



Humaan Leukocyten Antigeen-B27

De omschakeling van flowcytometrie naar PCR

Bachelor in Biomedische Laboratoriumtechnologie
Afstudeerrichting: Medische Laboratoriumtechnologie

Cato Jacobs

Academiejaar 2015-2016
Campus Geel, Kleinhoefstraat 4, BE-2440 Geel

VOORWOORD

Om het derde jaar van de opleiding 'Medische Laboratoriumtechnologie' op een respectvolle en krachtige manier af te sluiten, heb ik dit eindwerk over HLA-B27 geschreven. Natuurlijk is het een hele opdracht om zelfstandig een onderwerp uit te werken tot een mooi, overzichtelijk geheel. Buiten inspanningen van mezelf heb ik enorm veel hulp gekregen van verschillende personen die mee hebben bijgedragen aan dit eindresultaat.

Allereerst wil ik alle medewerkers van mijn stageplaats, Centrum voor Medische Analyse te Herentals, bedanken voor hun hulp, begrip en geduld. In het bijzonder dank ik alle biologen van het CMA voor de begeleiding van dit werk. De stageplaats en alle medewerkers hebben mij de kans gegeven om me te verdiepen in het onderwerp van dit rapport, maar zeker ook in alle aspecten van het klinisch laboratorium. Hierdoor heb ik aan het einde van mijn opleiding een goed beeld over de laboratoriumactiviteiten.

Ook zou ik alle docenten Biomedische Laboratoriumtechnologie van Thomas More willen bedanken om mij klaar te stomen voor het werkveld. Specifiek richt ik me tot Det Vangeel als stagementor. De feedback en de raad die ik heb gekregen, hebben me geholpen de touwtjes in handen te nemen om dit rapport tot een goed einde te brengen.

Zonder deze steun was het heel wat moeilijker geweest.

Cato Jacobs

SAMENVATTING

HLA-B27-antigen is sterk geassocieerd met reumatische aandoeningen, zoals ankylosing spondylitis. Naast reumatische aandoeningen staan ook de ziekte van Reiter en uveïtis in verband met de aanwezigheid van HLA-B27-genen.

Dit eindwerk bevat de vergelijking van de bepaling van HLA-B27 met flowcytometrie en PCR. Flowcytometrie is de huidige analysemethode. Door een validatie van de PCR-methode, zal deze methode flowcytometrie kunnen vervangen.

Flowcytometrie is de techniek waarmee HLA-B27 wordt bepaald in het Centrum voor Medische Analyse. De bepaling is relatief ingewikkeld, tijdrovend en arbeidsintensief. Resultaten kunnen vaak niet met zekerheid gerapporteerd worden aan de arts. Een tweede analyse met behulp van flowcytometrie of PCR is dan noodzakelijk. Bovendien worden alle positieve stalen opnieuw getest om vals-positieve resultaten te vermijden.

PCR is een techniek waarmee het resultaat van HLA-B27 in de meeste gevallen zonder twijfel kan worden doorgegeven. De techniek spoort het desbetreffende DNA op. Deze methode is minder complex en geeft via een directe weg een correct resultaat.

Voor de implementatie van de PCR-procedure, dient een validatieperiode vooraf te gaan. Tijdens deze periode worden zoveel mogelijk aspecten onderzocht, zodat alle mogelijke omstandigheden zijn bekeken. Aan de hand van enkele prestatiekenmerken wordt de procedure kritisch beoordeeld. De herhaalbaarheid, de reproduceerbaarheid, de juistheid en de correlatie worden bepaald en er gebeurt eveneens een methodevergelijking.

De hierboven vermelde prestatiekenmerken geven allemaal een goed resultaat. Er werden geen discordanties waargenomen. Er is een zeer goede overeenkomst tussen beide methoden. De test voldoet aan de vooropgestelde criteria, met als gevolg dat de test in routine gebruikt kan worden.

SUMMARY

HLA-B27-antigen is strongly associated with rheumatic diseases such as ankylosing spondylitis. In addition, also Reiter's disease and uveitis are associated with the presence of HLA-B27-genes.

This thesis contains the comparison of the determination of HLA-B27 by flow cytometry and PCR. Flow cytometry is the current method of analysis. By a validation of the PCR method, this method could replace the current method of analysis.

Flow cytometry is the technique that determines HLA-B27 at CMA. The method is relatively complicated, time consuming and labor intensive. Results often cannot be reported with certainty to the doctor. A second analysis using flow cytometry or PCR is then necessary. In addition, all positive samples must be retested to avoid false-positive results.

PCR is a technique by which the results of HLA-B27 in the majority of cases can be passed without doubt. The technique detects the relevant DNA. This method is less complex and gives a correct result via a direct path.

A validation period should precede the implementation of the PCR procedure. During this period, as many aspects as possible are investigated. The procedure is critically assessed on the basis of several performance characteristics: repeatability, reproducibility, accuracy and correlation. Also a comparison of the two methods is performed.

The performance characteristics listed above all give a good result. No discrepancies were observed. The results of both methods are similar. The test meets the predetermined criteria, with the result that the test may be used in routine.

INHOUDSTAFEL

VOORWOORD	2
SAMENVATTING	3
SUMMARY	4
INHOUDSTAFEL	5
INLEIDING	7
1 HLA	8
1.1 Inleiding	8
1.2 Major Histocompatibility Complex	8
1.2.1 Klasse 1	9
1.2.2 Klasse 2	11
1.2.3 Klasse 3	12
1.3 HLA-B27	12
1.4 Aandoeningen gerelateerd aan HLA-B27	12
1.4.1 Ankylosing spondylitis	12
1.4.2 Ziekte van Reiter	13
1.4.3 Acute Anterior Uveïtis	13
2 METHODEN VOOR DE HLA-B27-BEPALING	14
2.1 Flowcytometrie	14
2.1.1 Toestel en algemeen principe	14
2.1.2 Reagentia	17
2.1.3 Procedure	17
2.1.3.1 Voorbereiding staal	17
2.1.3.2 Testprincipe	18
2.1.3.3 Workflow	22
2.2 PCR	23
2.2.1 Algemeen principe	23
2.2.2 Bestanddelen voor PCR	25
2.2.3 Toestellen	25
2.2.3.1 Extractietoestel: m2000sp	25
2.2.3.2 Amplificatie- en detectietoestel: m2000rt	25
2.2.4 Procedure	25
2.2.5 Voorbeeldrapporten	26

3	VALIDATIE	28
3.1	Inleiding	28
3.2	Motivatie en leverancier.....	28
3.3	Reagentia.....	29
3.4	Plan en criteria.....	29
3.5	Risicoanalyse	30
3.6	Herhaalbaarheid of within-run	31
3.7	Reproduceerbaarheid of between-run.....	31
3.8	Accuraatheid of juistheid	31
3.9	Correlatie	33
3.10	Besluit van het validatierapport	36
	BESLUIT....	37
	BIJLAGEN....	38
	LITERATUURLIJST	45

INLEIDING

HLA-B27 is het onderwerp van dit onderzoeksrapport. De huidige analysemethode is flowcytometrie. Doordat er enkele nadelen worden ondervonden bij deze methode wordt er nagedacht om de test over te zetten op een andere techniek, namelijk PCR. De pre-analytische fase is van groot belang voor de bepaling via flowcytometrie. Naarmate de ouderdom van het staal toeneemt, zal de expressie van HLA-B27 verminderen. Verse stalen zijn dus een vereiste om correcte resultaten te bekomen via flowcytometrie.

Flowcytometrie heeft een hoge sensitiviteit, maar een lage specificiteit. Bij het gebruik van deze techniek is het risico op kruisreactiviteit reëel. Door deze verminderde specificiteit van de methode wordt er op een speciale manier gewerkt om vals-negatieve of -positieve resultaten te vermijden. Door deze specifieke workflow is de methode tijdrovend en arbeidsintensief.

Doordat de mogelijkheid bestaat om PCR uit te voeren in het Centrum voor Medische Analyse, wordt de omschakeling gemaakt van flowcytometrie naar PCR. Via deze laatste techniek is er geen risico op kruisreactiviteit met andere HLA-antigenen. Door een validatie van de PCR-methode, zal deze methode de huidige analysemethode kunnen vervangen. Via PCR worden accurate, niet-twijfelachtige resultaten bekomen.

Als eerste wordt HLA-B27 zelf onder de loep genomen. De theorie van de genlocatie, de werking en de aandoeningen die gerelateerd zijn aan de aanwezigheid van HLA-B27 worden toegelicht.

In het tweede luik worden de methoden besproken waarmee HLA-B27 wordt bepaald: flowcytometrie en PCR.

Het derde luik bevat de validatie vóór het in gebruik nemen van de PCR-techniek. Hierbij worden ook de resultaten, bekomen via PCR, vergeleken met de resultaten, bekomen via flowcytometrie. Er wordt in dit deel dus een vergelijking gemaakt tussen beide technieken.

Als laatste wordt een besluit geformuleerd.

Dit onderzoeksrapport is dus een praktijkonderzoek dat gebaseerd is op een literatuurstudie waarvoor vakliteratuur gebruikt werd, deels aangeboden door de stageplaats.

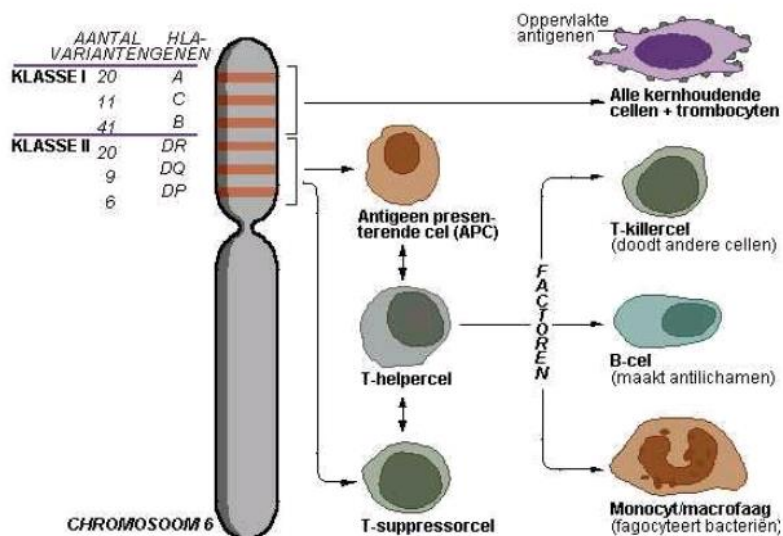
1 HLA

1.1 Inleiding

Het Humane Leukocyten Antigeen is een antigeen dat terug te vinden is op de witte bloedcellen of leukocyten. De meer bekende afkorting van het antigeen is HLA. Ruimer bekeken is dit antigeen op alle gekernde cellen en trombocyten terug te vinden. Het complex dat alle soorten HLA bevat, onderscheidt, samen met het immuunsysteem, de lichaamseigen van de lichaamsvreemde producten. Dit onderscheid wordt gemaakt doordat gekernde cellen herkenningsmoleculen op het celoppervlak bezitten. Deze herkenningsmoleculen worden aanzien als de HLA-moleculen. HLA-antigenen zijn de menselijke antigenen binnen het major histocompatibility complex of MHC. Indien er door het lichaam vreemde antigenen worden gedetecteerd, is het mogelijk dat er een immuunrespons opgewekt wordt (Berkow, 2000).

1.2 Major Histocompatibility Complex

Het major histocompatibility complex of MHC is een systeem dat in alle zoogdieren terug te vinden is en dat in de mens als HLA vertegenwoordigd wordt. De genetische informatie voor het HLA is gelokaliseerd op chromosoom 6 (*Het HLA-systeem: de relatie tussen HLA en bloedtransfusie, s.a.*). Dit chromosoom bevat 166,880,988 basenparen, 1557 genen en 633 pseudogenen (Mungall et al., 2003). Zes van deze genen kunnen worden toegeschreven aan het HLA-systeem. De HLA-genen zijn opgesplitst in twee klassen, en zijn terug te vinden op de korte arm van het desbetreffende chromosoom. Elke ouder bepaalt één helft van het chromosoom, waardoor er 12 genen van het HLA-systeem op het chromosoom 6 te vinden zijn (*Het HLA-systeem: de relatie tussen HLA en bloedtransfusie, s.a.*).



Figuur 1: HLA-genen op chromosoom 6

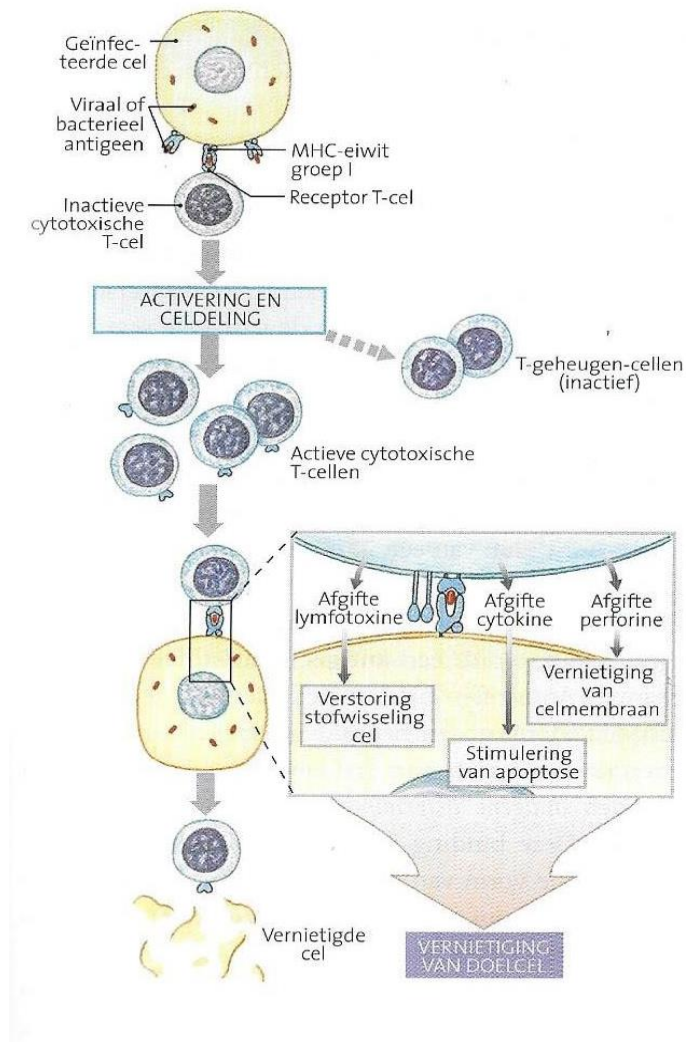
Noot: *Het HLA-systeem: de relatie tussen HLA en bloedtransfusie (s.a.)*. Gevonden op 3 maart 2016 op het internet: <http://www.sanquin.nl/repository/documenten/nl/onderwijs/bloed-en-afweer/HLA-systeem.pdf>

1.2.1 Klasse 1

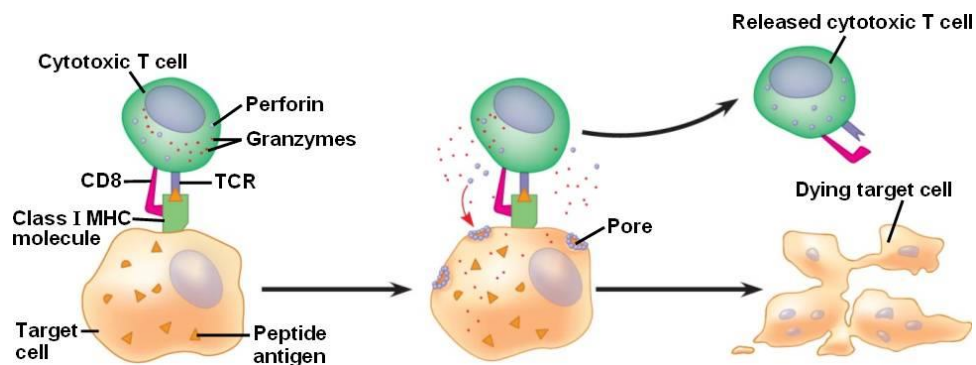
Het major histocompatibility complex bestaat uit 3 klassen.

Tot klasse 1 behoort het HLA-A, HLA-B en HLA-C, hetgeen wordt gedefinieerd als de loci op het chromosoom (Clark, Sharma & Lerch, 1990). Het aantal varianten per soort is in figuur 1 opgelijst. De proteïnen die onder invloed van deze genen geproduceerd worden, zijn terug te vinden op het celoppervlak van alle gekernde cellen en trombocyten. De klasse 1-moleculen binden aan peptidemoleculen en worden zo naar het plasmamembraan van de cel gevoerd. Of een reactie zal optreden of niet, is afhankelijk van de eigenschappen van de cel. Als de cel normaal is, zal er geen reactie optreden. Als de cel afwijkende eigenschappen voor het lichaam vertoont, zal er wel een immunreactie worden opgewekt. De T-cellen zullen geactiveerd worden, wat voor vernietiging van de cel zorgt (Martini & Bartholomew, 2012).

Antigenen op het celoppervlak worden herkend door cytotoxische T-cellen (Clark et al., 1990). Deze cytotoxische cellen zijn inactief en binden met een T-cel receptor op een klasse 1-eiwit van een geïnfecteerde cel. In figuur 2 is de activering van cytotoxische cellen te zien. Door de binding tussen een inactieve cytotoxische cel en een klasse 1-molecule op een geïnfecteerde cel worden de cytotoxische cellen geactiveerd. De actieve cytotoxische cellen delen, hierdoor worden actieve cytotoxische cellen en geheugencellen gevormd. Geactiveerde cytotoxische cellen sporen geïnfecteerde doelcellen op en vallen deze aan door erop te binden. Vernietiging van de doelcel gebeurt door proteolytische enzymen of granzymen, aanwezig in granules, in de cel te brengen (eBioscience, 2015). Als eerste zal een lymfotoxine worden afgegeven dat de stofwisseling van de geïnfecteerde cel verstoort. Als tweede zullen cytokinen worden afgegeven die apoptose van de cel bevorderen. Dit gebeurt door bepaalde genen te activeren, waardoor de cel door zelfdestructie wordt afgebroken. Als derde worden perforinen afgegeven die het celmembraan zullen vernietigen (Martini & Bartholomew, 2012). Klasse 1-moleculen presenteren het antigeen aan CD8+ T-lymfocyten. Dit is in figuur 3 te zien (Stehouwer, Koopmans & van der Meer, 2010).



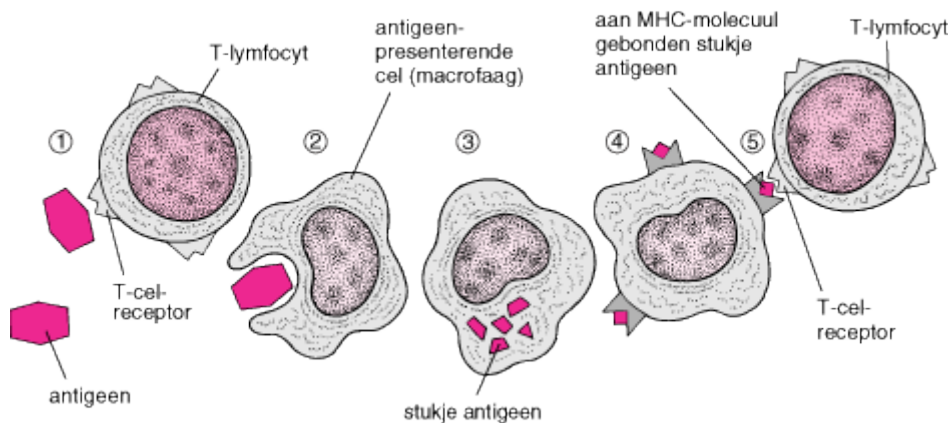
Figuur 2: Activering van cytotoxische cellen
 Noot: Martini, F.H., & Bartholomew, E.F. (2012). *Anatomie en fysiologie: Een inleiding*. Amsterdam: Pearson.



Figuur 3: Werking klasse 1
 Noot: Gevonden op 8 maart 2016 op het internet:
http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch43/cytotoxic_t.html

1.2.2 Klasse 2

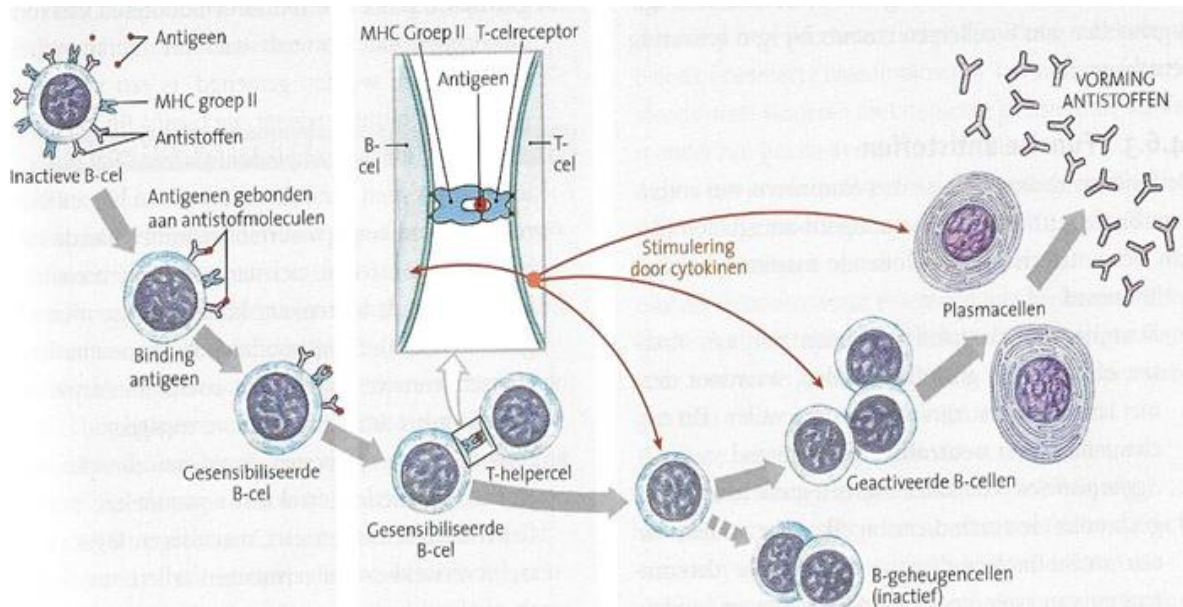
Klasse 2 bevat de andere zes genen: HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA en HLA-DRB1. Ook hiervan zijn de varianten opgelijst in figuur 1. De moleculen die onder invloed van klasse 2-genen worden geproduceerd, zijn terug te vinden op het celoppervlak van antigeen presenterende cellen. Voorbeelden hiervan zijn macrofagen, monocytten, B-lymfocyten en dendritische cellen (*Genetics Home Reference*, 2016). Antigeen presenterende cellen zorgen voor de activatie van T-cellen, waardoor deze cellen vreemde moleculen en vreemde cellen gaan aanvallen. De antigeen presenterende cellen fagocyteren en breken de lichaamsvreemde moleculen en cellen af. De afbraakproducten die zich in de cel bevinden, binden op klasse 2-moleculen en worden zo op het celoppervlak 'gepresenteerd' (Martini & Bartholomew, 2012). Klasse 2-moleculen presenteren het antigeen aan CD4+ T-lymfocyten (Stehouwer et al., 2010). Figuur 4 illustreert de werking van klasse 2.



Figuur 4: Werking klasse 2

Noot: Berkow, R. (2000). *Merck Manual Medische Handboek*. New York: Bohn Stafleu van Loghum. Gevonden op 7 maart 2016 op het internet: <http://www.merckmanual.nl/mmhenl/print/sec16/ch183/ch183a.html>

Klasse 2-moleculen zijn bijvoorbeeld terug te vinden op B-cellen. Figuur 5 beschrijft de sensibilisatie. Een inactieve B-cel heeft aan het oppervlak antistoffen en klasse 2-moleculen. Antigenen in de omliggende vloeistof binden aan antilichamen op het celoppervlak en worden opgenomen via endocytose. De B-lymfocyt zal nu het antigeen presenteren in zijn plasmamembraan op MHC-klasse 2. Bij de presentatie van het antigeen kan er gesproken worden van een gesensibiliseerde B-cel. In de tweede stap zal de gesensibiliseerde B-cel geactiveerd worden. Zodra de T-helpercel is geactiveerd, treedt er een binding op tussen MHC-klasse 2, het antigeen en de receptor van de T-cel. Het gevolg is dat de T-cel cytokinen afgeeft. Hierdoor wordt de B-cel geactiveerd, wordt de deling van B-cellen bevorderd en verloopt de ontwikkeling van B-cel naar plasmacel sneller. In de derde stap vindt deze deling en de differentiatie van de nieuwe cellen plaats. Door de deling worden dochtercellen gevormd, die gedifferentieerd worden tot plasmacellen en B-geheugencellen. De plasmacellen zorgen voor de productie van antilichamen (Martini & Bartholomew, 2012). De antilichamen zijn specifiek voor het antigeen dat de productie van de antilichamen op gang trekt (Berkow, 2000).



Figuur 5: Reactie van B-cellen op de blootstelling aan een antigeen

Noot: Martini, F.H., & Bartholomew, E.F. (2012). *Anatomie en fysiologie: Een inleiding*. Amsterdam: Pearson.

1.2.3 Klasse 3

Klasse 3 is verantwoordelijk voor ontstekingen en andere activiteiten van het immuunsysteem (*Genetics Home Reference*, 2016). Enkele voorbeelden hiervan zijn complementfactoren C2, C4 en factor B, TNF-alfa en lymfotoxine (Rijkers, Kroese, Kallenberg & Derksen, 2009).

1.3 HLA-B27

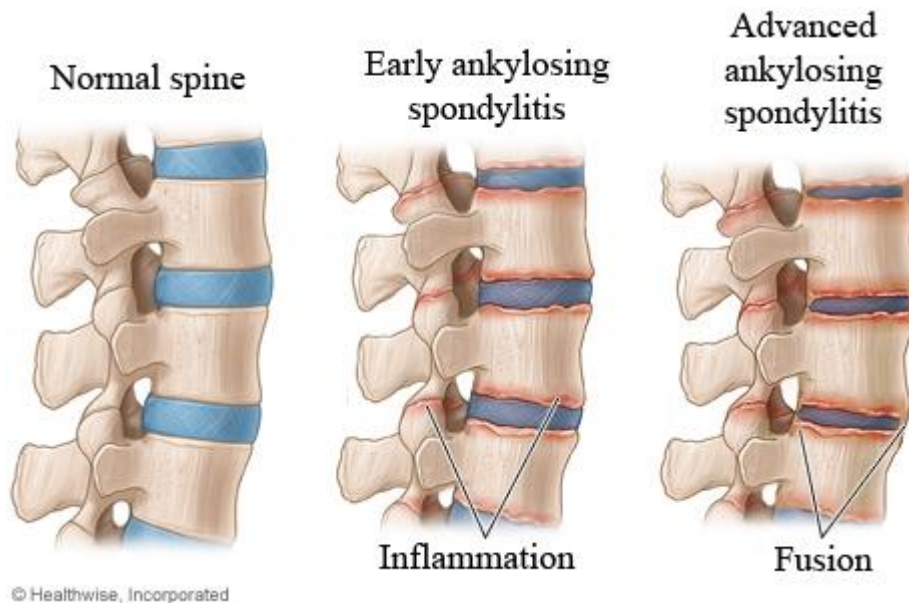
HLA-B27 behoort tot de HLA-genen van klasse 1, en bevindt zich op chromosoom 6 op locus B (*Eligene® Spondylitis HLA-B27 RT*, s.a.). De genlocatie van HLA-B27 is 6p21.3 (NCBI, 2016). Het HLA-B27-antigeen is sterk geassocieerd met reumatische aandoeningen (Van Der Linden & Schreuder, 1977). Spondyloarthropathieën is de overkoepelende groep van reumatische aandoeningen, waar onder andere ankylosing spondylitis toe behoort. Naast reumatische aandoeningen staan ook de ziekte van Reiter en uveïtis in verband met de aanwezigheid van HLA-B27-genen. Patiënten die HLA-B27-positief zijn, hebben meer kans om ankylosing spondylitis te ontwikkelen, en dit op jonge leeftijd, alsook een verhoogde kans op oogontstekingen of uveïtis. Het resultaat van de test geeft geen zekerheid of een patiënt de ziekte heeft, het is eerder een aanwijzing voor een verhoogd risico om de ziekten te ontwikkelen die in 1.4 beschreven staan (*Eligene® Spondylitis HLA-B27 RT*, s.a.).

1.4 Aandoeningen gerelateerd aan HLA-B27

1.4.1 Ankylosing spondylitis

Ankylosing spondylitis, ook bekend als de ziekte van Bechterew, is een chronische, reumatische ziekte die de gewrichten tussen de wervels aantast. De ziekte is gecorreleerd met de aanwezigheid van HLA-B27. 90% van de patiënten met ankylosing spondylitis is positief voor HLA-B27. Deze patiënten hebben ook een verhoogd risico om sacroïliitis te ontwikkelen (*HLA-typering en HLA-geassocieerde aandoeningen: het HLA-systeem*, s.a.). Uit cijfers blijkt dat 19% van de patiënten met ankylosing spondylitis ook sacroïliitis ontwikkelde (Prohaska, 1984).

Sacroiliitis is een ontsteking van de sacro-iliacale gewrichten in het bekken (*Mayo Clinic*, 2015). Bij de HLA-B27-negatieve patiënten (10%) gaat de aandoening gepaard met psoriasis en/of de ziekte van Crohn (*HLA-typing en HLA-geassocieerde aandoeningen: het HLA-systeem, s.a.*). Figuur 6 toont de evolutie van de ruggengraat bij de ziekte van Bechterew.



Figuur 6: Evolutie ruggengraat bij de ziekte van Bechterew
 Noot: *Ziekte van Bechterew.* (s.a.). Gevonden op 3 mei 2016 op het internet:
<https://spondygzet.wordpress.com/ziekte-van-bechterew/comment-page-1/>

1.4.2 Ziekte van Reiter

De ziekte van Reiter uit zich als een ontsteking van de urinebuis, het oogbindvlies en de gewrichten van de onderste ledematen (*Vlaamse Reumaliga vzw, s.a.*). Deze aandoening is minder geassocieerd met HLA-B27. Hier is slechts 79% van de patiënten HLA-B27-positief (*HLA-typing en HLA-geassocieerde aandoeningen: het HLA-systeem, s.a.*).

1.4.3 Acute Anterior Uveïtis

Acute Anterior Uveïtis (AAU) is een ontsteking van het regenboogvlies, het straallichaam of het vaatvlies van het oog. Slechts 50% van de patiënten is HLA-B27-positief. Bij deze patiënten is AAU vaak het eerste teken van de ontwikkeling van ankylosing spondylitis. Deze patiënten hebben meestal een betere prognose doordat de aandoening sneller ontdekt wordt. Bij HLA-B27-negatieve patiënten (50%) gaat de aandoening vaak gepaard met glaucoom en cataract (*HLA-typing en HLA-geassocieerde aandoeningen: het HLA-systeem, s.a.*). Glaucoom wordt gekenmerkt door het op termijn verliezen van het zicht met uitbreiding naar het centrum van het gezichtsbeeld. Cataract daarentegen uit zich door het constant ervaren van een mistig zicht (*Brailleliga vzw, s.a.*).

2 METHODEN VOOR DE HLA-B27-BEPALING

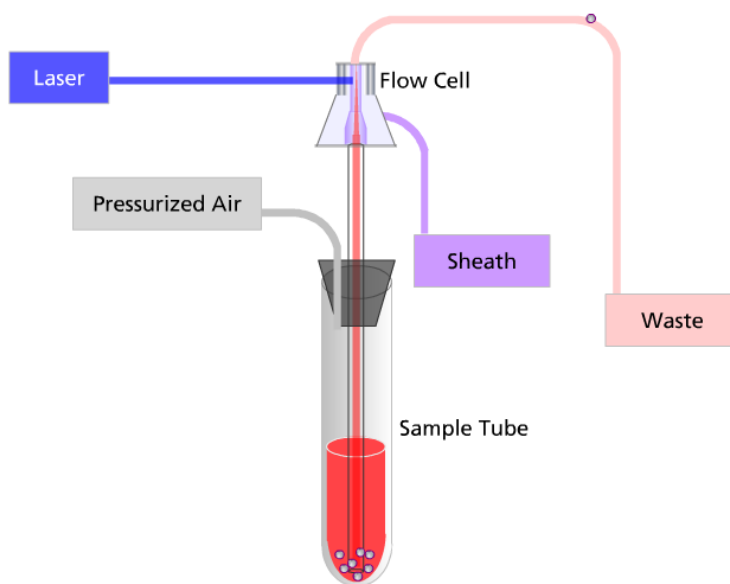
2.1 Flowcytometrie

2.1.1 Toestel en algemeen principe

De FACSCalibur is de flowcytometer die gebruikt wordt in het Centrum voor Medische Analyse. De firma is Becton & Dickinson (BD). Specifiek voor dit type flowcytometer is de aanwezigheid van twee verschillende lasers, namelijk de argon-ion laser en de diodelaser. Elk van deze lasers heeft een specifieke golflengte van respectievelijk 488 nanometer en 635 nanometer (*BD: Introduction to Flow Cytometry, s.a.*).

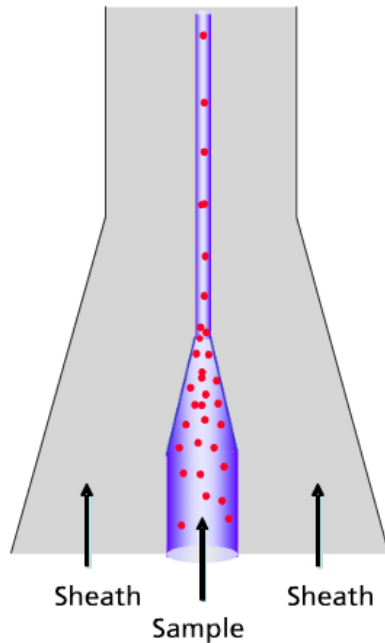
Flowcytometrie is een techniek waarbij op zeer korte tijd een groot aantal cellen geanalyseerd kan worden. Met behulp van flowcytometrische technieken kunnen tegelijkertijd verschillende kenmerken van de te onderzoeken cellen gemeten worden, met name de grootte, de vorm, de interne structuur en de fluorescentie (*BD: Introduction to Flow Cytometry, s.a.*). De flowcytometer is opgebouwd uit 3 systemen: het vloeistofsysteem, het optische systeem en het elektronische systeem.

Kenmerkend voor het vloeistofsysteem is de hydrodynamische focussing, die in figuur 8 wordt geïllustreerd. Door middel van deze techniek ontstaat een laminaire flow zodat de te onderzoeken cellen één voor één ter hoogte van de flow cell passeren. Elke cel zal dan in het laserlicht weerkaatsen en emissie van het fluorescerende licht teweegbrengen (*BD: Introduction to Flow Cytometry, s.a.*). Figuur 7 geeft het algemeen principe van het vloeistofsysteem weer.



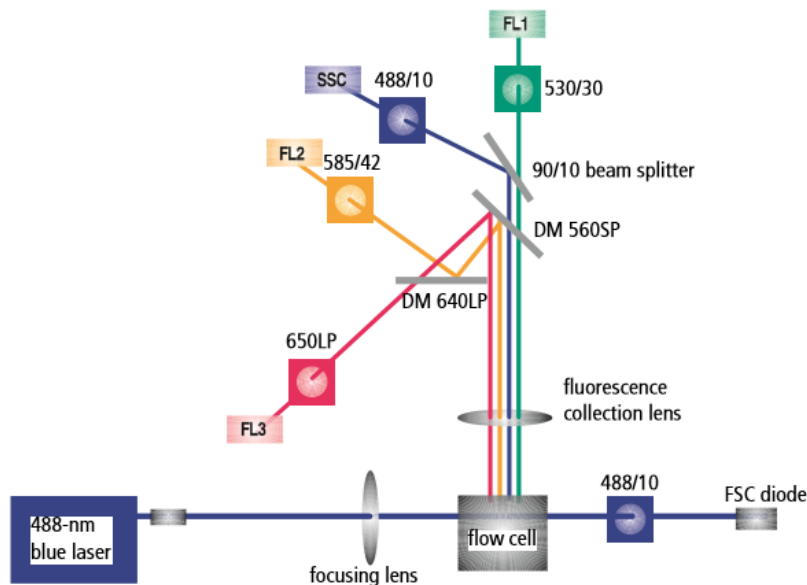
Figuur 7: Vloeistofsysteem

Noot: Becton & Dickinson (s.a.). *Introduction to Flow Cytometry*.
Onuitgegeven cd-rom, Centrum voor Medische Analyse in Herentals,
Afdeling Hematologie.



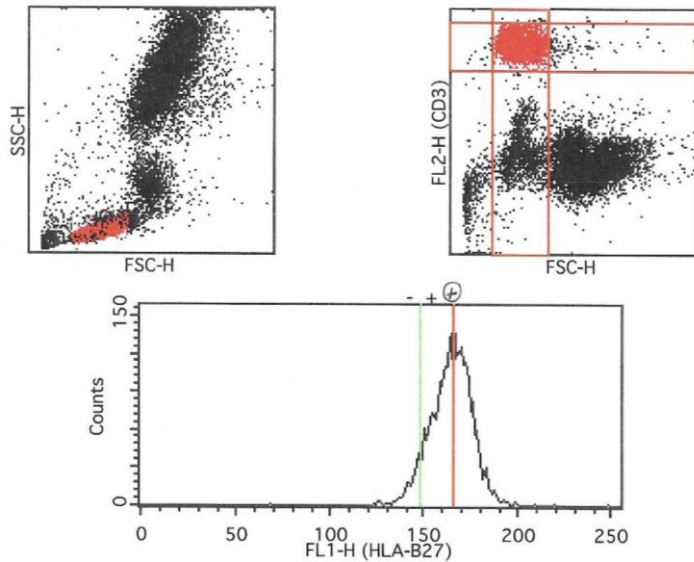
Figuur 8: Hydrodynamische focussing
 Noot: Becton & Dickinson (s.a.). *Introduction to Flow Cytometry*. Onuitgegeven cd-rom, Centrum voor Medische Analyse in Herentals, Afdeling Hematologie.

Het optische systeem omvat een lichtbundel, die geproduceerd wordt door lasers. Bij het passeren van een cel langs de flow cell wordt het licht van de laser weerkaatst in voorwaartse en zijwaartse richting. Deze weerkaatsingen worden ook de forward scatter en de sideward scatter genoemd. De forward scatter is een maat voor de grootte van de cel, terwijl de sideward scatter een maat is voor de interne structuur. Naast de weerkaatsing van het licht wordt fluorescerend licht geëmitteerd door het gebruik van monoklonale antilichamen en fluorochromen. Door middel van fotodiodes, fotomultiplier tubes, filters en spiegels worden de voorwaartse en zijwaartse lichtverstrooiing opgevangen, alsook het fluorescerende licht. Aan de hand van deze kenmerken kan de celpopulatie onderzocht worden (*BD: Introduction to Flow Cytometry*, s.a.). Figuur 9 geeft een overzicht van het optische systeem weer.



Figuur 9: Overzicht optische systeem
 Noot: Becton, Dickinson and Company (2007). *BD FACSCalibur Instructions For Use*.

Het elektronische systeem wordt gekenmerkt door de omzetting van lichtflitsen in elektrische signalen aan de hand van detectoren. De signalen worden versterkt via versterkers. De digitalisatie van de signalen gebeurt door de analog to digital converter, met als resultaat een grafische presentatie door middel van een dotplot en een histogram. In figuur 10 worden twee dotplots weergegeven, samen met één histogram. Het onderscheid tussen de cellen wordt duidelijk gemaakt in de dotplots. De rode populatie duidt de lymfocyten aan. Dit zijn de targetcellen, waar de analyse op gebeurt. Het histogram geeft een maat voor de fluorescentie weer, wat gecorreleerd is aan de aan- of afwezigheid van HLA-B27 (*BD: Introduction to Flow Cytometry, s.a.*).



Figuur 10: Grafische presentatie van lichtflitsen
 Noot: Uitgeprint rapport CMA

2.1.2 Reagentia

De algemene reagentia die gebruikt worden zijn FACSTFlow, FACSClean en gedemineraliseerd water als spoeloplossing.

BD HLA-B27 Kit beschikt over 3 reagentia, tabel 1 geeft een overzicht.

Tabel 1: Overzicht reagentia BD HLA-B27 Kit

BD HLA-B27 Kit	Bestanddelen	Functie
Reagens A (Anti-HLA-B27 FITC/CD3 PE)	Saline met gelatine en natrium-azide FITC-gelabeld Anti-HLA-B27 kloon GS145.2 PE-gelabeld CD3 kloon SK7	GS145.2: identificatie van het HLA-B27-antigeen SK7: identificatie van T-lymfocyten Natrium-azide: conserverend middel
Reagens B (10X BD FACSLysing)	50% diethyleen glycol en 15% formaldehyde Voor gebruik verdunnen met water naar 1X BD FACSLysing	Lyse-oplossing
Reagens C (HLA-B27 Calibration Beads)	Saline met Tween 20, gelatine en natrium-azide	

HLA-B27 FITC geconjugeerde monoklonale antilichamen is het reagens dat gebruikt wordt om twijfelachtige en positieve resultaten te bevestigen. Het reagens is afkomstig van de firma One Lambda en werkt volgens een immunofluorescentiekleuring van HLA-B27. De geconjugeerde monoklonale antilichamen reageren met het HLA-B27-antigeen. Er wordt gewerkt met een negatieve en een positieve oplossing. De negatieve oplossing die geen antilichamen tegen HLA-B27 bevat, zal altijd een negatief resultaat geven. De positieve oplossing daarentegen, bevat wel deze antilichamen, en zal bij HLA-B27-positieve patiënten een reactie opwekken (*One Lambda, Inc., 2004*).

2.1.3 Procedure

BD HLA-B27 Kit is zeer gevoelig, maar minder specifiek door de kruisreactiviteit die kan optreden. Meestal is deze interferentie te wijten aan HLA-B7. Door dit risico wordt bij twijfelachtige en positieve resultaten beroep gedaan op de reagentia van One Lambda, die minder gevoelig zijn voor deze kruisreactie.

2.1.3.1 Voorbereiding staal

De analyse gebeurt op EDTA-volbloed. Een fractie volbloed wordt geïncubeerd met een bepaalde hoeveelheid antistoffen gemerkt met fluorochromen. De rode bloedcellen worden gelyseerd door een lyse-oplossing. Daarna volgt een wasstap en een fixatiestap. De uiteindelijke celsuspensie wordt dan op de carousel van de FACSCalibur geplaatst en automatisch ter analyse aangeboden (*Becton, Dickinson & Company, 2015*).

De werkwijze van de BD HLA-B27 Kit verloopt volgens volgende procedure.

- Pipetteer 30 μ L reagens met 50 μ L staal.
- Vortex. Hierbij is het belangrijk dat al het bloed geïncubeerd wordt. Er mogen geen druppels aan de zijkant van de tube achterblijven.
- Incubeer 15 tot 30 minuten op kamertemperatuur in het donker.
- Voeg 2 mL lyse-oplossing toe en vortex.
- Incubeer exact 10 minuten in het donker.
- Centrifugeer gedurende 5 minuten aan 300 g.
- Giet de oplossing af tot de laatste druppel.
- Voeg 2 mL sheath-oplossing toe en vortex.
- Centrifugeer gedurende 5 minuten aan 300 g.
- Giet de oplossing af tot de laatste druppel.
- Voeg 500 μ L sheath-oplossing toe en vortex.
- Het staal is klaar voor analyse.

De werkwijze van One Lambda verloopt volgens volgende procedure.

- Markeer twee buisjes als respectievelijk negatief en positief.
- Pipetteer in elk buisje 5 μ L reagens (negatief of positief) en 25 μ L staal.
- Vortex. Hierbij is het belangrijk dat al het bloed geïncubeerd wordt. Er mogen geen druppels aan de zijkant van de tube achterblijven.
- Incubeer 15 tot 30 minuten op kamertemperatuur in het donker.
- Voeg 2 mL lyse-oplossing toe en vortex.
- Incubeer exact 10 minuten in het donker.
- Centrifugeer gedurende 5 minuten aan 300 g.
- Giet de oplossing af tot de laatste druppel.
- Voeg 2 mL sheath-oplossing toe en vortex.
- Centrifugeer gedurende 5 minuten aan 300 g.
- Giet de oplossing af tot de laatste druppel.
- Voeg 500 μ L sheath-oplossing toe en vortex.
- Het staal is klaar voor analyse.

2.1.3.2 Testprincipe

Bij de BD-procedure wordt aan volbloed FITC-gebonden anti-HLA-B27 en PE-gebonden anti-CD3 toegevoegd. Deze antilichamen binden met de oppervlakte-eiwitten van de witte bloedcellen, meer bepaald de T-lymfocyten. De T-lymfocyten worden namelijk geanalyseerd. Door het toevoegen van een lyse-oplossing worden de rode bloedcellen gelyseerd. Rond de T-lymfocyten wordt een gate gevormd door de forward scatter en de PE-fluorescentie. In deze gate wordt de mediaan van het FITC-fluorescentiesignaal van anti-HLA-B27 gemeten (Bracke, s.a.). Deze waarde wordt vergeleken met de marker. Figuur 11 geeft een negatief voorbeeldrapport weer, figuur 12 een positief.

CMA Herentals HLA-B27 Laboratory Report

Director: Dr. Bracke
Operator: Cindy

Cytometer: FACSCalibur (E1213)
Software: HLA-B27 v5.0

Sample ID: 806404582

Date Acquired: Wed, May 25, 2016 5:49 PM

Date Analyzed: Wed, May 25, 2016 5:49 PM

Data File Name: 80640458209.01

Lab Report Name: (Lab Report not saved)

Bead Lot ID: 5316987/139

Reagent Lot ID: 5337708:148

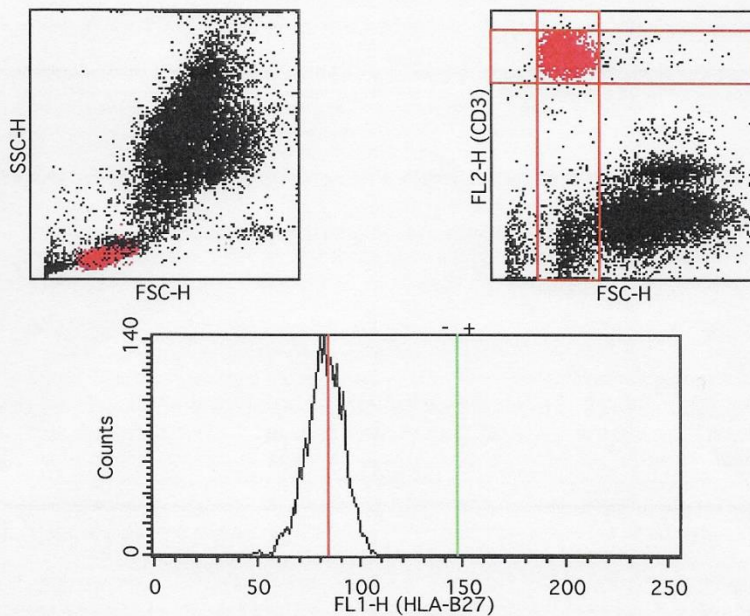
Events Acquired: 15000

Gated Events: 2881

Preset FL1 Marker: 148

Sample FL1 Median: 85

Conclusion: HLA-B27 negative sample



Figuur 11: Voorbeeldrapport HLA-B27-negatief resultaat, bekomen via BD HLA-B27 Kit
Noot: Uitgeprint rapport CMA

CMA Herentals HLA-B27 Laboratory Report

Director: Dr. Bracke
Operator: Paula

Cytometer: FACSCalibur (E1213)
Software: HLA-B27 v5.0

Sample ID: 700182138

Date Acquired: Wed, May 25, 2016 1:28 PM

Date Analyzed: Wed, May 25, 2016 1:28 PM

Data File Name: 70018213826.01

Lab Report Name: (Lab Report not saved)

Bead Lot ID: 5316987/139

Reagent Lot ID: 5337708:148

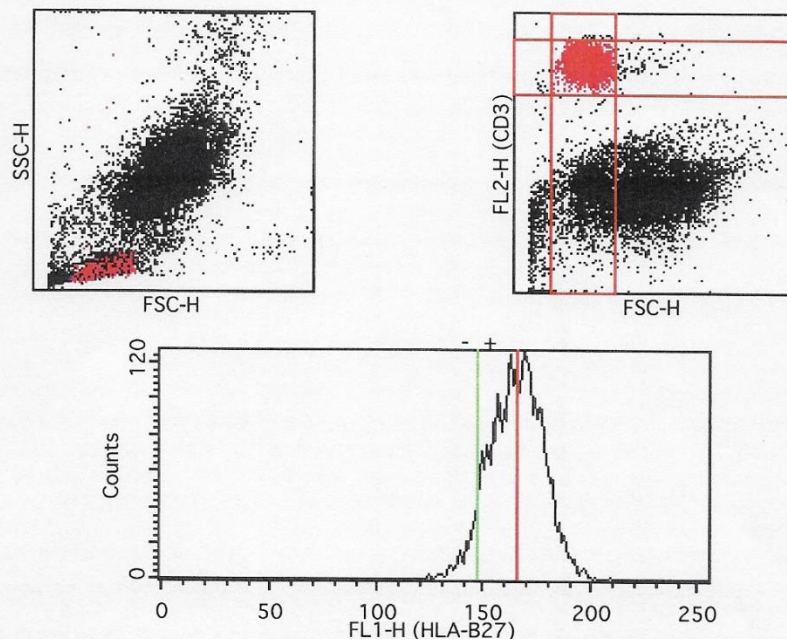
Events Acquired: 15000

Gated Events: 3533

Preset FL1 Marker: 148

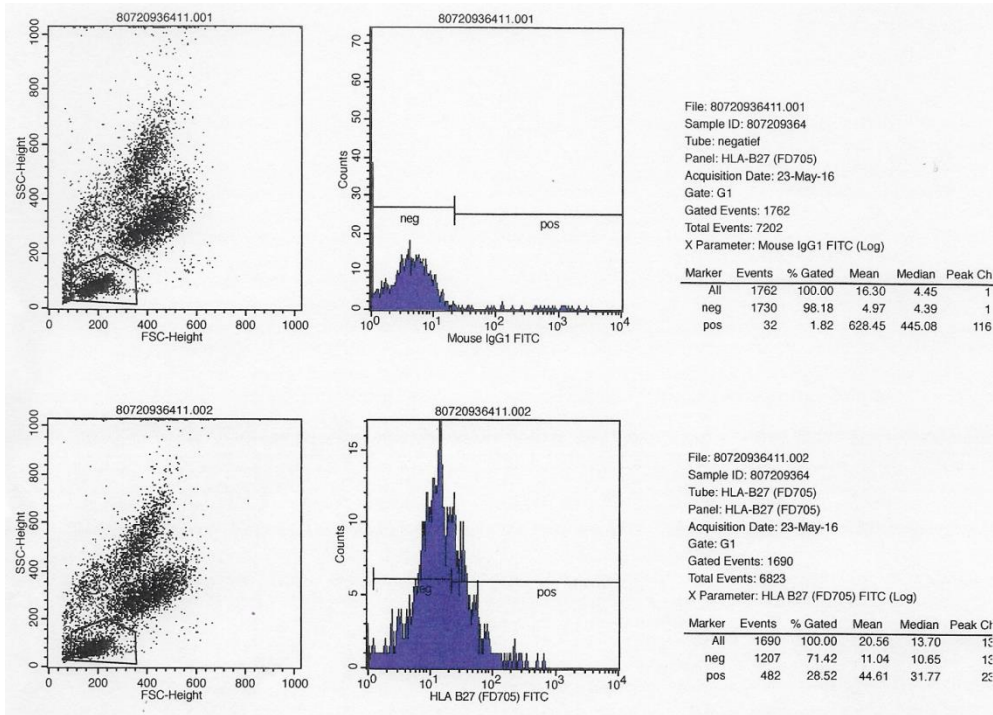
Sample FL1 Median: 167

Conclusion: HLA-B27 positive sample

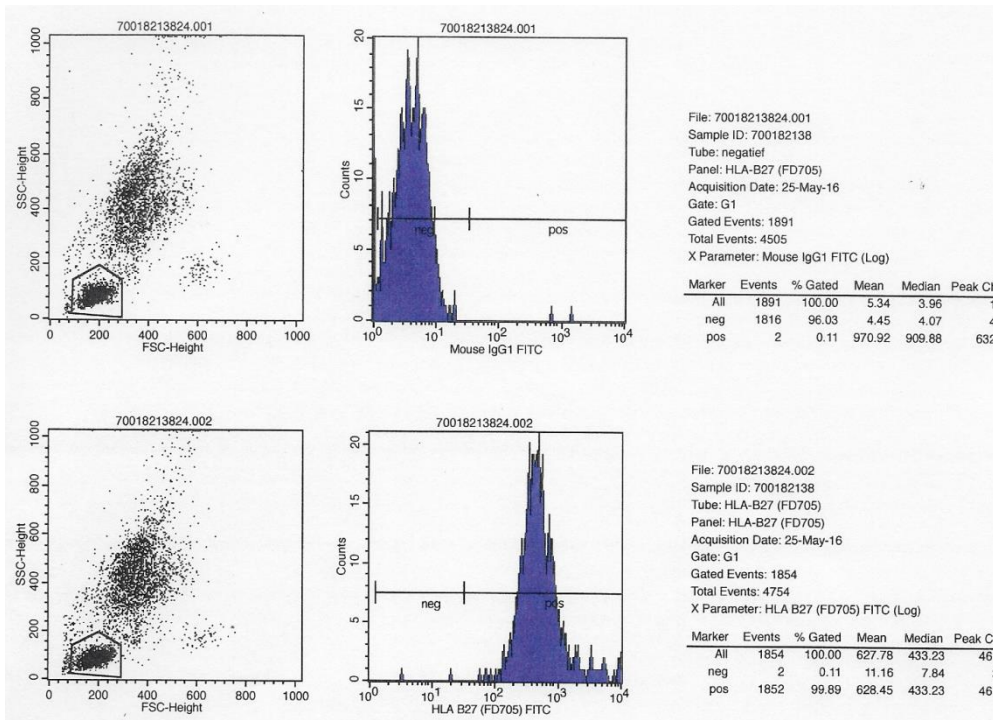


Figuur 12: Voorbeeldrapport HLA-B27-positief resultaat, bekomen via BD HLA-B27 Kit
Noot: Uitgeprint rapport CMA

Bij de kit van One Lambda wordt FITC-gebonden Mouse IgG2B gemengd met volbloed in het negatieve buisje, terwijl anti-HLA-B27 wordt gemengd met volbloed in het positieve buisje. Rond de lymfocyten wordt een gate gevormd door de forward scatter en de sideward scatter. Hierin wordt de mediaan van het FITC-fluorescentiesignaal van het Mouse IgG2B en het anti-HLA-B27 gemeten. Ook de positieve en negatieve events, resulterend in het histogram, worden bekeken (*One Lambda, Inc., 2004*). In figuur 13 is een negatief rapport te zien. Figuur 14 vertoont een positief resultaat.

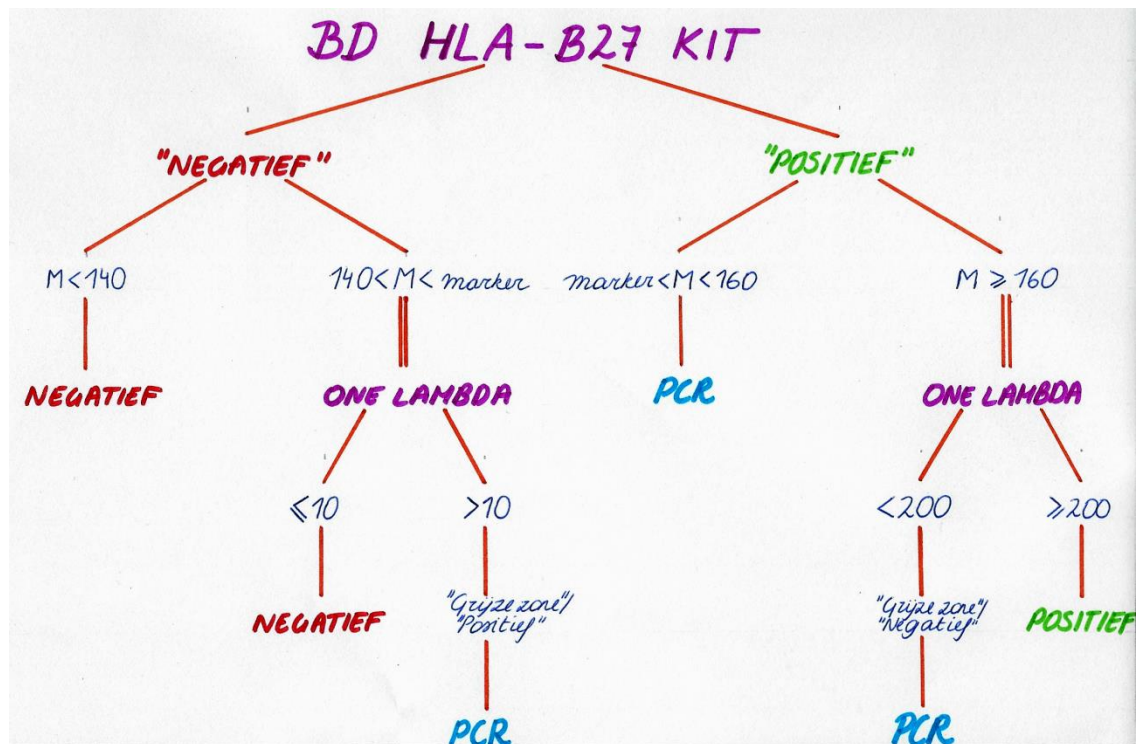


Figuur 13: Voorbeeldrapport HLA-B27-negatief resultaat, bekomen via One Lambda
 Noot: Uitgeprint rapport CMA



Figuur 14: Voorbeeldrapport HLA-B27-positief resultaat, bekomen via One Lambda
 Noot: Uitgeprint rapport CMA

2.1.3.3 Workflow



Figuur 15: Workflow
Noot: Eigen nota's

Voor de HLA-B27-bepaling via flowcytometrie wordt er gebruik gemaakt van twee kits: BD HLA-B27 Kit en One Lambda HLA-B27 Fluorescein Isothiocyanate Conjugated Monoclonal Antibody. Figuur 15 geeft de workflow weer.

De HLA-B27-bepaling van Becton & Dickinson (BD) wordt op alle stalen uitgevoerd.

Indien een HLA-B27-"negatief" resultaat bekomen wordt met de kit van BD, wordt er gekeken naar de 'Sample FL1 Median' of de monstermediaan.

- Is de monstermediaan kleiner dan 140, dan is het staal wel degelijk negatief.
- Ligt de monstermediaan tussen 140 en de 'Preset FL1 Marker', dan dient de tweede test, One Lambda HLA-B27 FITC Conjugated Monoclonal Antibody, uitgevoerd te worden.
 - Is voor de tweede test de mediaan kleiner dan of gelijk aan 10, dan is het resultaat negatief.
 - Is het resultaat van de mediaan groter dan 10, dan ligt dit in de grijze zone, of is positief. Om zekerheid te brengen wordt het staal doorgestuurd voor PCR.

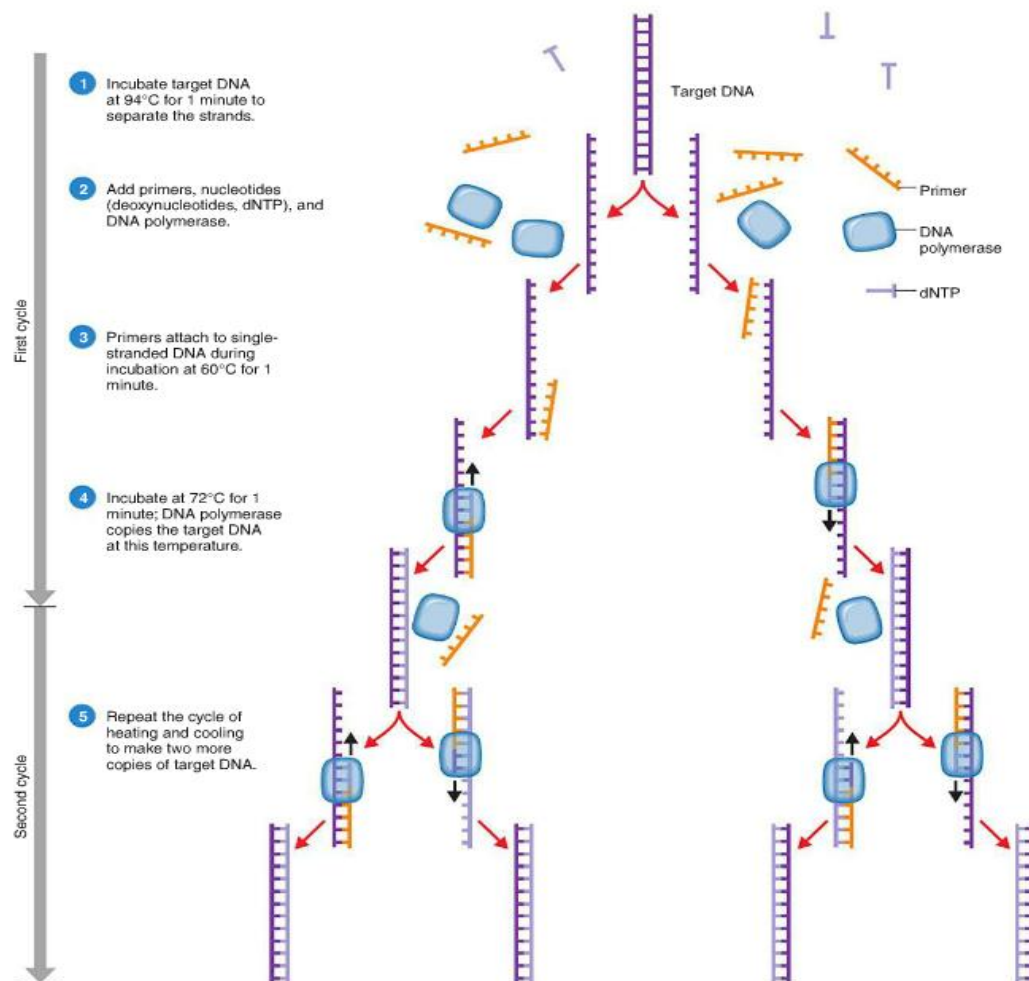
Indien een HLA-B27-"positief" resultaat bekomen wordt met de kit van BD, wordt er eveneens gekeken naar de 'Sample FL1 Median' of monstermediaan.

- Ligt de waarde tussen de marker en 160, dan wordt het staal doorgestuurd voor PCR-analyse.
- Is de monstermediaan groter dan of gelijk aan 160, wordt de tweede test, One Lambda HLA-B27 FITC Conjugated Monoclonal Antibody, uitgevoerd.
 - Is voor de tweede test de mediaan kleiner dan 200, dan ligt dit in de grijze zone, of is negatief. Om zekerheid te brengen wordt het staal doorgestuurd voor PCR.
 - Is de mediaan groter dan of gelijk aan 200, dan is het staal positief.

2.2 PCR

2.2.1 Algemeen principe

PCR is een techniek die gebruikt wordt om een stukje DNA te amplificeren of te vermeerderen. Het DNA dat geamplificeerd wordt, wordt het target-DNA of doel-DNA genoemd. Dit stukje DNA wordt geïncubeerd op 95 °C gedurende 3 minuten en 15 seconden. Hierdoor gaat het dubbelstrengige DNA uit elkaar door het verbreken van de waterstofbruggen, met als doel dat de twee enkelstrengige strengen gebruikt kunnen worden als template voor de DNA-synthese van een complementaire streng. In de volgende stap zullen de bestanddelen worden gebruikt die nodig zijn om de reactie succesvol te laten verlopen. Hiermee worden primers, nucleotiden, enzymen en probes bedoeld. De primers zijn stukjes nucleïnezuren die binden aan de complementaire sequentie. Deze primers hebben een complementaire sequentie met het uiteinde van het target-DNA. Door hybridisatie op een temperatuur van 60 °C worden de primers gebonden aan het target-DNA, wat ook de primer-annealing wordt genoemd. De vier nucleotiden zijn de DNA-bouwstenen, die gebruikt worden voor de DNA-synthese. Door het DNA-polymerase zal het target-DNA gesynthetiseerd worden, en dit op een temperatuur van 60 °C gedurende 40 seconden. Dit is de ketenverlenging en gebeurt steeds in 5'-3'-richting. Na deze stap eindigt de eerste cyclus. Uit de gevormde DNA-strengen kan de procedure opnieuw beginnen, met als resultaat een exponentiële vermeerdering van het target-DNA. Vanaf de tweede cyclus duurt de denaturatie slechts 15 seconden (Tortora, Funke & Case, 2013). In figuur 16 is deze procedure afgebeeld. In bijlage 3 is een grafiek te zien waarin het temperatuursprofiel wordt afgebeeld.

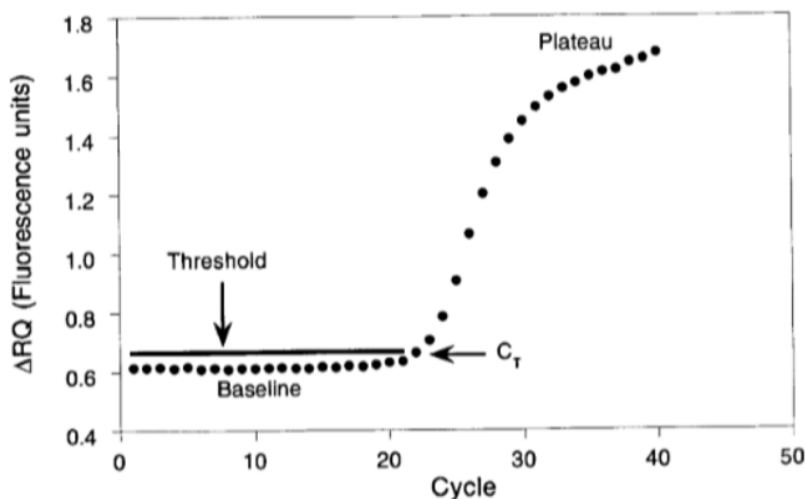


Figuur 16: Principe PCR

Noot: Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2013). *Microbiology: An Introduction*. United States of America: Pearson Education, Inc.

In het begin van de reactie is er een exponentiële vermenigvuldiging van het target-DNA. Hierbij zal het product verdubbeld worden tijdens elke cyclus. Na een bepaald aantal cyclussen neemt de efficiëntie van de reactie af en zal de exponentiële toename veranderen in een lineaire toename. Tijdens deze fase zal er een competitie zijn tussen de primers en het product voor de binding met de complementaire sequentie, waardoor een vertraging van de reactie zal plaatsvinden. Ook de lineaire toename loopt na een tijdje op zijn einde door een uitputting van de reagentia. In dit geval wordt de plateaufase bereikt. Tijdens de plateaufase worden er geen nieuwe producten gevormd, de reagentia zijn immers uitgeput (Tortora, Funke & Case, 2013).

Figuur 17 toont het verloop van een real-time PCR-reactie. De baseline is het gedeelte van de grafiek waar de curve geen verandering doormaakt en op een lage waarde blijft. Hier wordt er zeer weinig product gevormd en zal bijgevolg ook geen fluorescentie worden waargenomen. De threshold is een grens, die het begin van de exponentiële vermenigvuldiging aanduidt. De achtergrondfluorescentie wordt door middel van de threshold achterwege gelaten. De C_T is de cyclus waarbij de fluorescentie de thresholddrempel passeert en de cyclus waar de exponentiële vermenigvuldiging start (Ontwikkeling en validatie van PCR-methoden voor de detectie van *Brassica nigra* en *Brassica juncea*, 2013).



Figuur 17: Grafiek PCR-reactie

Noot: *Ontwikkeling en validatie van PCR-methoden voor de detectie van Brassica nigra en Brassica juncea* (2013). Gevonden op 12 mei 2016 op het internet:

http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/166/833/RUG01-002166833_2014_0001_AC.pdf

De detectie gebeurt door het al dan niet opvangen van een fluorescentiesignaal. Dit gebeurt aan de hand van een probe die bindt aan een specifieke sequentie op het enkelstrengig target-DNA. Een probe is een oligonucleotide waarop een fluorofor en een quencher gebonden zijn. Indien het fluorofor en de quencher zich op hetzelfde molecule dicht bij elkaar bevinden, treedt er quenching op. Dit is een fenomeen dat ervoor zorgt dat er geen fluorescentie zal worden waargenomen, de quencher zal namelijk de energie absorberen, waardoor er geen fluorescentie wordt gedetecteerd. De hydrolyse van de probe gebeurt doordat het DNA-polymerase een complementaire streng gaat synthetiseren. DNA-polymerase passeert langs de probe, waardoor de hydrolyse optreedt door de exonuclease-activiteit. Hierdoor wordt de afstand tussen de quencher en het fluorofor groter, waardoor het fluorofor fluorescentiesignalen kan uitzenden die de quencher niet zal opvangen. De fluorescentie wordt gedetecteerd met een wolframhalogeenlamp. Deze lamp zendt licht uit van een geselecteerde golflengte. De fluoroforen worden geëxciteerd en zenden het licht vervolgens terug uit. Het uitgezonden licht zal de emissiefilter passeren en wordt zo naar de CCD Camera geleid. Deze Charge Coupled Device Camera is een chip die het fluorescerende licht omzet naar een elektrisch signaal (Abbott Molecular Inc., 2014).

2.2.2 Bestanddelen voor PCR

Het startmateriaal voor de Polymerase Chain Reaction is DNA. DNA dient als template voor de verdere PCR-reactie. Zelfs bij zeer weinig materiaal kan de reactie doorgaan. Het DNA dat bij de HLA-B27-bepaling wordt geïsoleerd is genomisch DNA en is afkomstig uit volbloed. De mastermix bevat de nodige componenten om de PCR-reactie te laten verlopen. Deze componenten zijn de primers, de enzymen, de desoxynucleoside trifosfaten (dNTP's) en de probes. De primers matchen specifiek met het HLA-B27-gen (Tortora, Funke & Case, 2013).

2.2.3 Toestellen

2.2.3.1 Extractietoestel: m2000sp

Het toestel, m2000sp, wordt gebruikt om DNA te extraheren uit een staal. In een buisjessysteem op het toestel wordt een mengsel gemaakt tussen de magnetische partikels (mMicroparticles_{DNA}), de lysing buffer (mLysis_{DNA}) en het staal. Dit geheel wordt gedurende 20 minuten geïncubeerd op 50 °C. Hierbij worden de cellen onder invloed van de lysing buffer gelyseerd, zodat de nucleïnezuren vrijkomen. Deze zijn negatief geladen en worden door de positief geladen micropartikels (ijzeroxidepartikels) aangetrokken. Na de incubatie worden de buisjes overgebracht naar een magnetische zone. Partikels met gebonden nucleïnezuren worden aangetrokken door het magnetische veld, waardoor het ongebonden materiaal achterblijft. Dit materiaal wordt weg gepipetteerd. Er wordt nadien een wasoplossing toegevoegd om nog meer ongebonden materiaal te verwijderen. Aan de zuivere oplossing van magnetische partikels en nucleïnezuren wordt de buffer toegevoegd, zodat de nucleïnezuren vrijkomen van de magnetische partikels. Dit gebeurt bij een temperatuur van 65 °C gedurende 20 minuten. Als de buisjes terug in het magnetische blok worden gebracht, worden de magnetische partikels weer aangetrokken, terwijl de nucleïnezuren overblijven. Dit eluaat wordt gepipetteerd in een 96-deepwell plaat. Nadat de mastermix is gepipetteerd in de PCR-plaat wordt vanuit de 96-deepwell plaat 10 µL eluaat overgebracht in de PCR-plaat (Abbott Molecular, 2016).

2.2.3.2 Amplificatie- en detectietoestel: m2000rt

De PCR-plaat wordt na de extractie overgebracht naar m2000rt, waar de amplificatie en detectie plaats zal vinden.

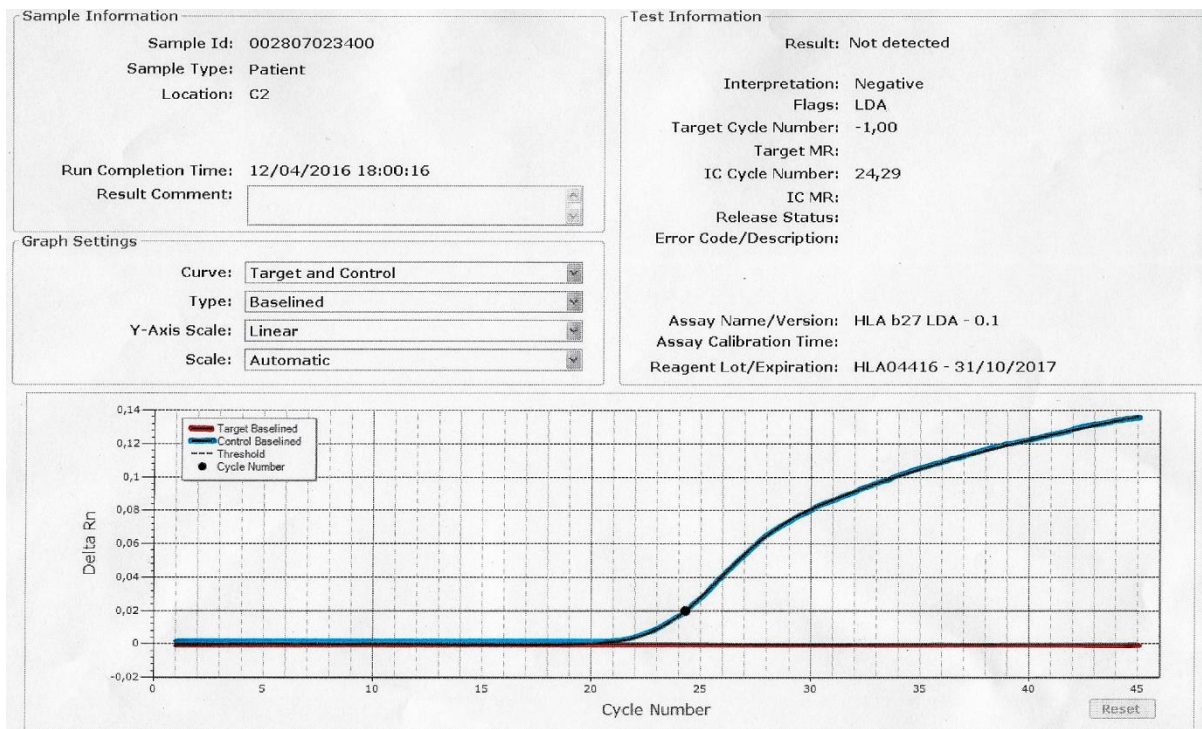
2.2.4 Procedure

De tubes met volbloed kunnen zonder voorbehandeling op m2000sp geplaatst worden. Per run wordt een negatieve en een positieve controle meegenomen. De negatieve controle is HLA-B27-negatief bloed, dat wordt afgenomen van medewerkers bij het CMA. Het bloed wordt in fracties ingevroren. Dit negatieve bloed doorloopt de hele PCR-reactie en moet na de detectie een HLA-B27-negatief resultaat geven. De positieve controle doorloopt de extractie niet. Deze wordt aan de PCR-plaat toegevoegd nadat de andere stalen de extractie hebben doorlopen. Alle stalen, inclusief de negatieve en positieve controle wordt gemengd met de mastermix. Hierna wordt de PCR-plaat overplakt met een folie en overgebracht naar de m2000rt voor amplificatie en detectie.

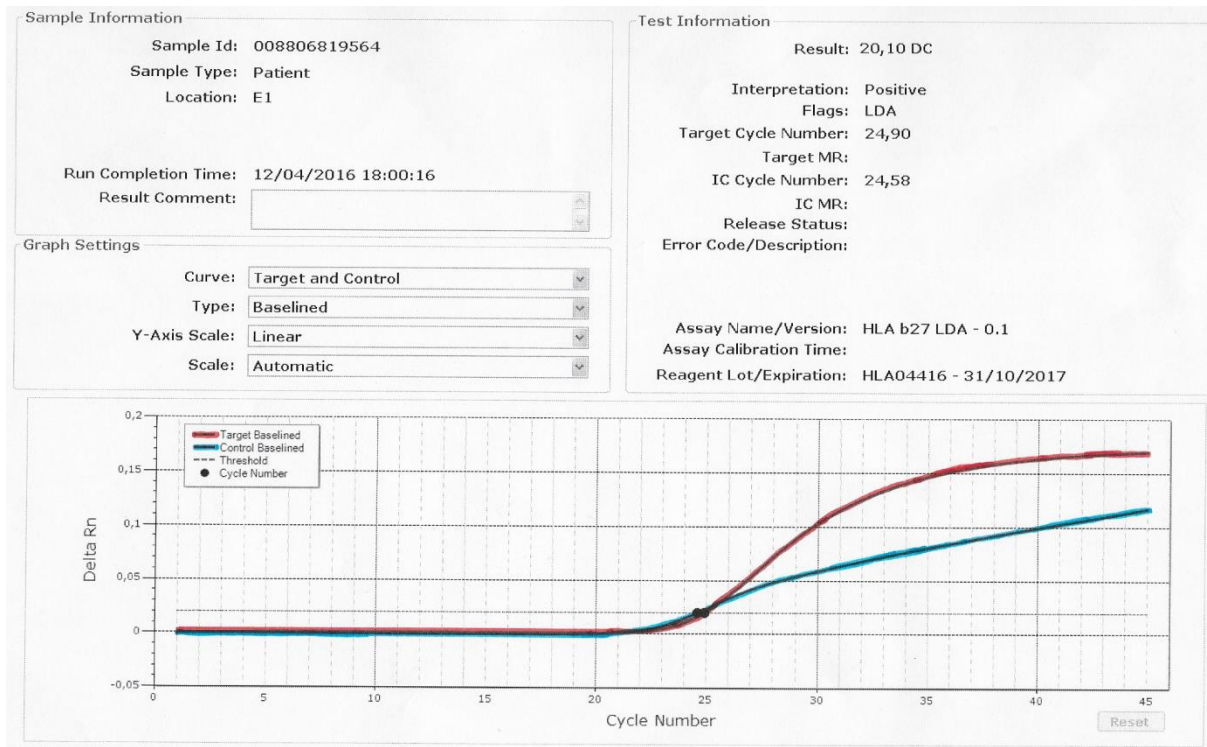
2.2.5 Voorbeeldrapporten

Er wordt voor elk staal een grafiek weergegeven met een curve van de interne controle (Synaptophysin-like 2 (SYPL2)) en een curve voor het HLA-B27-gen. De curve van de interne controle moet stijgen binnen de bepaalde grenswaarde van 20 en 26 om een representatief en betrouwbaar resultaat te hebben. Indien de curve van de interne controle niet opkomt of buiten de grenswaarde opkomt, kan besloten worden dat er iets in de PCR-reactie mislukt. In dit geval kan er geen uitspraak gedaan worden over deze PCR-reactie. Mogelijks zijn er inhibitoren aanwezig of is er een ander probleem.

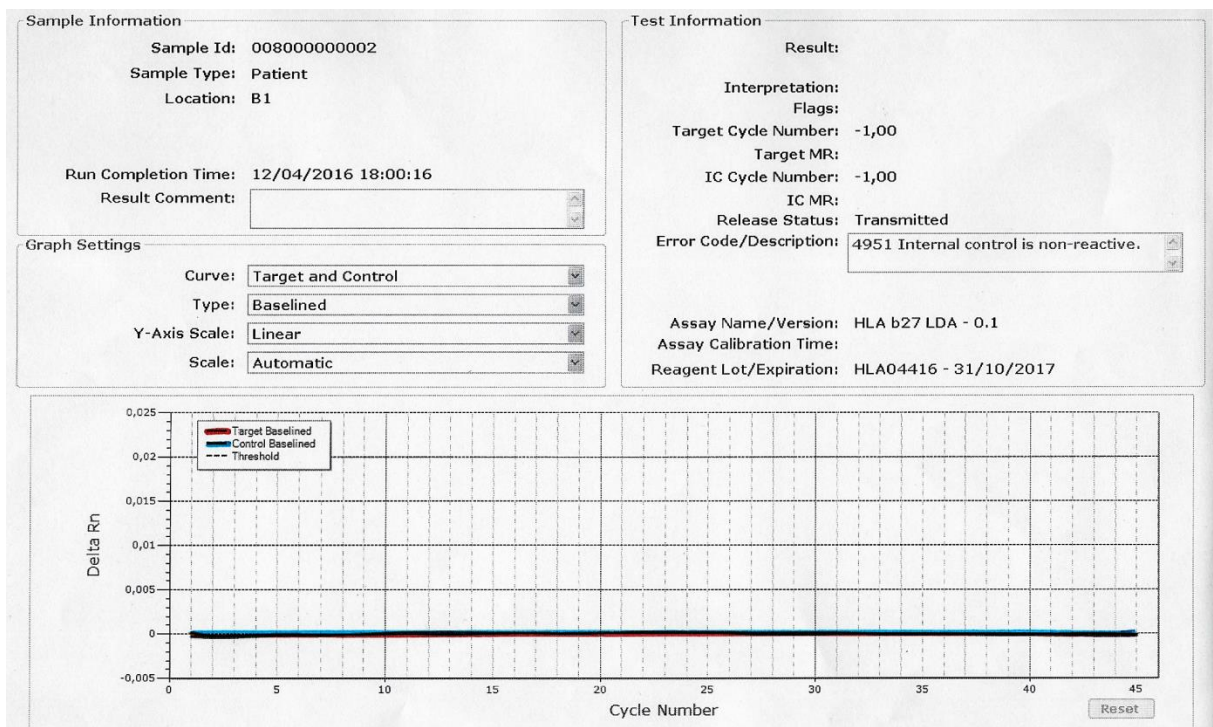
Als de curve van HLA-B27 niet opkomt, is de patiënt negatief. Als de curve opkomt, is de patiënt positief. Figuur 18 toont een negatief resultaat, figuur 19 een positief resultaat. Figuur 20 is een rapport waarbij beide curves niet zijn opgekomen. Dit is een resultaat dat niet kan worden gerapporteerd.



Figuur 18: HLA-B27-negatief resultaat
Noot: Uitgeprint rapport CMA



Figuur 19: HLA-B27-positief resultaat
 Noot: Uitgeprint rapport CMA



Figuur 20: Mislukt PCR-reactie
 Noot: Uitgeprint rapport CMA

3 VALIDATIE

Een validatie wordt uitgevoerd bij het invoeren van een nieuwe methode en verloopt volgens een bepaald, vooraf gedefinieerd patroon. De validatieprocedure onderzoekt prestatiekenmerken zoals juistheid, precisie en correlatie. Tijdens deze validatie worden beide methoden (flowcytometrie en PCR) ook vergeleken met elkaar.

Een validatieplan is een dossier dat een bepaald aantal aspecten bespreekt. Het dossier wordt voor en tijdens de validatieperiode ingevuld zodat er na deze periode een overzicht ter beschikking is van de voorbereidingen en de uitgevoerde acties.

Het plan beschrijft het soort validatie en wat er gevalideerd wordt. De motivatie en de keuze van de leverancier(s) worden toegelicht, de reagentia en controles worden opgelijst, de te volgen procedures worden uitgeschreven. In de risicoanalyse worden de risico's op fouten bekeken, met eventuele corrigerende maatregelen. Daarna worden de verschillende prestatiekenmerken onderzocht. Na het doorlopen van alle stappen worden de resultaten gerapporteerd in het validatierapport (Schoone, s.a.).

Het is niet altijd noodzakelijk om alle prestatiekenmerken te bepalen. Of een methode kwalitatieve of kwantitatieve resultaten geeft, kan al een reden zijn om enkele kenmerken niet te onderzoeken (Schoone, s.a.).

De HLA-B27-bepaling via flowcytometrie geeft een kwantitatief resultaat, wat uiteindelijk als kwalitatief resultaat wordt doorgegeven. De PCR-resultaten zijn eveneens kwantitatief, die als kwalitatief resultaat, positief of negatief, worden doorgegeven.

Bij een validatie worden meerdere stalen onderzocht: zowel stalen waarvan het resultaat bekomen werd via een andere methode, als externe referentiestalen. De resultaten, bekomen met de nieuwe methode, moeten overeenkomen met de gekende resultaten (Schoone, s.a.). In deze validatie wordt volbloed gebruikt van stalen waarbij de bepaling al werd uitgevoerd met flowcytometrie of met PCR in het Jessaziekenhuis in Hasselt. De resultaten van deze stalen zijn dus op voorhand gekend.

Dit hoofdstuk bevat het validatiedossier van de bepaling van HLA-B27 via PCR.

3.1 Inleiding

Het validatiedossier bevat de validatie van HLA-B27 op de toestellen van Abbott Molecular, namelijk m2000sp en m2000rt. Het gaat om een beperkte validatie, meer bepaald een implementatieverificatie. Een implementatieverificatie omvat de bepaling van de herhaalbaarheid, de reproduceerbaarheid en de juistheid.

3.2 Motivatie en leverancier

De reden voor de omschakeling van flowcytometrie naar PCR is dat de PCR-analyse accurater, minder arbeidsintensief en minder tijdrovend is. Tevens dienen er dan ook geen twijfelachtige resultaten meer doorgestuurd te worden. De toestellen, m2000sp en m2000rt, zijn reeds aanwezig in het laboratorium. De aankoop van nieuwe toestellen is dus niet van toepassing.

Elisabeth Pharmacon, verdeeld door Atrida, is de firma waarmee wordt samengewerkt. De reagentia voor de extractie worden geproduceerd door Abbott Molecular.

3.3 Reagentia

Voor de DNA-extractie wordt het toestel m2000sp gebruikt. Specifiek voor dit toestel, maar niet specifiek voor de bepaling, worden reagentia gebruikt om het DNA te extraheren. De reagentia van Abbott Molecular worden opgelijst in tabel 2. Na de extractie wordt het eluaat vermengd met mastermix. De mastermix is wel specifiek voor elke bepaling. Deze mastermix zit in de kit Elisabeth Pharmacon. Ook wordt tijdens elke run een negatieve en positieve controle meegenomen. De positieve controle zit als 'eluaat' in de kit. Als negatieve controle wordt een negatief staal van een medewerker van het CMA genomen, dat wordt meegenomen vanaf de extractie. De reagentia van Elisabeth Pharmacon worden weergegeven in tabel 3.

Tabel 2: Reagentia Abbott Molecular

	Naam reagentia	Lotnummer
Lysing buffer	mLysis _{DNA}	18937241
Magnetische Partikels	mMicropartikels _{DNA}	18928681
Wasoplossing 1	mWash1 _{DNA}	18918581
Wasoplossing 2	mWash2 _{DNA}	10920191
Elutiebuffer	mElutionBuffer _{DNA}	10878771

Tabel 3: Reagentia Elisabeth Pharmacon

	Naam reagentia	Lotnummer
Mastermix	HLA-B27 Mix	HLA04416
Positieve controle	PC DNA HLA-B27	HLAPC04316

3.4 Plan en criteria

Een implementatieverificatie van een kwalitatieve test vereist de bepaling van de precisie en de accuraatheid. De precisie is opgedeeld in de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid.

De herhaalbaarheid wordt nagegaan door een intra-run of within-run uit te voeren. Dit wordt bepaald op basis van de criteria opgelijst in de artikels van Rabenau en Raymaekers. Een negatief en positief staal worden in één run drie maal bepaald (Rabenau et al., 2007). Door eenzelfde staal in één run drie keer de procedure te laten doorlopen, wordt nagegaan hoe de resultaten eventueel beïnvloed worden onder dezelfde omstandigheden. De drie meetresultaten moeten overeenkomen.

De reproduceerbaarheid wordt nagegaan door een inter-run of between-run uit te voeren. Een positief en negatief staal worden in drie runs, op verschillende dagen, geanalyseerd om de invloed van wisselende omstandigheden na te gaan. Ook hier moeten de resultaten kwalitatief overeenkomen.

De accuraatheid of juistheid van de procedure wordt nagegaan met stalen waarvan het resultaat bekomen is volgens de procedure van een geaccrediteerd laboratorium, namelijk de PCR-procedure van het Jessaziekenhuis. Gekende controlestalen, zoals

EKE-stalen kunnen ook gebruikt worden. In theorie moeten drie low positieve stalen, drie high positieve stalen en drie negatieve stalen de bepaling doorlopen. De resultaten dienen overeen te stemmen met de waarden van de referentiemethode.

In figuur 21 is een overzicht te zien van hoe een implementatieverificatie verloopt. In het geval van de PCR-methode kan er geen low positief en high positief staal gebruikt worden. Er wordt enkel gewerkt met een negatief en een positief staal.

FDA/CE-IVD Peer review multicentre publications	
Precision (inter and intra run)	1 low positive sample, 1 high positive sample 3 replicates within 3 days. Preferentially from extraction.
Accuracy	3 low positive samples, 3 high positive samples, 3 negative samples. If applicable, when selecting the positive samples, the genetic diversity should be taken into account. Preferentially from extraction.
Linearity/ Measuring range/Limit of quantification	not necessary
Limit of detection/analytical sensitivity	not necessary
Analytical specificity	not necessary

Figuur 21: Overzicht implementatieverificatie

Noot: Raymaekers, M., Bakkus, M., Boone, E., de Rijke, B. El Housni, H., De Scheemaeker, P., e.a. (2011). Reflections and proposals to assure quality in molecular diagnostics. *Acta Clinica Belgica*, 66 (1).

3.5 Risicoanalyse

Een risicoanalyse wordt uitgevoerd om de risico's en fouten op te sporen. Omdat de toestellen van Abbott Molecular reeds in gebruik zijn, zijn de risico's gekend en is de risicoanalyse omtrent de toestellen beperkt. De risico's van de kit worden wel onderzocht. Het belangrijkste en uiterst te vermijden risico is carry-over. De positieve controle is een eluaat dat na extractie aan de PCR-plaat wordt toegevoegd. Om te voorkomen dat andere eluaten hiermee gecontamineerd worden, wordt er snel gewerkt en dit zonder over de plaat te bewegen. Nadat de positieve controle is toegevoegd, wordt de PCR-plaat zo snel mogelijk overplakt en overgezet op de m2000rt. Carry-over moet ten allen tijden vermeden worden om vals-positieve resultaten te voorkomen.

3.6 Herhaalbaarheid of within-run

De resultaten van de herhaalbaarheid zijn in tabel 4 af te lezen. De verwachte resultaten worden bekomen. Voor het negatieve staal wordt negen maal negatief bekomen, voor het positieve staal negen maal positief.

Tabel 4: Resultaten herhaalbaarheid

	Run 4	Run 5	Run 6
1000000001	Negatief	Negatief	Negatief
	Negatief	Negatief	Negatief
	Negatief	Negatief	Negatief
8806819564	Positief	Positief	Positief
	Positief	Positief	Positief
	Positief	Positief	Positief

3.7 Reproduceerbaarheid of between-run

In tabel 5 worden de resultaten van de reproduceerbaarheid weergegeven. Zowel voor het negatieve staal als het positieve staal worden de verwachte resultaten bekomen: voor het negatieve staal drie maal negatief, voor het positieve staal drie maal positief. In bijlage 1 zijn alle resultaten per run terug te vinden.

Tabel 5: Resultaten reproduceerbaarheid

	Run 4	Run 5	Run 6
1000000001	Negatief	Negatief	Negatief
8806819564	Positief	Positief	Positief

3.8 Accuraatheid of juistheid

Tabel 6 bevat de resultaten van de vergelijking tussen de PCR-resultaten van het Centrum voor Medische Analyse en het Jessaziekenhuis (gekende "controlestalen"). Voor alle stalen wordt eenzelfde resultaat bekomen, er zijn geen concordanties. In figuur 20 staat vermeld dat er slechts drie negatieve, drie low positieve en drie high positieve stalen getest moeten worden. In het CMA werden meer stalen geëvalueerd om een beter idee te verkrijgen van de waarde van de test op klinische stalen, daar er geen literatuur over deze test beschikbaar is.

Tabel 6: Vergelijking resultaten PCR HLA-B27 Atrida met PCR Jessaziekenhuis

Staal	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Target Cycle Number	Concordantie resultaten
403914978	n	n	n		OK
404228416	n	n	n		OK
806328335	p	p	p		OK
404185441	n	n	n		OK
700094223	p	p	p		OK
403914978	n	n	n		OK
404228416	n	n	n		OK
805761901	p	p	p	20,46	OK
805872657	p	p	p	21,58	OK
404421817	n	n	n		OK
806493369	n	n	n		OK
404044482	p	p	p	21,81	OK
805938473	n	n	n		OK
806737349	p	p	p	21,4	OK
404157005	n	n	n		OK
404176385	n	n	n		OK
806595204	n	n	n		OK
404100367	p	p	p	20,43	OK
404053197	n	n	n		OK
806559530	n	n	n		OK
404088353	p	p	p	21,89	OK
806212008	p	p	p	22,03	OK
403900996	n	n	n		OK
404185062	p	p	p	22,45	OK
806498646	p	p	p	21,6	OK
806346459	p	p	p	20,78	OK
806561667	n	n	n		OK
806561663	n	n	n		OK
2404423808	p	p	p		OK
8404274740	p	p	p		OK
2404379910	n	n	n		OK
2403932274	n	n	n		OK
1806530098	p	p	p	20,55	OK
2806666748	p	p	p	19,91	OK
3404449761	p	p	p	22,23	OK
4806300449	p	p	p	21,88	OK
8806847443	p	p	p	21,87	OK
4806362909	p	p	p	21,88	OK
2404446314	p	p	p	21,21	OK
2806666750	p	p	p	20,99	OK
2404044482	p	p	p	21,55	OK
2807007515	p	p	p	21,53	OK
8700059313	p	p	p	21,49	OK

Staal	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Target Cycle Number	Concordantie resultaten
2806606084	p	p	p	21,78	OK
2402984914	p	p	p	21,89	OK
2806705174	p	p	p	21,69	OK
6805786525	p	p	p	22,17	OK
				Gemiddelde	21,482
				Spreiding	19,91-22,45

Tabel 7 bevat de resultaten van de EKE-stalen.

Ook de resultaten van de EKE-stalen (UK Neqas) zijn correct. De rapporten van de EKE-stalen zijn terug te vinden in bijlage 2.

Tabel 7: Resultaten EKE-stalen

Staal	Resultaat 1	Resultaat 2	Resultaat 3	Verwachte resultaten	Concordantie resultaten
2807023400	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief	OK
2807023402	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief	OK
2807023403	Negatief	Negatief	Negatief	Negatief	OK
2807023404	Positief	Positief	Positief	Positief	OK

3.9 Correlatie

De correlatie of methodevergelijking gebeurt door de resultaten, bekomen via de "nieuwe methode", PCR, te vergelijken met de resultaten van de "oude methode", flowcytometrie. In tabel 8 zijn alle resultaten opgelijst. Er zijn geen discordanties waar te nemen, wat wijst op een goede correlatie.

Tabel 8: Vergelijking resultaten PCR HLA-B27 Atrida met flowcytometrie volgens BD en OL

Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Target Cycle Number	Concordantie resultaten
Negatieve patiënt 1	n	/	n	n		OK
Negatieve patiënt 2	n	/	n	n		OK
700094223	162	196	p	p	20,5	OK
806308855	169	407	p	p	21,89	OK
806035884	168	231	p	p	22,59	OK
805743523	164	274	p	p	21,92	OK
805872138	168	235	p	p	21,72	OK
806200328	165	300	p	p	23,03	OK
806379415	160	275	p	p	22,22	OK
805813980	162	/	p	p	22,93	OK
806034689	167	322	p	p	21,88	OK
806352929	168	337	p	p	21,69	OK
806466560	n	/	n	n		OK
404299153	n	/	n	n		OK

Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Target Cycle Number	Concordantie resultaten
805987472	167	441	p	p	21,12	OK
404269565	n	/	n	n		OK
404391026	n	/	n	n		OK
806428599	n	/	n	n		OK
806431409	n	/	n	n		OK
806290436	n	/	n	Non-reactieve IC		Te weinig staal voor tweede analyse
404329674	n	/	n	Non-reactieve IC		Te weinig staal voor tweede analyse
404384319	n	/	n	n		OK
Negatieve controle	n	/	n	n		OK
805838754	170	496	p	p	21,42	OK
806114758	162	276	p	p	22,8	OK
Positieve controle	/	/	p	p	45	OK
806545430	169	359	p	p	22,12	OK
806314704	163	407	p	p	20,53	OK
806362628	167	233	p	p	22,06	OK
806338257	171	332	p	p	21,74	OK
806378823	165	384	p	p	22,15	OK
806355297	167	337	p	p	21,14	OK
806282426	161	757	p	p	22,77	OK
805978154	167	378	p	p	21,21	OK
805741840	169	205	p	p	22,23	OK
806212713	165	244	p	p	21,34	OK
404086497	162	316	p	p	20,39	OK
806212138	173	429	p	p	21,96	OK
404219137	165	400	p	p	22,09	OK
805500152	n	/	n	n		OK
404687642	n	/	n	n		OK
404323107	n	/	n	n		OK
404323118	n	/	n	n		OK
805987507	n	/	n	n		OK
806800005	n	/	n	n		OK
404494684	n	/	n	n		OK
404358872	162	237	p	p	22,14	OK
404229795	165	302	p	p	21,81	OK
403208875	n	/	n	n		OK
404090950	168	349	p	p	22,92	OK
806363182	174	313	p	p	21,2	OK
806867746	172	183	p	p	22,4	OK

Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Target Cycle Number	Concordantie resultaten
404259346	165	231	p	p	21,75	OK
806625465	171	352	p	p	21,07	OK
806238129	166	292	p	p		OK
806413234	165	279	p	p	22,8	OK
Positief staal	/	/	p	p		OK
Positief staal	/	/	p	p		OK
Positief staal	/	/	p	p		OK
Positief staal	156	/	p	p	19,76	OK
Positief staal	156	/	p	p	19,85	OK
Positief staal	156	/	p	p	19,8	OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
Negatieve controle	/	/	n	n		OK
Positieve controle	/	/	p	p	45	OK
Negatieve controle	/	/	n	n		OK
Positieve controle	/	/	p	p	45	OK
Negatieve controle	/	/	n	n		OK
Fysiologisch water	/	/	Geen resultaat	Non-reactieve IC		OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
Positieve controle	/	/	p	p		OK
2807023400 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023400 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023400 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023402 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023402 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023402 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023403 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023403 (EKE)	/	/	n	n		OK

Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Target Cycle Number	Concordantie resultaten
2807023403 (EKE)	/	/	n	n		OK
2807023404 (EKE)	/	/	p	p		OK
2807023404 (EKE)	/	/	p	p		OK
2807023404 (EKE)	/	/	p	p		OK
Positief staal	156	/	p	p	19,51	OK
Positief staal	156	/	p	p	19,8	OK
Positief staal	156	/	p	p	19,15	OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
Negatief staal	/	/	n	n		OK
					Gemiddelde	23,172
					Spreiding	19 - 45

3.10 Besluit van het validatierapport

De PCR test voldoet aan de vooropgestelde criteria, met als gevolg dat deze test in routine gebruikt kan worden. Alle onderzochte parameters werden bepaald. Er werden geen discordanties waargenomen.

BESLUIT

In dit eindwerk wordt de validatie van de bepaling van HLA-B27 via PCR uitgewerkt. Het validatiedossier bestaat uit de nodige voorbereidingen, samen met de resultaten die de validatie als geslaagd of niet geslaagd bestempelen. De herhaalbaarheid, de reproduceerbaarheid, de juistheid en de correlatie worden weergegeven in het validatiedossier.

Bij het testen van de within-run en de between-run werden telkens concordante resultaten gevonden. De herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid voldoen aan de vooropgestelde criteria.

De resultaten van de juistheid komen steeds overeen met het te verwachten resultaat. Ook hier is geen enkele disconcordantie waar te nemen. De resultaten komen bij elk staal overeen. De juistheid wordt ook getest door Externe Kwaliteit Evaluaties. Ook hier komen de resultaten via PCR overeen met de meegedeelde resultaten van de EKE-stalen. Net als de voorgaande prestatiekenmerken kan ook de juistheid als goed beoordeeld worden. Dit prestatiekenmerk voldoet aan de vooropgestelde criteria.

Als laatste wordt de correlatie bepaald door opnieuw resultaten, bekomen via PCR in het Centrum voor Medische Analyse, te vergelijken met gekende resultaten, bekomen via een andere methode, namelijk flowcytometrie. De correlatie tussen beide methoden is goed, omdat er geen enkele discordantie kan worden waargenomen.

Er wordt aan alle vereisten van het validatieplan voldaan. We kunnen dus besluiten dat deze test geschikt is om in routine de HLA-B27-bepaling uit te voeren.

BIJLAGEN

Bijlage 1: Overzicht resultaten van de validatie, onderverdeeld in runs

RUN 1						
Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
403914978	141	57	n	n	n	OK
806238129	166	292	/	p	p	OK
404228416	150	/	n	n	n	OK
806328335	166	215	p	p	p	OK
404185441	150	/	n	n	n	OK
700094223	162	196	p	p	p	OK

RUN 2						
Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
AD	/	/	/	Geen resultaat	Geen reactie	OK
Gilberte	n	/	/	n	n	OK
Kathleen	n	/	/	n	n	OK
403914978	141	57	n	n	n	OK
700094223	162	196	/	p	p	OK
404228416	150	/	n	n	n	OK
806308855	169	407	/	p	p	OK
806035884	168	231	/	p	p	OK
805761901	159	/	p	p	p	OK
805743523	164	274	/	p	p	OK
805872138	168	235	/	p	p	OK
805872657	157	/	p	p	p	OK
404421817	/	/	n	n	n	OK
806493369	145	44	n	n	n	OK
404044482	163	171	p	p	p	OK
806200328	165	300	/	p	p	OK
806379415	160	275	/	p	p	OK
805938473	94	/	n	n	n	OK
805813980	162	/	/	p	p	OK
806034689	167	322	/	p	p	OK
806737349	160	/	p	p	p	OK
404157005	/	/	n	n	n	OK
404176385	/	/	n	n	n	OK
806352929	168	337	/	p	p	OK
806466560	n	/	/	n	n	OK
404450123	175	/	/	p	p	OK

Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
404299153	n	/	/	n	n	OK
805987472	167	441	/	p	p	OK
404269565	n	/	/	n	n	OK
404391026	n	/	/	n	n	OK
806428599	n	/	/	n	n	OK
806431409	n	/	/	n	n	OK
806290436	n	/	/	n	Non-reactieve IC	Te weinig staal voor tweede analyse
404329674	n	/	/	n	Non-reactieve IC	Te weinig staal voor tweede analyse
404384319	n	/	/	n	n	OK
805838754	170	496	/	p	p	OK
806114758	162	276	/	p	p	OK
Negatieve controle	n	/	/	n	n	OK
Positieve controle	/	/	/	p	p	OK

RUN 3						
Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
Negatieve controle	/	/	/	n	n	OK
806595204	/	/	n	n	n	OK
404100367	158	/	p	p	p	OK
404053197	/	/	n	n	n	OK
806559530	142	42	n	n	n	OK
404088353	159	/	p	p	p	OK
806212008	156	/	p	p	p	OK
403900996	Geen resultaat	/	n	n	n	OK
404185062	158	/	p	p	p	OK
806545430	169	359	/	p	p	OK
806314704	163	407	/	p	p	OK
806362628	167	233	/	p	p	OK
806338257	171	332	/	p	p	OK
806378823	165	384	/	p	p	OK
806355297	167	337	/	p	p	OK
806282426	161	757	/	p	p	OK
805978154	167	378	/	p	p	OK
805741840	169	205	/	p	p	OK
806212713	165	244	/	p	p	OK

Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
806224533	174	/	/	p	p	OK
404086497	162	316	/	p	p	OK
806212138	173	429	/	p	p	OK
404219137	165	400	/	p	p	OK
806498646	158	/	p	p	p	OK
806346459	167	248	p	p	p	OK
806561667	145	77	n	n	n	OK
806561663	154	/	n	n	n	OK
806530000	163	/	/	n	n	OK
805500152	n	/	/	n	n	OK
404687642	n	/	/	n	n	OK
404323107	n	/	/	n	n	OK
404323118	n	/	/	n	n	OK
805987507	n	/	/	n	n	OK
806800005	n	/	/	n	n	OK
404494684	n	/	/	n	n	OK
404358872	162	237	/	p	p	OK
404229795	165	302	/	p	p	OK
403208875	n	/	/	n	n	OK
404090950	168	349	/	p	p	OK
804299123	178	/	/	p	p	OK
806363182	174	313	/	p	p	OK
806867746	172	183	/	p	p	OK
404259346	165	231	/	p	p	OK
806625465	171	352	/	p	p	OK
806413234	165	279	/	P	p	OK

RUN 4					
Staal	Becton & Dickinson	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
100000001 (negatieve controle)	/	/	n	n	OK
800000002 (fysiologisch water)	/	/	Geen resultaat	Non-reactieve IC	OK
2404423808	157	p	p	p	OK
8404274740	157	p	p	p	OK
2404379910	151	n	n	n	OK
2403932274	/	n	n	n	OK
8806819564 (positief staal)	156	p	p	p	OK
8806819564 (positief staal)	156	p	p	p	OK

Staal	Becton & Dickinson	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
8806819564 (positief staal)	156	p	p	p	OK
1000000001 (negatief staal)	/	/	n	n	OK
1000000001 (negatief staal)	/	/	n	n	OK
Positieve controle	/	/	p	p	OK
2807023400 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023400 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023400 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023402 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023402 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023402 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023403 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023403 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023403 (EKE negatief staal)	/	/	n	n	OK
2807023404 (EKE positief staal)	/	/	p	p	OK
2807023404 (EKE positief staal)	/	/	p	p	OK
2807023404 (EKE positief staal)	/	/	p	p	OK

RUN 5						
Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
1000000001 (negatief staal)	/	/	/	n	n	OK
1000000001 (negatief staal)	/	/	/	n	n	OK
1000000001 (negatief staal)	/	/	/	n	n	OK
8806819564 (positief staal)	156	/	p	p	p	OK
8806819564 (positief staal)	156	/	p	p	p	OK
8806819564 (positief staal)	156	/	p	p	p	OK
1806530098	162	/	p	p	p	OK
2806666748	174	135	p	p	p	OK
3404449761	159	97	p	p	p	OK

Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
4806300449	166	175	p	p	p	OK
8806847443	164	190	p	p	p	OK
4806362909	159	/	p	p	p	OK
2404446314	160	181	p	p	p	OK
2806666750	161	187	p	p	p	OK
Negatieve controle	/	/	/	n	n	OK
Positieve controle	/	/	/	p	p	OK

RUN 6						
Staal	Becton & Dickinson	One Lambda	PCR Jessa	Verwachte resultaten	PCR HLA-B27 Atrida	Concordantie resultaten
1000000001 (negatief staal)	/	/	/	n	n	OK
1000000001 (negatief staal)	/	/	/	n	n	OK
1000000001 (negatief staal)	/	/	/	n	n	OK
8806819564 (positief staal)	156	/	p	p	p	OK
8806819564 (positief staal)	156	/	p	p	p	OK
8806819564 (positief staal)	156	/	p	p	p	OK
2404044482	163	171	p	p	p	OK
2807007515	162	89	p	p	p	OK
8700059313	165	98	p	p	p	OK
2806606084	156	/	p	p	p	OK
2402984914	159	/	p	p	p	OK
2806705174	166	141	p	p	p	OK
6805786525	161	143	p	p	p	OK
Negatieve controle	/	/	/	n	n	OK
Positieve controle	/	/	/	p	p	OK

UK NEQAS

International Quality Expertise

Histocompatibility & Immunogenetics

UK NEQAS FOR H&I HLA-B27 TESTING

HLA-B27 TYPING RESULTS OF SAMPLES B27 01/2016
DESPATCHED ON 08 March 2016

Donor HLA type B27 01/2016 A24, A26, B8, B1, Cw7, Cw7.5, DR1.1, DR1.3, DQB, DQ7
Donor HLA type B27 02/2016 A24, A1, B7, B8, Cw7, Cw8, DR1.1, DR1.3, DQB, DQ7
Donor HLA type B27 03/2016 A24, A1, B7, B8, Cw7, Cw8, DR1.1, DR1.3, DQB, DQ7
Donor HLA type B27 04/2016 A2, A1, B27, B48, Cw4, Cw6, DR1.1, DR1.7, DQB, DQ7

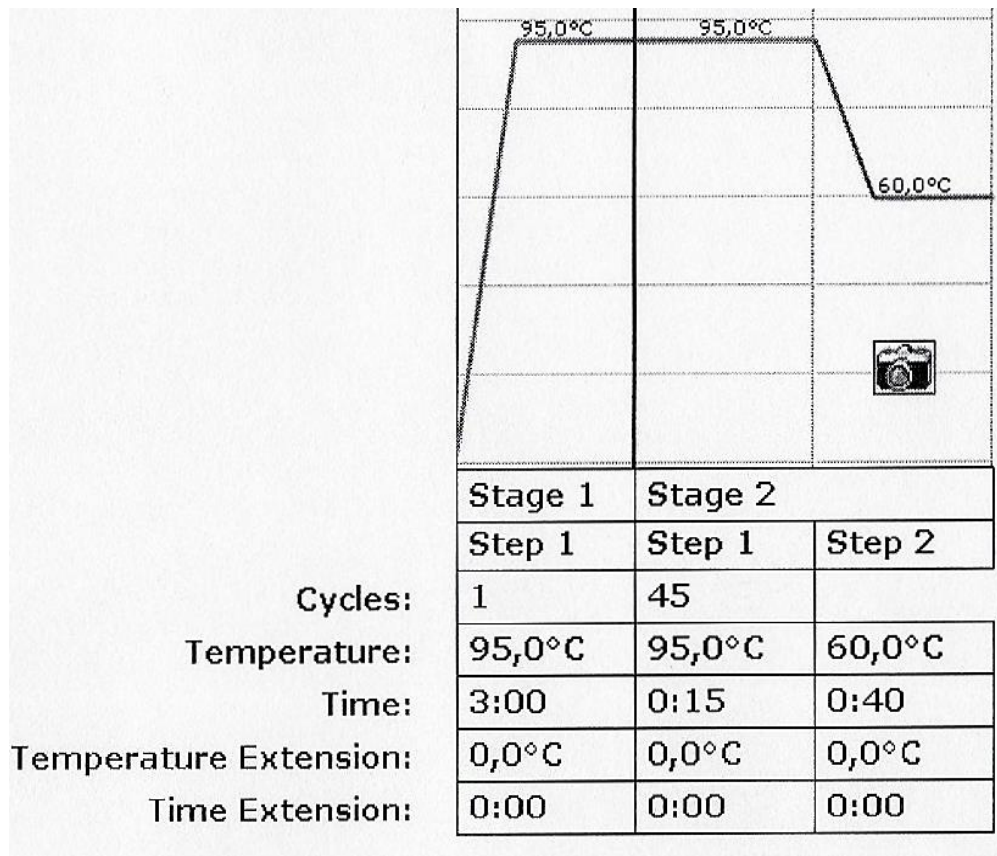
Summary of Results

	B27 01/2016	B27 02/2016	B27 03/2016	B27 04/2016
Total tested	28	28	29	28
Positive	28	28	29	28
Negative	0	0	0	0
NT/Non-call	0	0	0	0
% Positive	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
% Negative	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Lab No	Result	Result	Result	Result	Date received	Date tested	Method	Source of positive control cells used (if applicable)	Primers and Probes	PCR-SSP	Detection system	High Resolution Typing HLA-B*27 alleles	Comments
	B27 01/2016	B27 02/2016	B27 03/2016	B27 04/2016									
1301	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence	B27 01/2016 B27 02/2016 B27 03/2016 B27 04/2016	
1302	Negative	Equivocal	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1304	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1305	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1307	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1308	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	11-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1309	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	11-Mar	Flow Cytometry	- mouse IgG2b FITC (One Lambda) + FITC (One Lambda) + FITC (One Lambda) + FITC (One Lambda) + FITC (One Lambda)		PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1310	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	11-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1312	Negative	Negative	Negative	Positive	11-Mar	11-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1315	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1316	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1318	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1320	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	Flow Cytometry	Musca H22B, Isogam control (BD), HLA Class I positive control (One Lambda)		PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1321	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	15-Mar	Flow Cytometry	In-house	Own design	PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1323	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	14-Mar	Flow Cytometry		Own design	PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1325	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	14-Mar	Flow Cytometry	Blood of technician (positive for HLA-B27) with new lot of antibodies, In-house	Own design	PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1327	Negative	Negative	Negative	Positive	15-Mar	17-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1328	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	14-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1329	Negative	Equivocal	Negative	Positive	14-Mar	14-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1330	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	18-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1331	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	14-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1332	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	14-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1334	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	14-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1335	Negative	Negative	Negative	Positive	11-Mar	11-Mar	Flow Cytometry	Exco Life Sciences	Own design	PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1336	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	16-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1337	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	16-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1338	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	16-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1339	Negative	Negative	Negative	Positive	14-Mar	17-Mar	Flow Cytometry			PCR-SSP	Fluorescence (RT-PCR)		
1341	Negative	Negative	Negative	Positive	10-Mar	10-Mar	PCR-SSP		All Set Gold SSP HLA B27 Low Res Kit 48 test - Eligens Sprints HLA-B27	PCR-SSP	Fluorescence		Sample received on 19/03/2016 - no result for samples 01, 02, 04, 04/2016. Sample 03/2016 result not reliable

UK NEQAS for H&I is provided from the Welsh Blood Services, a division of Yelligda NHS Trust
Confidential report, no data may be published without permission from UKNEQAS for H&I

Effective Date 14/03/16



Bijlage 3: Temperatuurprofiel PCR

LITERATUURLIJST

Abbott Molecular Inc. (2014). *m2000sp: Operation Manual*. Onuitgegeven nota's van manual van m2000sp, Centrum voor Medische Analyse te Herentals.

Becton & Dickinson (s.a.). *Introduction to Flow Cytometry*. Onuitgegeven cd-rom, Centrum voor Medische Analyse in Herentals, Afdeling Hematologie.

Becton and Dickinson (s.a.). *Introduction to Flow Cytometry*. Onuitgegeven PowerPoint-presentatie behorende bij 'Basic Operator Training FACSCalibur', Centrum voor Medische Analyse in Herentals, Afdeling Hematologie.

Becton, Dickinson and Company (2007). *BD FACSCalibur Instructions For Use*.

Becton, Dickinson and Company (2015). *BD™ HLA-B27 Kit: Catalog No. 340183*.

Berkow, R. (2000). *Merck Manual Medische Handboek*. Houten: Bohn Stafleu van Loghum, onderdeel van Springer. Gevonden op 7 maart 2016 op het internet: <http://merckmanual.nl/mmhenl/sec16/ch183/ch183c.html>

Berkow, R. (2000). *Merck Manual Medische Handboek*. New York: Bohn Stafleu van Loghum. Gevonden op 7 maart 2016 op het internet: <http://www.merckmanual.nl/mmhenl/print/sec16/ch183/ch183a.html>

Bracke, M. (s.a.). Onuitgegeven nota's, Centrum voor Medische Analyse in Herentals, Afdeling Hematologie.

Clark, B.R., Sharma, S.D., & Lerch, L.B. (1990). MHC-mediated toxic conjugates useful in ameliorating autoimmunity. Gevonden op 4 maart op het internet: <http://www.google.com/patents/US5284935>

Elisabeth Pharmacon (s.a.). *Eligene® Spondylitis HLA-B27 RT*. Bijsluiter bij kit, Centrum voor Medische Analyse in Herentals, Afdeling PCR.

Genetics Home Reference. (2016). Gevonden op 3 maart 2016 op het internet: <https://ghr.nlm.nih.gov/geneFamily/hla>

Gevonden op 12 mei 2016 op het internet: http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/166/833/RUG01-002166833_2014_0001_AC.pdf

Gevonden op 29 april 2016 op het internet: <https://www.abbottmolecular.com/products/m2000-realtimesystem.html#TechnicalSpecifications>

Gevonden op 3 mei 2016 op het internet: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/sacroiliitis/symptoms-causes/dxc-20166359>

Gevonden op 3 mei 2016 op het internet: http://www.sanquin.nl/repository/documenten/nl/onderwijs/bloed-en-afweer/HLA-typing_en_HLA-geassocieerde_aandoeningen.pdf

Gevonden op 4 mei 2016 op het internet: <http://www.braille.be/nl>

Gevonden op 4 mei 2016 op het internet: <http://www.reumaliga.be/vrlireit.htm>

Gevonden op 8 maart 2016 op het internet: http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch43/cytotoxic_t.html

Gevonden op 8 maart 2016 op het internet: <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/cell-type/natural-killer-t-cells/granzymes.htm>

Gevonden op 8 maart 2016 op het internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3106>

Het HLA-systeem: de relatie tussen HLA en bloedtransfusie. (s.a.). Gevonden op 3 maart 2016 op het internet: <http://www.sanquin.nl/repository/documenten/nl/onderwijs/bloed-en-afweer/HLA-systeem.pdf>

Martini, F.H., & Bartholomew, E.F. (2012). *Anatomie en fysiologie: Een inleiding*. Amsterdam: Pearson.

Mungall, A.J., Palmer, S.A., Sims, S.K., Edwards, C.A., Ashurst, J.L., Wilming, L., e.a. (2003). The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*, 425 (6960). Gevonden op 4 maart 2016 op het internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574404>

One Lambda, Inc. (2004). *HLA-B27 Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Conjugated Monoclonal Antibody: Catalog #B27F50X*.

Ontwikkeling en validatie van PCR-methoden voor de detectie van Brassica nigra en Brassica juncea (2013). Gevonden op 12 mei 2016 op het internet: http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/166/833/RUG01-002166833_2014_0001_AC.pdf

Prohaska, E. (1984). Isolated sacroiliitis as monosymptomatic form of ankylosing spondylitis - a possible cause of chronic back pain. *Clinical rheumatology*, 3 (1).

Rabenau, H.F., Kessler, H.H., Kortenbusch, M., Steinhorst, A., Raggam, R.B., Berger, A. (2007). Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *Journal of Clinical Virology*, 40 (2007).

Raymaekers, M., Bakkus, M., Boone, E., de Rijke, B. El Housni, H., De Scheemaeker, P., e.a. (2011). Reflections and proposals to assure quality in molecular diagnostics. *Acta Clinica Belgica*, 66 (1).

Rijkers, G.T., Kroese, F.G.M., Kallenberg, C.G.M., & Derksen, R.H.W.M. (2009). *Immunologie*. Houten: Bohn Stafleu van Loghum, onderdeel van Springer. Gevonden op 9 maart 2016 op het internet: <https://books.google.be/books?id=YDiLNBtSxgEC&pg=PA352&lpg=PA352&dq=overerving+HLA&source=bl&ots=4z0vITL6uh&sig=nGuizWQmlrmKwqbLsFv62oqJKxI&hl=nl&sa=X&ved=0ahUKEwi6x8PS3bPLAhWHYQ4KHahbDbYQ6AEISzAJ#v=onepage&q=overerving%20HLA&f=false>

Schoone, K. (s.a.). *Statistiek: Statistiek*. Onuitgegeven nota's bij een cursus voor het tweede jaar van de opleiding Biomedische Laboratoriumtechnologie, Thomas More Geel.

Stehouwer, C.D.A, Koopmans, R.P., van der Meer, J. (2010). *Interne geneeskunde*. Houten: Bohn Stafleu van Loghum, onderdeel van Springer. Gevonden op 8 maart 2016 op het internet: <https://books.google.be/books?id=HBiLVgJzOn4C&pg=PA110&lpg=PA110&dq=klasse+1+mhc&source=bl&ots=HNvVp6aGG-&sig=2FAImcm7ZDpZTe4R-TVBh4yVnlo&hl=nl&sa=X&ved=0ahUKEwjQz4Pc1K7LahXhKJoKHbUPCbgQ6AEISDAK#v=onepage&q=klasse%201%20mhc&f=false>

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2013). *Microbiology: An Introduction*. United States of America: Pearson Education, Inc.

Van Der Linden, J.M.J.P, & Schreuder, I. (1977). HLA-B27 en reumatische ziekten. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 121 (36), 1395-1399. Gevonden op het internet: <https://www.ntvg.nl/system/files/publications/1977113940001a.pdf>