Verifizierung und Implementierung eines CE-IVD-zertifizierten Kits zum Nachweis von HLA-B*27 mittels Real-Time PCR.

Eliane Walter, BMA22-25
Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF
Humanmedizinische Genetik Dr. Risch

1. Zusammenfassung

Aufgrund gesetzlicher Änderungen muss das aktuell verwendete HLA-B27 LightMix Kit von TIB MOLBIOL in der Humanmedizinischen Genetik Dr. Risch ersetzt werden. Ziel der Diplomarbeit war der direkte Vergleich sowie die erfolgreiche Einführung in die Routinediagnostik zweier kommerzieller Kits zur HLA-B*27-Genotypisierung. Der HLA-B27 RealFast Assay der Firma ViennaLab zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit dem bisherigen Kit und erfüllte somit die labordiagnostischen Anforderungen. Das Kit von GENERI BIOTECH zeigte falsch-negative Resultate und wurde daher nicht weiterverfolgt.

2. Einleitung

Die Analyse des HLA-B*27-Allels spielt eine zentrale Rolle in der Diagnostik von Spondyloarthritiden, insbesondere der Spondylitis ankylosans, auch Morbus Bechterew genannt.
Bei dieser Autoimmunerkrankung kommt es fälschlicherweise zur Aktivierung von CD8+-T-Zellen, welche eine Entzündungs-reaktion im Iliosakralgelenk und der Wirbelsäule mit möglicher peripheren Beteiligung hervorrufen. Zudem gehören Entzündungen der mittleren Augenhaut (anterior Uveitis) als auch gastrointestinalen Entzündungen zu möglichen Symptomen [1]. AS beginnt häufig zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr und äussert sich typischerweise durch Schmerzen sowie Morgensteifigkeit in den Lendenwirbeln [2].



Das bisher verwendete LightMix Kit HLA-B27 von TIB MOLBIOL musste aufgrund einer Gesetzesänderung ersetzt werden, wobei folgende Kits zur Evaluierung zur Verfügung stehen:

- gb GENETIC HLA-B27 der Firma GENERI BIOTECH
- HLA-B27 RealFast Assay der Firma ViennaLab Diagnostics

Bei beiden Analysen handelt es sich um eine RealTime-PCR mit TaqMan-Sonden zum qualitativen Nachweis des Gens und interner Amplifikationskontrolle.
Da im Labor zwei QuantStudio 5 zur Verfügung stehen werden die Kits auf diesem Dx-Gerät verglichen, da durch die Verifizierung beider Geräte eine Back-up-Lösung gegeben ist.

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel 1:
Entscheid und Verifizierung eines Real-Time PCR-Kit von GenetiBiotech oder ViennaLab zum Nachweis von HLA-B*27 auf dem QuantStudio5, als Ersatz für das bisher verwendete Kit von TIB MOLBIOL.
Fragestellung:
Ist die Qualität der Analyse bei beiden Kits hinsichtlich der Richtigkeit gewährleistet?

Die Arbeit umfasst noch weitere Ziele und Fragestellungen welche den Prozess um die Entscheidung und Implementierung ins Labor umfasst.

4. Material und Methodik

Gemessen wurden 30 Proben, wovon in der Routine 15 positiv und 15 negativ getestet worden sind, auf zwei Quantstudio 5. Die zu vergleichenden Kits (gb GENETIC HLA-B27 und HLA-B27 RealFast Assay) sowie laborübliche Materialien wurden verwendet.
Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

- DNA-Extraktion
- NanoDrop-Messung
- PCR
  - Verdünnungen
  - Ansatz gemäss erstellter PCR-Vorlage
  - Durchführung der PCR am QuantStudio 5
  - Auswertung der Daten in der Software
- Statistische Auswertung mittels Cohen's Kappa

5. Ergebnisse und Resultate

Tabelle 1: Generierte 4-Felder-Tafeln der Resultate von GENERI BIOTECH – eigene Darstellung.

		GENERI BIOTECH Gerät 1		
		Positiv	Negativ	
TIB MOLBIOL	Positiv	15[1]	0	15
	Negativ	0	15	15
		15	15	30

[1]Probe schwach positiv

Cohen's Kappa *(K)* = 1

		GENERI BIOTECH Gerät 2		
		Positiv	Negativ	
TIB MOLBIOL	Positiv	14	1	15
	Negativ	0	15	15
		14	16	30

Cohen's Kappa *(K)* = 0.933

Die Übereinstimmung der Proben beim Kit von GeneriBiotech liegt bei Gerät 1 bei 100% und bei Gerät 2 bei 93.3%.

Tabelle 2: Generierte 4-Felder-Tafeln der Resultate von ViennaLab – eigene Darstellung.

		ViennaLab Gerät 1		
		Positiv	Negativ	
TIB MOLBIOL	Positiv	15	0	15
	Negativ	0	15	15
		15	15	30

Cohen's Kappa *(K)* = 1

		ViennaLab Gerät 2		
		Positiv	Negativ	
TIB MOLBIOL	Positiv	15	0	15
	Negativ	0	13*	13
		15	13	28

Cohen's Kappa *(K)* = 1

*2 Proben mussten Ausgeschlossen werden. Eine Amplifikation mit ungültigem Ct-Value wurde festgestellt.

Die Übereinstimmung der Patientenproben liegt gemessen mit dem Kit von ViennaLab bei beiden Geräten bei 100%.

6. Diskussion

Als Ursache für die falsch-negativen Resultate bei GeneriBiotech kann nach weiteren Messungen eine Inhibition, vermutlich aufgrund der Extraktionsmethode vermutet werden. Die ausgeschlossenen Proben bei ViennaLab konnten im Rahmen der Arbeit nicht wiederholt werden. Insgesammt überzeugt Qualität des HLA-B27 RealFast Assay der Firma ViennaLab, wodurch eine Einführung in die Routine der Humanmedizinischen Genetik Dr. Risch angedacht ist.

Referenzen
[1] Navid, F., Chen, L., Bowness, P., & Colbert, R. A. (2025). HLA-B27 and spondyloarthritis: At the crossroads of innate and adaptive immunity. Nature Reviews Rheumatology, 21(2), S. 77. https://doi.org/10.1038/s41584-024-01189-3
[2] Rheumaliega Schweiz. (2023). Morbus Bechterew—axSpA. S. 3. https://rheumaligaschweiz.ch/de/shop/produkte/ publikationen/rheumatische-erkrankungen/axiale-spondyloarthritis/schweiz-vereinigung-morbus-bechterew/
Abbildungen:
OpenAI. (2025). DALL·E 3 (Bild erstellt mit der in ChatGPT integrierten Version; eigene Bearbeitung). https://openai.com/dall-e.