN**

- Ein gründliches Verständnis des hier beschriebenen Verfahrens sowie Standard-Labortechniken und geeignete Ausstattung sind erforderlich, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.
- RealFast™-Komponenten dürfen nicht über ihr Ablaufdatum hinaus verwendet werden.
- Nach dem ersten Öffnen der Primärverpackung sind RealFast™ Assay-Reagenzien bei ordnungsgemäßer Lagerung bei -30 °C bis -15 °C bis zu dem auf dem Außenetikett des Kits aufgedruckten Ablaufdatum oder alternativ bei 2 °C bis 8 °C für die kurzzeitige Anwendung innerhalb eines Monats stabil.
- Intensive Lichtexposition vermeiden.
- Reaktionsansätze in einem von der Nukleinsäure-Extraktion und der PCR-Produktanalyse getrennten Bereich durchführen.
- Sterile Einweg-Pipettenspitzen mit Filter verwenden, um eine mikrobielle Kontamination und Kreuzkontamination von Reagenzien und Proben zu vermeiden. Röhrchenverschlüsse nicht vertauschen.
- Mit dem Gerät kompatible Reaktionsgefäße mit optisch klaren Kappen oder Verschlüssen verwenden.
- Reagenzien aus verschiedenen Chargen nicht mischen.

### XII. SICHERHEIT

- In den vorgesehenen Arbeitsräumen ist Essen, Trinken und Rauchen sowie die Anwendung von Kosmetika untersagt. Tragen Sie Labormäntel und Einweghandschuhe, wenn Sie Proben und Reagenzien handhaben. Waschen Sie sich anschließend gründlich die Hände.
- Behandeln Sie Proben als potentiell infektiös. Säubern und desinfizieren Sie alle Materialien und Oberflächen, die mit Proben in Kontakt sind, gründlich. Entsorgen Sie sämtlichen Müll in Zusammenhang mit klinischen Proben in spezielle Müllcontainer für biologische Risikoabfälle.
- Die Inhaltsstoffe der Komponenten des RealFast™ Assays sind nicht gefährlich und ihre Konzentrationen übersteigen die in Verordnung 1272/2008/EG angegebenen Grenzwerte nicht.
- Befolgen Sie alle gültigen lokalen und staatlichen Sicherheits- und Umweltbestimmungen.

### XIII. TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Technische Unterstützung erhalten Sie durch:

- Ihren ViennaLab Diagnostics-Händler vor Ort ([www.viennalab.com/distribution](http://www.viennalab.com/distribution))
- QuickGuides ([www.viennalab.com/support](http://www.viennalab.com/support))
- Kontaktieren von [techhelp@viennalab.com](mailto:techhelp@viennalab.com)











### XIV. REFERENZEN

- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man ([www.omim.org](http://www.omim.org))
- Allele Frequency Net Database ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net))
- IPD-IMGT/HLA Database ([www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla))
- Khan MA. An Update on the Genetic Polymorphism of *HLA-B\*27* With 213 Alleles Encompassing 160 Subtypes (and Still Counting). *Curr Rheumatol Rep.* 2017;19(2):9. DOI: 10.1007/s11926-017-0640-1

### XV. RÜCKMELDUNG AN DEN HERSTELLER

Alle schwerwiegenden Vorkommnisse, die in Verbindung mit dem RealFast™ Assay aufgetreten sind, müssen der zuständigen Behörde des jeweiligen Landes und dem Hersteller gemeldet werden.

## XVI. SYMBOLE

	Katalognummer
	Chargencode
	<i>In-vitro</i> -Diagnostika
	Entspricht der europäischen IVD-Bestimmung 2017/746
0123	Identifikationsnummer der benannten Stelle
	Ausreichend für <n> Tests
	Temperaturgrenzwerte für die Lagerung
	Zu verwenden bis
	Hersteller
	Herstellungsdatum
	Siehe Gebrauchsanweisung

XVII. BEISPIELE DER TESTERGEBNISSE

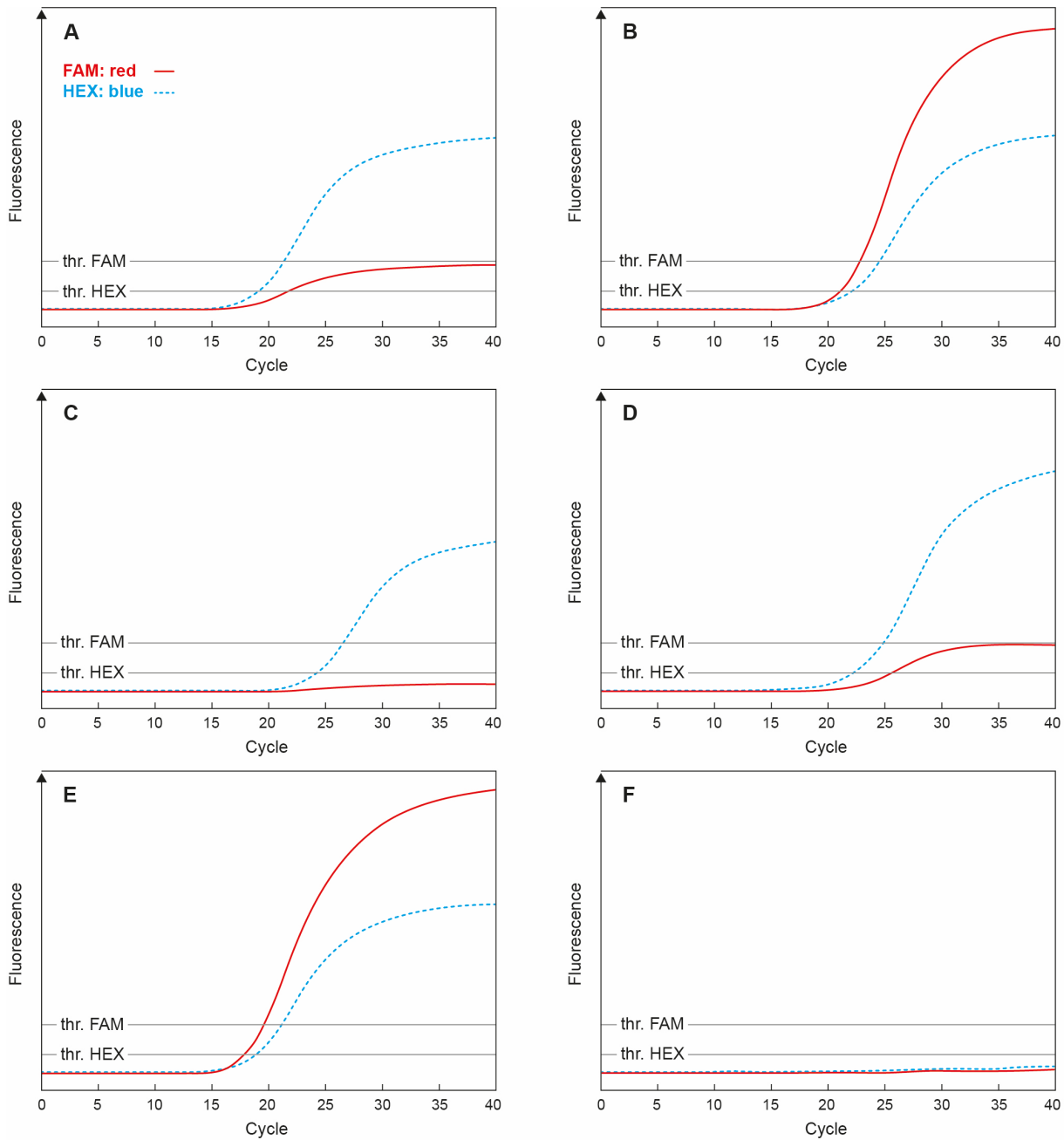


Abb. 2: Grafische Amplifikationsdarstellungen von Kontrollen und Proben.

<b>EN</b>	<b>DE</b>
Fluorescence	Fluoreszenz
Cycle	Zyklus

**A.** HLA-B27 Negative Control. Es wird empfohlen, den Schwellenwert für den FAM-Kanal etwas über dem Hintergrund-Fluoreszenz-Signal einzustellen, das von der HLA-B27 Negative Control erzeugt wird.

**B.** HLA-B27 Positive Control

**C.** HLA-B27 negative Probe


**D.** HLA-B27 negative Probe

**E.** HLA-B27 positive Probe

**F.** No-template control (NTC)

**HINWEISE**

## XVIII. VERWANDTE PRODUKTE

<b>REF</b>		
2-014	GENXTRACT™ Blood DNA Extraction System	100
2-020	Spin Micro DNA Extraction Kit	20
7-150	LCT -13910C>T RealFast™ Assay	100
7-153	LCT -13910C>T RealFast™ Assay	32
7-630	HLA-B1502 RealFast™ Assay	100
7-633	HLA-B1502 RealFast™ Assay	32
7-640	HLA-A3101 RealFast™ Assay	100
7-643	HLA-A3101 RealFast™ Assay	32

Händler:



Hersteller:



**ViennaLab Diagnostics GmbH**

Gaudenzdorfer Guertel 43-45, A-1120 Vienna, Austria

T: +43 1 8120156-0

E: [info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

W: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)