




# HLA-B27 RealFast™ Assay

REF 7-620  $\Sigma$  100 réactions  
-20°C / 2-8°C  



 **ViennaLab Diagnostics GmbH**  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilisation

Le RealFast™ Assay HLA-B27 est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter l'allèle HLA-B27, une variante spécifique d'un antigène humain leucocyte B (HLA-B) dont la présence est fortement associée à des spondylarthropathies séronégatives. Ce kit est utilisé pour confirmer un diagnostic probable de spondylarthrite ankylosante, d'arthrite réactive, d'arthrite rhumatoïde juvénile ou d'uvéite antérieure. Ce test qualitatif permet d'identifier la présence ou l'absence de HLA-B27 dans un extrait d'ADN humain et détecte tous les sous-types HLA-B27 propres à des maladies.

Séquence de référence: HGVS: NG\_023187.1

## 2. Introduction

Les molécules HLA-B sont des protéines de la surface cellulaire qui jouent un rôle important dans la différenciation entre les structures propres au corps et les structures étrangères. La variante HLA-B27 apparaît dans environ 8% dans la population caucasienne générale, mais est présente dans plus de 90% des patients atteints de spondylarthrite ankylosante (Morbus Bechterew). Cette maladie touche principalement les hommes âgés de 20 à 40 ans et se caractérise par une inflammation de l'articulation sacro-iliaque et l'enraidissement progressif de la colonne vertébrale. Le génotype HLA-B27 convient en raison de la corrélation avec la maladie SA. D'autres sous-ensembles de spondylarthrite ankylosante sont aussi associés à l'HLA-B27, dans une moindre mesure.

## 3. Composants du kit

RealFast™ 2x Genotyping Mix 1 Vial  couvercle blanc 1000 µl  
HLA-B27 Assay Mix 1 Vial  couvercle violet 550 µl  
HLA-B27 Positive Control 1 Vial  couvercle vert 75 µl

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymerase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le HLA-B27 Assay Mix se compose de primers géno-spécifiques et de sondes d'hydrolyse munies de marqueurs doubles pour HLA-B27 et d'un gène témoin. Le kit dispose de plus d'un contrôle positif pour HLA-B27.

Le kit comprend des réactifs pour 100 réactions de chacune d'un volume final de 20 µl.

## 4. Stockage et stabilité

Le HLA-B27 RealFast™ Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception à -20°C. Ou bien si vous l'utilisez à court terme en l'espace d'un mois, conservez-le de 2 à 8°C. Les réactifs perdurent sans perdre leur activité jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation. Evitez les expositions prolongées à la lumière directe. Stocké de manière correcte, le kit conserve toute sa fonctionnalité jusqu'à la date de péremption indiquée.

## 5. Description du produit

### 5.1. Principe du test

Le test repose sur un test fluorogène à la nucléase 5', connu aussi sous le nom de TaqMan®-Assay. Chaque réaction contient des paires de primers géno-spécifiques pour amplifier un fragment 184 bp du gène HLA-B27 et un fragment d'un gène témoin, ce dernier sert de contrôle à la PCR. Les autres composants sont deux sondes hydrolysées géno-spécifiques munies d'un double marqueur qui s'hybrident à la séquence cible du fragment correspondant. La proximité directe entre les indicateurs fluorescents 5' et les colorants 3' sur une sonde intacte inhibe la fluorescence. Au cours de la PCR l'activité exonucléase 5' – 3' de la polymérase ADN Taq clive l'indicateur fluorescent 5' de l'échantillon hybridisé. La séparation spatiale du fluorophore du quencher provoque un signal fluorescent en temps réel, qui est proportionnel à la quantité du produit de la PCR.

Dans les échantillons testés positifs HLA-B27, la sonde marquée FAM HLA-B27 tout comme le contrôle PCR marqué HEX s'hybrident sur le fragment du gène approprié. On peut détecter une forte fluorescence dans le canal FAM (520nm) et dans le canal HEX (556nm). Dans les échantillons testés négatifs HLA-B27, seule la sonde marquée HEX du contrôle PCR, s'hybride au brin complémentaire du fragment du gène témoin. On peut ainsi détecter un signal de forte fluorescence dans le canal HEX et, dans le canal FAM, aucun ou bien seulement un signal plus faible sur la ligne de base.

### 5.2. Compatibilité avec les machines de la PCR temps réel

Le HLA-B27 RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast.

Le kit est compatible avec différentes machines de la PCR en temps réel standards du commerce capables de détecter la fluorescence FAM et HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Remarque:** RealFast™ Variant Detection QuickGuides pour la programmation et l'exploitation des résultats des tests sur différents types d'appareils peuvent être téléchargés sur le site: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

Si vous utilisez le AB StepOne™, il faut mettre le colorant de référence passif sur "ROX" ! «

Le kit est livré sans ROX. Pour l'utilisation d'appareils PCR en temps réel nécessitant une haute concentration pour la normalisation des données (par ex. Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), il faut ajouter du ROX dans une concentration finale de 1 µM à 2x Genotyping Mix.

### 5.3. Spécifications du test

La sensibilité a été déterminée à partir de 66 allèles, qui ont été testées positives à l'allèle HLA-B27 à partir d'un test de référence certifié CE. Le HLA-B27 RealFast™ Assay a typé positives l'ensemble des 66 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La spécificité a été déterminée à partir de 130 allèles qui ont été testées négatives à l'allèle HLA-B27 à partir d'un test de référence certifié CE. Le HLA-B27 RealFast™ Assay a typé négatives l'ensemble des 130 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100%.

Limite de détection: 0.2 ng ADN génomique (par réaction).

Concentration d'ADN recommandée: 2 à 20 ng/µl ADN génomique.

## 6. Matériel nécessaire, mais non fourni

Appareil de la PCR en temps réel avec des filtres FAM (520 nm) et HEX (556 nm), tubes PCR optiques compatibles avec l'appareil, gants non-poudrés à usage unique, vortexer, minicentrifugeuse pour des tubes de 2.0 ml, racks pour tubes, set de micropipettes calibrées (0.5 – 1000 µl), des pointes de pipettes stériles avec des filtres aérosol, eau ultrapure, système d'extraction d'ADN, réfrigérateur et congélateur, contenant pour déchets biomédicaux.

## 7. Procédure

### 7.1. Extraction de l'ADN

Les réactifs d'extraction d'ADN **ne sont pas inclus** dans le kit.

L'ADN isolé à partir de différents échantillons (par ex. sang total, gouttes de sang séché, frottement à l'intérieur de la joue ou salive) peut être utilisé. L'extrait d'ADN doit bien sûr convenir à une amplification en terme de concentration, de pureté et d'intégrité.

Pour réaliser un génotypage fiable, la quantité d'ADN pour chaque réaction doit se situer dans une fourchette de 10 à 100 ng pour tous les échantillons.

### 7.2. Contrôle de la PCR

Incluez **toujours** un **No Template Control** (NTC) dans chaque test pour contrôler la présence d'éventuelles contaminations. Il est recommandé d'effectuer les NTC (utilisez une eau ultrapure à la place de l'ADN) comme duplicat.

Incluez **toujours** le HLA-B27 **Positive Control** comme signal de référence positif pour des échantillons inconnus.

» **Remarque:** les échantillons de contrôle représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin. «

### 7.3. Préparation du HLA-B27 RealFast™ Master Mix

Décongelez complètement toutes les solutions, centrifugez-les brièvement après les avoir mélangées avec précaution. La réalisation de la PCR s'effectue à température ambiante. Préparez suffisamment de **Master Mix** pour le nombre total d'amorces PCR prévues (N échantillons + contrôles positifs + contrôles négatifs) et calculez en plus au moins une réaction supplémentaire pour compenser une imprécision de pipetage:

Composants	Par réaction	Par ex. 24+1 réactions
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>

Mettez **15 µl** de **Master Mix** dans chaque godet. Pipetez et ajoutez **5 µl** d'**ADN** ou de **Control** Template pour obtenir un volume final de 20 µl.

Pour minimiser les risques de contaminations, pipetez les échantillons dans cet ordre: premièrement NTC, ensuite les échantillons, et finalement les contrôles positifs. Fermez immédiatement les récipients de réaction.

» **Remarque:** évitez les bulles d'air dans les mélanges finaux de réaction et les empreintes digitales sur les surfaces optiques des récipients de réaction qui peuvent toutes les deux altérer la mesure de la fluorescence. Centrifugez si nécessaire. «

### 7.4. Programme de la PCR

Programmez la machine PCR en temps réel comme indiqué par le fabricant pour les expériences de quantification. Mettez les échantillons PCR dans le thermocycleur et lancez le programme suivant:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P** et autres machines reposant sur le bloc thermique Peltier:

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	3 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation
	<b>60°C</b>	1 min	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> dans le canal FAM et HEX

**Rotor-Gene® 6000:**

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	3 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Denaturation
	36-well rotor: <b>56°C</b> 72-well rotor: <b>60°C</b>	1 min	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> dans le canal Green et Yellow

## 8. Analyse des données / interprétation des résultats

La présence ou l'absence de l'allèle HLA-B27 est définie si un signal apparaît ou non dans le **canal FAM**. La réussite d'une PCR peut être vérifiée par une amplification du gène témoin qui sera détectée dans le **canal HEX** (contrôle PCR). Ainsi, les échantillons d'ADN génomique testés positifs HLA-B27 tout comme le HLA-B27 Positive Control montre une amplification dans les deux canaux, le canal HEX et le canal FAM. Les échantillons testés négatifs HLA-B27 manifeste une amplification uniquement dans le canal HEX. La fluorescence et les courbes d'amplification correspondantes sont représentées automatiquement dans le logiciel PCR en temps réel dans les graphiques d'amplification.

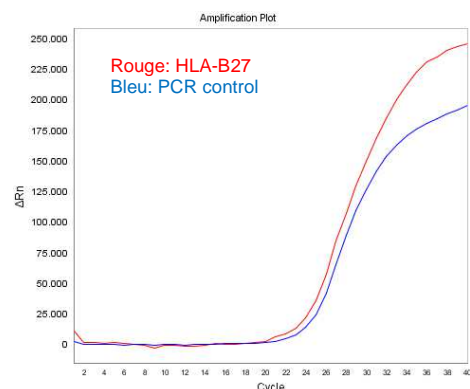
Echantillon	Amplification dans le canal <b>FAM</b> (520 nm)	Amplification dans le canal <b>HEX</b> (556 nm)
HLA-B27 positif	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>
HLA-B27 négatif	<b>NON</b>	<b>OUI</b>
HLA-B27 Positive Control	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>
NTC	<b>NON</b>	<b>NON</b>

Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil (threshold) pour effectuer le génotypage correctement.

Recommandations pour le réglage de la valeur seuil (C<sub>q</sub>):

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM et le canal HEX un peu au-dessus du signal fluorescent généré par le No Template Control (NTC).

Suivez les instructions de votre logiciel d'évaluation de la PCR en temps réel, pour analyser les données que vous avez obtenues.



Graphique d'amplification:  
échantillon **HLA-B27 positif**

## 9. Mises en garde et précautions

- Le kit est à utiliser uniquement pour des diagnostics *in vitro*.
- Pour manipuler les échantillons et les réactifs, mettez toujours des gants poudrés à usage unique et des vêtements de laboratoire appropriés.
- Effectuez l'extraction de l'ADN dans un endroit strictement séparé de celui où vous réalisez la préparation de la PCR.
- Utilisez un jeu de pipettes uniquement destiné à la préparation de la PCR et utilisez des pointes de pipettes avec un filtre aérosol.
- Utilisez uniquement des récipients PCR compatibles avec la machine, aux parois fines, avec un couvercle approprié à faire des mesures optiques.
- Ne mélangez pas de réactifs avec différents numéros de lot.
- N'utilisez pas de kits et de composants de kit périmés.