

HLA-B1502 RealFast™ Assay

REF 7-630 / 7-633 Σ 100 / 32 reactions
-20°C 2-8°C CE IVD



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

1. Intended Use

The HLA-B1502 RealFast™ Assay is a fast and accurate real-time PCR test for detection of the HLA-B1502 allele, a specific variant of the *human leukocyte antigen B (HLA-B)* gene that is strongly associated with carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions. The kit is designed for genetic risk stratification of patients prior to initiation of carbamazepine therapy. HLA-B1502 positive patients must be excluded from carbamazepine treatment. The qualitative assay discriminates the presence or absence of HLA-B1502 in a human genomic DNA extract.

Reference sequence: NG_023187.1

2. Introduction

Carbamazepine is an anticonvulsant and mood-stabilizing drug commonly prescribed for multiple indications such as epilepsy, bipolar disorder, trigeminal neuralgia and chronic pain. In approximately 5% to 10% of individuals this medication can cause hypersensitivity reactions, of which Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) are among the most severe complications. Although rare, SJS/TEN is responsible for a mortality rate as high as 50%, with fever, malaise and rapidly developing mucocutaneous blistering reactions as clinical manifestations. More extensive skin detachment and higher death rates have been observed in TEN. Numerous studies describe the strong association of the HLA-B1502 allele with carbamazepine-induced SJS/TEN in many Asian populations, where the prevalence of HLA-B1502 can be up to 15% or more in parts of China, Thailand, Malaysia, Indonesia, the Philippines and Taiwan. South Asians have an intermediate prevalence of HLA-B1502, whereas in Japan and Korea the allele is rare (<1%). Prospective HLA-B1502 screening of patients from at-risk populations therefore significantly reduces the incidence of hypersensitivity reactions due to carbamazepine.

3. Kit Contents

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 vial	□ white cap	1000 / 320 µl
HLA-B1502 Assay Mix	1 vial	■ purple cap	550 / 550 µl
HLA-B1502 Positive Control	1 vial	■ green cap	75 / 75 µl
HLA-B1502 Negative Control	1 vial	■ red cap	75 / 75 µl

The RealFast™ 2x Genotyping Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The HLA-B1502 Assay Mix consists of gene-specific primers and dual-labeled hydrolysis probes for *HLA-B1502* and a control gene.

A positive and a negative control for HLA-B1502 are supplied with the kit.

The kit contains reagents for 100 / 32 reactions in a final volume of 20 µl each.

4. Storage and Stability

HLA-B1502 RealFast™ Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -20°C. Alternatively, store at 2 to 8°C for short-term use within one month. The kit withstands up to 20 freeze/thaw cycles with no loss of activity. Avoid prolonged exposure to intense light. If stored correctly, the kit will retain full activity until the expiration date indicated on the label.

5. Product Description

5.1. Principle of the Test

The test is based on the fluorogenic 5' nuclease assay, also known as TaqMan® assay. Each reaction contains gene-specific primer pairs which amplify a 137 bp fragment of the HLA-B1502 gene and a 119 bp fragment of a control gene, the latter serving as PCR control. Further components are two dual-labeled, gene-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequence of the corresponding fragment. The proximity of the 5'-fluorescent reporter and 3'-quencher dye on intact probes prevents the reporter from fluorescing. During the extension phase of PCR the 5' – 3' exonuclease activity of the Taq DNA polymerase cleaves the 5'-fluorescent reporter from the hybridized probe. The physical separation of the fluorophore from the quencher dye generates a fluorescent signal in real-time, which is proportional to the accumulated PCR product.

In samples positive for HLA-B1502 both, the **FAM-labeled HLA-B1502** probe as well as the **HEX-labeled PCR control** probe bind to the appropriate gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the FAM channel (520nm) and in the HEX channel (556nm). In samples negative for HLA-B1502 only the HEX-labeled PCR control probe hybridizes to the complementary strand of the control gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the HEX channel and no or only a baseline signal in the FAM channel.

5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The HLA-B1502 RealFast™ Assay is validated for use with the AB 7500 Fast instrument.

The kit is compatible with various common real-time PCR instruments capable of recording FAM and HEX fluorescence:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Note:** RealFast™ Variant Detection QuickGuides for setting up and analyzing experiments on different types of instruments can be downloaded from www.viennalab.com.

When using AB StepOne™, set passive reference dye to "ROX!"

The kit is supplied **without ROX**. For use with real-time PCR instruments requiring high ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments StepOne™, 7300, 7900/7900HT), add ROX at a final concentration of 1 µM to the 2x Genotyping Mix.

5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 58 alleles testing positive for the HLA-B1502 allele with Sanger sequencing and a CE-marked reference kit. The HLA-B1502 RealFast™ Assay determined all 58 alleles as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 45 alleles testing negative for the HLA-B1502 allele with Sanger sequencing and a CE-marked reference kit. The HLA-B1502 RealFast™ Assay determined all 45 alleles as negative, which equaled a true negative rate of 100%.

Limit of detection: 2.5 ng genomic DNA (per reaction).

Recommended DNA concentration: 2 to 20 ng/µl genomic DNA.

6. Materials Required but not Supplied

Real-time PCR instrument with FAM (520 nm) and HEX (556 nm) filters, instrument-compatible reaction vessels, disposable powder-free gloves, vortexer, mini-centrifuge for 2.0 ml tubes, tube racks, set of calibrated micropipettes (0.5 – 1000 µl), sterile tips with aerosol-barrier filter, molecular grade water, DNA extraction system, freezer, biohazard waste container.

7. Experimental Protocol

7.1. DNA Extraction

DNA extraction reagents are **not supplied** with the kit.

DNA isolated from various specimens (e.g. whole peripheral blood, dried blood spots, buccal swabs or saliva) can be used. Ensure extracted DNA is suitable for amplification in terms of concentration, purity and integrity.

For accurate genotype calling, the DNA amount per reaction should be within the range of 10 to 100 ng for all samples.

7.2. PCR Controls

Always include a **No Template Control (NTC)** in each experiment to confirm absence of potential contamination. It is advisable to run the NTC (use PCR-grade water instead of DNA) in duplicate.

Always include the HLA-B1502 **Positive Control** as positive reference signal for your unknown samples and the HLA-B1502 **Negative Control** as negative reference signal for threshold setting in the FAM channel.

» **Note:** The Controls are potential sources of contamination. Make sure to handle them carefully. «

7.3. Preparation of HLA-B1502 RealFast™ Master Mix:

Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing. Set up PCR at room temperature. Prepare sufficient **Master Mix** for all your reactions (N samples + positive control + negative controls) plus at least one additional reaction to compensate for pipetting inaccuracies:

Component	per reaction	e.g. 24+1 reactions
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B1502 Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Dispense **15 µl Master Mix** into each well. Add **5 µl purified DNA or Control** template to reach a final reaction volume of 20 µl.

To minimize risk of contamination, always pipette templates in the following order: first NTC, then samples, last controls. Immediately close reaction vessels.

» **Note:** Avoid creating bubbles in the final reaction mix and avoid touching the optical surface of the cap or sealing film without gloves. Both may interfere with fluorescence measurements. Centrifuge briefly if needed. «

7.4. PCR Program

Program the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions for quantitation experiments with two targets / reporter dyes. Place the samples into the thermal cycler and run the following program:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480
and **other Peltier heating block-based instruments:**

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Data acquisition on FAM and HEX channel

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension – Data acquisition on Green and Yellow channel

8. Data Analysis / Interpretation of Results

The presence or absence of the HLA-B1502 allele is defined by whether there is a signal in the **FAM channel** or not. Successful PCR can be verified by amplification of the control gene detected in the **HEX channel** (PCR control). Thus, genomic DNA samples positive for HLA-B1502 as well as the HLA-B1502 Positive Control show amplification in both, the HEX and FAM channel. HLA-B1502 negative samples and the HLA-B1502 Negative Control show amplification in the HEX channel only. Fluorescent levels and corresponding amplification curves are automatically displayed in amplification plots in the real-time PCR software.

Sample Type	Amplification in FAM channel (520 nm)	Amplification in HEX channel (556 nm)
HLA-B1502 positive	YES	YES
HLA-B1502 negative	NO	YES
HLA-B1502 Positive Control	YES	YES
HLA-B1502 Negative Control	NO	YES
NTC	NO	NO

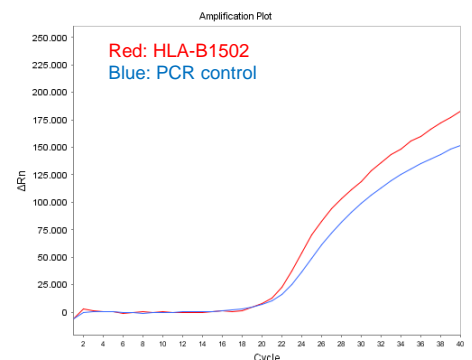
Some instrument software may need manual threshold settings for accurate analysis.

Recommendations for Threshold Settings (C_q):

Set threshold value for the FAM channel just above the background fluorescent signal generated by the HLA-B1502 Negative Control.

Samples crossing the threshold line beyond C_q 37 give invalid results and must be repeated.

To analyze acquired data, please follow your instrument software instructions.



9. Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostics use only.
- Always use disposable powder-free gloves and wear suitable lab coat when handling specimens and reagents.
- Perform reaction setup in an area separate from nucleic acid preparation and PCR product analysis.
- Use pipettes dedicated for PCR setup only, use aerosol-guarded pipette tips.
- Use instrument-compatible reaction vessels with optically clear caps or sealers.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use expired kits or kit components.

HLA-B1502 RealFast™ Assay

REF 7-630 / 7-633 100 / 32 Reaktionen

-20°C 2-8°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Verwendungszweck

Der HLA-B1502 RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion des HLA-B1502 Allels, eine Variante des *humanen Leukozytenantigen B (HLA-B)* Gen, welches stark mit einer Überempfindlichkeit auf Carbamazepin assoziiert ist. Der Kit wird vor Therapiebeginn mit Carbamazepin zur Identifizierung von HLA-B1502 positiven Patienten eingesetzt. Träger dieser Variante sollen von einer Carbamazepin Medikation ausgeschlossen werden. Der qualitative Test unterscheidet zwischen Vorhandensein oder Fehlen des HLA-B1502 Allels in einem humanen DNA-Extrakt.

Referenzsequenz: NG_023187.1

2. Einleitung

Carbamazepin ist ein antikonvulsives und stimmungsstabilisierendes Medikament, das für mehrere Indikationen wie Epilepsie, bipolare Störung, Trigeminusneuralgie und chronische Schmerzen verschrieben wird. Bei etwa 5% bis 10% der Patienten kann dieses Medikament Überempfindlichkeitsreaktionen verursachen, von denen das Stevens-Johnson-Syndrom (SJS) und die toxische epidermale Nekrolyse (TEN) zu den schwerwiegendsten Komplikationen gehören. Obwohl selten, ist SJS / TEN für eine Mortalitätsrate von bis zu 50% verantwortlich, wobei Fieber, Unwohlsein und sich rasch entwickelnde mukokutane Blasenreaktionen als klinische Manifestationen auftreten. Bei der TEN wurden umfangreichere Hautablösungen und höhere Sterblichkeitsraten beobachtet. Zahlreiche Studien beschreiben die starke Assoziation des HLA-B1502 Allels mit Carbamazepin-induziertem SJS/TEN in vielen asiatischen Populationen, wobei die Prävalenz von HLA-B1502 in Teilen von China, Thailand, Malaysia, Indonesien, die Philippinen und Taiwan bis zu 15% oder mehr betragen kann. Südasien haben eine mittlere Prävalenz von HLA-B1502, wohingegen in Japan und Korea das Allel selten ist (<1%). Prospektives HLA-B1502 Screening von Patienten aus Risikopopulationen reduziert daher die Häufigkeit von Überempfindlichkeitsreaktionen aufgrund von Carbamazepin signifikant.

3. Kit Bestandteile

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	weisser Deckel	1000 / 320 µl
HLA-B1502 Assay Mix	1 Vial	violetter Deckel	550 / 550 µl
HLA-B1502 Positive Control	1 Vial	grüner Deckel	75 / 75 µl
HLA-B1502 Negative Control	1 Vial	roter Deckel	75 / 75 µl

Der 2x RealFast™ Genotyping Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der HLA-B1502 Assay Mix besteht aus genspezifischen Primern und doppelt-markierten Hydrolysesonden für HLA-B1502 und ein Kontrollgen. Weiters sind eine Positiv- und eine Negativkontrolle für HLA-B1502 im Kit vorhanden.

Der Kit beinhaltet Reagenzien für 100 / 32 Reaktionen mit je 20 µl Endvolumen.

4. Lagerung und Stabilität

Der HLA-B1502 RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -20°C oder bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2 bis 8°C. Die Reagenzien überdauern ohne Aktivitätsverlust bis zu 20 Einfrier-/Auftauzyklen. Vermeiden Sie längere Exposition gegenüber direktem Licht. Bei korrekter Lagerung behält der Kit seine volle Funktionsfähigkeit bis zum angegebenen Ablaufdatum.

5. Produktbeschreibung

5.1. Testprinzip

Der Test basiert auf dem fluorogenen 5'-Nuklease-Assay, bekannt auch als TaqMan®-Assay. Jede Reaktion enthält genspezifische Primerpaare zur Amplifizierung eines 137 bp Fragments des HLA-B1502 Gens und eines 119 bp Fragments eines Kontrollgens. Letzteres fungiert als PCR Kontrolle. Weitere Komponenten sind zwei doppelt-markierte, genspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz des entsprechenden Fragments binden. Die unmittelbare Nähe von 5'-Fluoreszenzreporter und 3'-Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz der intakten Sonde. Während des Extensionsschrittes der PCR spaltet die 5' – 3' Exonuklease Aktivität der Taq DNA-Polymerase den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher verursacht in Echtzeit ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

In HLA-B1502 positiven Proben bindet sowohl die **FAM-markierte HLA-B1502 Sonde**, als auch die **HEX-markierte Sonde** für die **PCR Kontrolle** an das zugehörige Genfragment. Resultat ist ein starkes Fluoreszenzsignal im FAM- (520nm) und im HEX (556nm)-Kanal. In HLA-B1502 negativen Proben hybridisiert nur die HEX-markierte Sonde der PCR Kontrolle an den komplementären Strang des Kontrollgenfragments. Somit wird ein starkes Fluoreszenzsignal im HEX-Kanal und ein geringes, an der Basislinie liegendes Signal im FAM-Kanal detektiert.

5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der HLA-B1502 RealFast™ Assay ist für die Verwendung mit dem AB 7500 Fast Gerät validiert.

Der Kit ist mit verschiedenen handelsüblichen real-time PCR Geräten, die FAM- and HEX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Anmerkung:** RealFast™ Variant Detection QuickGuides zur Programmierung und Auswertung von Assays auf verschiedenen Geräten sind als Download verfügbar: www.viennalab.com.

Bei Verwendung von AB StepOne™ muss der passive Referenzfarbstoff auf "ROX" gesetzt werden! «

Der Kit enthält **kein ROX**. Bei Verwendung von real-time PCR Geräten, die eine hohe ROX- Konzentration zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), muss ROX in einer Endkonzentration von 1 µM dem 2x Genotyping Mix zugefügt werden.

5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 58 HLA-B1502 positiven Allelen, die mit Sanger Sequenzierung und einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der HLA- B1502 RealFast™ Assay typisierte alle 58 Allele als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 45 HLA- B1502 negativen Allelen, die mit Sanger Sequenzierung und einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der HLA- B1502 RealFast™ Assay typisierte alle 45 Allele als negativ = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 2.5 ng genomische DNA. Empfohlene DNA Konzentration: 2 bis 20 ng/µl genomische DNA.

6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM-(520 nm) und HEX-(556 nm) Filter, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweg-handschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionskit, Kühl- oder Gefrierschrank, Abfallbehälter.

7. Arbeitsanleitung

7.1. DNA Extraktion

DNA Extraktionsreagenzien sind **nicht im Kit** enthalten.

Es kann DNA aus verschiedenen Proben (z.B. Vollblut, Blutkärtchen, Wangenabstriche oder Speichel) verwendet werden. Gereinigte DNA muss für die Amplifizierung in hochmolekularer Form sowie in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen.

Für eine zuverlässige Genotypisierung sollte die DNA Menge pro Reaktion für alle Proben zwischen 10 und 100 ng liegen.

7.2. PCR Kontrollen

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** eine **No Template Control (NTC)** zur Kontrolle potentieller Kontaminationen mit ein. Es ist empfehlenswert die NTC (hochreines Wasser anstelle von DNA) als Duplikat einzusetzen.

Inkludieren Sie in jedem Lauf **immer** die HLA-B1502 **Positive Control** als positives Referenzsignal für unbekannte Proben und die HLA-B1502 **Negative Control** als negatives Referenzsignal für die Setzung des Schwellenwertes im FAM-Kanal.

» **Anmerkung:** Die Kontrollen stellen potentielle Kontaminationsquellen dar und müssen daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

7.3. Vorbereitung des HLA-B1502 RealFast™ Master-Mixes

Alle Lösungen komplett auftauen, vorsichtig mischen und kurz abzentrifugieren. Das Ansetzen der PCR erfolgt bei Raumtemperatur. Bereiten Sie ausreichend **Master-Mix** für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze (N Proben + Positivkontrollen + Negativkontrollen) vor, und berechnen Sie mindestens eine zusätzliche Reaktion ein um Pipettiergenauigkeiten auszugleichen:

Komponente	pro Reaktion	z.B. 25 Reaktionen
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B1502 Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Legen Sie **15 µl Master-Mix** in jedes Gefäß vor. Pipettieren Sie **5 µl** gereinigte **DNA** oder **Control** Template dazu um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen.

Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos pipettieren Sie die Proben in dieser Reihenfolge: Zuerst NTC, danach Ihre Proben, zuletzt die Positivkontrolle. Reaktionsgefäße sofort verschließen.

» **Anmerkung:** Vermeiden Sie Luftblasen im PCR-Ansatz und Fingerabdrücke auf den optischen Oberflächen der Reaktionsgefäße. Beides kann die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen. «

7.4. PCR Programm

Programmieren Sie Ihr real-time PCR Gerät wie vom Hersteller angegeben für eine Quantifizierung mit zwei Targets / Reporterfarbstoffen. Stellen Sie die PCR-Ansätze in den Thermocycler und starten Sie folgendes Programm:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480
und andere Peltier-Heizblock-basierende **Geräte:**

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	1 min	Annealing/Extension - Datenaufnahme im FAM- und HEX-Kanal

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension - Datenaufnahme im Green- und Yellow-Kanal

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Das Vorhandensein oder Fehlen des HLA-B1502 Allels wird über das Vorhandensein oder Fehlen eines Signals im **FAM Kanal** definiert. Die erfolgreiche PCR kann anhand der Amplifikation des Kontrollgens (PCR Kontrolle), die im **HEX Kanal** detektiert wird, verifiziert werden. Daher zeigt eine für HLA-B1502 positive genomische DNA Probe, als auch die HLA-B1502 Positive Control eine Amplifikation im HEX Kanal und im FAM Kanal. HLA-B1502 negative Proben und die HLA-B1502 Negative Control zeigen lediglich im HEX Kanal eine Amplifikation. Fluoreszenz und korrespondierende Amplifikationskurven werden innerhalb der real-time PCR Software automatisch als Amplification Plots dargestellt.

Probe	Amplifikation im FAM Kanal (520 nm)	Amplifikation im HEX Kanal (556 nm)
HLA-B1502 positiv	JA	JA
HLA-B1502 negativ	NEIN	JA
HLA-B1502 Positive Control	JA	JA
HLA-B1502 Negative Control	NEIN	JA
NTC	NEIN	NEIN

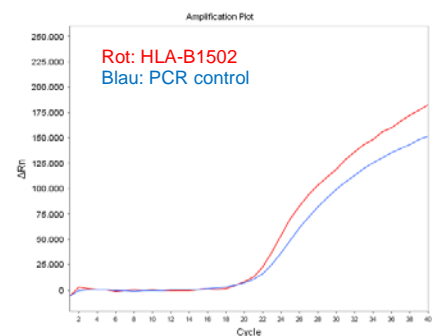
Einige Auswertprogramme benötigen manuell gesetzte Schwellenwerte (Threshold) zur korrekten Analyse.

Empfehlungen zur Einstellung des Schwellenwertes (C_q):

Setzen Sie den Schwellenwert für den FAM-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der HLA-B1502 Negative Control.

Proben, die den Schwellenwert nach C_q 37 übersteigen, gelten als ungültiges Resultat und müssen wiederholt werden.

Folgen Sie der Anleitung Ihres real-time PCR Auswertprogrammes um die gewonnenen Daten zu analysieren.



9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Kit ist ausschließlich für *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Tragen Sie beim Hantieren der Proben und Reagenzien immer puderfreie Einweghandschuhe und geeignete Laborkleidung.
- Bereiche für die DNA Extraktion und den Ansatz des PCR Mastermixes sollten räumlich streng getrennt sein.
- Benützen Sie ein eigenes Pipettenset nur für den PCR-Ansatz und verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolfilter.
- Benützen Sie ausschließlich dünnwandige, gerätekomppatible PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.

HLA-B1502 RealFast™ Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

REF 7-630 / 7-633 Σ 100 / 32 réactions

-20°C / 2-8°C



1. Utilisation

Le HLA-B1502 RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour la détection de l'allèle HLA-B1502, une variante spécifique de l'antigène humain leucocyte B (HLA-B) qui est fortement associé à une hypersensibilité à la carbamazépine. Le kit sert à identifier les patients HLA-B1502 positifs avant le début du traitement par la carbamazépine. Il faut écarter les porteurs de cette variante d'un traitement à base de carbamazépine. Le test qualitatif distingue la présence ou l'absence de l'allèle HLA-B1502 dans un extrait d'ADN humain. Séquence de référence: HGVS: NG_023187.1

2. Introduction

La carbamazépine est un anticonvulsivant et un psychorégulateur prescrit pour plusieurs indications, dont l'épilepsie, le trouble bipolaire, la névralgie trigéminal et la douleur chronique. Chez environ 5 à 10 % des patients, ce médicament peut causer des réactions d'hypersensibilité, dont le syndrome de Stevens-Johnson (SJS) et la nécrolyse épidermique toxique (TEN) sont parmi les complications les plus graves. Bien que rare, SJS / TEN est responsable d'un taux de mortalité allant jusqu'à 50%, avec pour manifestations cliniques fièvre, malaise et développement rapide de réactions muco-cutanées. Pour les TEN on a observé des détachements cutanés plus étendus et des taux de mortalité plus élevés. De nombreuses études décrivent la forte association de l'allèle HLA-B1502 avec le SJS/TEN induit par la carbamazépine dans de nombreuses populations asiatiques, avec une prévalence du HLA-B1502 atteignant 15 % ou plus dans certaines régions de Chine, Thaïlande, Malaisie, Indonésie, Philippines et Taiwan. Les asiatiques du sud ont une prévalence moyenne de HLA-B1502, alors qu'au Japon et en Corée l'allèle est rare (<1%). Le dépistage prospectif du HLA-B1502 chez les patients des populations à risque élevé réduit donc considérablement l'incidence des réactions d'hypersensibilité à la carbamazépine.

3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle blanc	1000 / 320 µl
HLA-B1502 Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle violet	550 / 550 µl
HLA-B1502 Positive Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle vert	75 / 75 µl
HLA-B1502 Negative Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle rouge	75 / 75 µl

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le HLA-B1502 Assay Mix se compose de primers génos-spécifiques et de sondes d'hydrolyse munies de marqueurs doubles pour HLA-B1502 et d'un gène témoin. Le kit contient en outre un contrôle positif et un contrôle négatif pour HLA-B1502.

Le kit comprend des réactifs pour 100 / 32 réactions de chacune d'un volume final de 20 µl.

4. Stockage et stabilité

Le HLA-B1502 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 génos-spécifiques pour amplifier un fragment 137 bp du gène HLA-B1502 et un fragment 119bp d'un gène témoin, ce dernier sert de contrôle à la PCR. Les autres composants sont deux sondes hydrolyses génos-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-B1502, la sonde marquée FAM HLA-B1502 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-B1502, 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-B1502 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)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ 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.

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 l'aide de 58 allèles positifs HLA-B1502 testés avec séquençage Sanger et un test de référence marqué CE. Le HLA-B1502 RealFast™ Assay a typé positives l'ensemble des 58 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La spécificité a été déterminée à l'aide de 45 allèles négatifs HLA-B1502 testés avec séquençage Sanger et un test de référence marqué CE. Le HLA-B1502 RealFast™ Assay a typé négatives l'ensemble des 45 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100%.

Limite de détection: 2.5 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.

Toujours inclure le HLA-B1502 **Positive Control** comme signal de référence positif pour les échantillons inconnus et le HLA-B1502 **Negative Control** comme signal de référence négatif pour régler le seuil dans le canal FAM pour chaque analyse.

» **Remarque:** Les contrôles sont des sources potentielles de contamination et doivent donc être manipulés avec le plus grand soin. «

7.3. Préparation du HLA-B1502 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-B1502 Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

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
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
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Réception de données dans le canal FAM et HEX

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

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

8. Analyse des données / interprétation des résultats

La présence ou l'absence de l'allèle HLA-B1502 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). Par conséquent, un échantillon d'ADN génomique positif pour HLA-B1502 ainsi que le HLA-B1502 Positive Control affichent une amplification dans le canal HEX et dans le canal FAM. Les échantillons négatifs HLA-B1502 et le HLA-B1502 Negative Control n'affichent que l'amplification 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 FAM (520 nm)	Amplification dans le canal HEX (556 nm)
HLA-B1502 positif	OUI	OUI
HLA-B1502 négatif	NON	OUI
HLA-B1502 Positive Control	OUI	OUI
HLA-B1502 Negative Control	NON	OUI
NTC	NON	NON

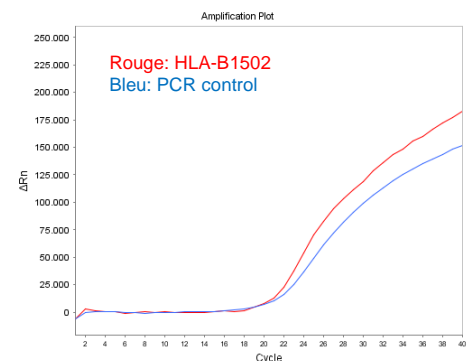
Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil (threshold) pour effectuer le génotypage correctement.

Recommandations pour le réglage de la valeur seuil (C_q):

Régler la valeur seuil du canal FAM légèrement supérieure à la fluorescence de fond du HLA-B1502 Negative Control.

Les échantillons dépassant le seuil C_q 37 sont considérés comme erronés et doivent être repris.

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-B1502 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.

HLA-B1502 RealFast™ Assay



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

REF 7-630 / 7-633 100 / 32 reazioni

-20°C / 2-8°C



1. Utilizzo

L'HLA-B1502 RealFast™ Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione dell'allele HLA-B1502, una specifica variante del gene dell'*antigene leucocitario umano B (HLA-B)*, strettamente associato a reazioni avverse cutanee severe indotte dalla carbamazepina. Il kit è concepito per la stratificazione del rischio genetico dei pazienti prima dell'avvio della terapia con carbamazepina. I pazienti positivi all'HLA-B1502 vanno esclusi dal trattamento con carbamazepina. Il test qualitativo discrimina la presenza o l'assenza di HLA-B1502 in un estratto di DNA genomico umano. Sequenza di riferimento: HGVS: NG_023187.1

2. Introduzione

La carbamazepina è un farmaco anticonvulsivante stabilizzatore dell'umore comunemente prescritto per molteplici indicazioni come epilessia, disturbi bipolari, nevralgia del trigemino e dolore cronico. In circa il 5-10% degli individui, questo farmaco può causare reazioni di ipersensibilità, tra le quali la sindrome di Stevens-Johnson (SJS) e la necrolisi epidermica tossica (TEN) sono tra le complicanze più severe. Sebbene rara, la SJA/TEN è responsabile di un tasso di mortalità che arriva al 50%, con manifestazioni cliniche quali febbre, malessere e reazioni vescicolari mucocutanee a sviluppo rapido. Nella TEN si è osservato un esteso scollamento cutaneo nonché tassi di mortalità più elevati. Numerosi studi descrivono una forte associazione dell'allele HLA-B1502 con SJS/TEN indotta da carbamazepina presso molte popolazioni asiatiche, tra le quali la prevalenza dell'HLA-B1502 può raggiungere il 15% o più in parti di Cina, Thailandia, Malesia, Indonesia, Filippine e Taiwan. Gli asiatici del sud presentano una prevalenza intermedia dell'HLA-B1502, mentre in Giappone e in Corea l'allele è raro (<1%). Pertanto, uno screening prospettico per l'HLA-B1502 dei pazienti appartenenti a popolazioni a rischio riduce in modo significativo l'incidenza delle reazioni di ipersensibilità indotte da carbamazepina.

3. Contenuto del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 fiala	□ tappo bianco	1000 / 320 µl
HLA-B1502 Assay Mix	1 fiala	■ tappo viola	550 / 550 µl
HLA-B1502 Positive Control	1 fiala	■ tappo verde	75 / 75 µl
HLA-B1502 Negative Control	1 fiala	■ tappo rosso	75 / 75 µl

Il RealFast™ 2x Genotyping Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTPs in un sistema tampone ottimizzato.

L'HLA-B1502 Assay Mix consiste di primer gene-specifici, di sonde di idrolisi a doppia etichetta per l'HLA-B1502 e di un gene di controllo. Con il kit vengono forniti un controllo positivo e un controllo negativo per l'HLA-B1502.

Il kit contiene reagenti per 100 /32 reazioni in un volume finale di 20 µl ciascuno.

4. Conservazione e stabilità

L'HLA-B1502 RealFast™ Assay viene inviato su blocchi refrigeranti. Al suo arrivo, conservare il kit a -20°C. In alternativa, il kit può essere conservato a una temperatura tra i 2 e gli 8°C per un uso a breve termine entro un mese. Il kit sopporta fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza perdita di attività. Evitare un'esposizione prolungata a luce intensa. Se conservato in modo adeguato, il kit manterrà piena attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

5. Descrizione del prodotto

5.1. Principio del Test

Il test è basato sul saggio fluorogenico della 5' nucleasi, anche denominato TaqMan® Assay. Ogni reazione contiene coppie di primer gene-specifici che amplificano un frammento di 137 bp del gene *HLA-B1502* e un frammento di 119 bp di un gene di controllo, il quale funge da controllo per la PCR. Tra le altre componenti vi sono due sonde di idrolisi gene-specifiche a doppia etichetta che ibridano con la sequenza target del frammento corrispondente. La prossimità del reporter fluorescente in 5' e del quencher colorante in 3' sulle sonde intatte induce la soppressione della fluorescenza del reporter. Durante la fase di estensione della PCR, l'attività 5' – 3' esonucleasica della Taq DNA polimerasi cliva il reporter fluorescente in 5' dalla sonda ibridata. La separazione fisica del fluoroforo dal quencher colorante genera un segnale fluorescente in tempo reale, che è proporzionale al prodotto della PCR accumulato.

Nei campioni positivi per l'HLA-B1502 sia la sonda **HLA-B1502 marcata con FAM** sia la sonda di **controllo per la PCR marcata con HEX** si legano con il frammento di gene corrispondente. Nel canale FAM (520nm) e nel canale HEX (556nm) si rileva un forte segnale di fluorescenza. Nei campioni negativi per l'HLA-B1502 soltanto la sonda di controllo per la PCR marcata con HEX ibrida con il filamento complementare del frammento del gene di controllo. Nel canale HEX si rileva un forte segnale di fluorescenza, mentre il segnale è assente o soltanto di base nel canale FAM.

5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

L'HLA-B1502 RealFast™ Assay è validato per l'utilizzo con lo strumento AB 7500 Fast.

Il kit è compatibile con vari strumenti comuni Real-time PCR in grado di registrare la fluorescenza FAM e HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyclers (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** Le RealFast™ Variant Detection QuickGuide per l'allestimento e l'analisi di esperimenti su strumenti di tipo diverso possono essere scaricate dal sito www.viennalab.com.

Quando si utilizza l'AB StepOne™, impostare il colorante di riferimento passivo su "ROX"! «

Poiché viene fornito **senza ROX**, per utilizzare il kit con strumenti Real-time PCR che richiedono un ROX elevato per la normalizzazione dei dati (per es. strumenti Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), aggiungere ROX in una concentrazione finale di 1 µM al 2x Genotyping Mix.

5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 58 alleli risultati positivi per l'allele HLA-B1502 con sequenziamento Sanger e un kit di riferimento marchiato CE. L'HLA-B1502 RealFast™ Assay ha determinato la positività di tutti i 58 alleli, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 45 alleli risultati negativi per l'allele HLA-B1502 con sequenziamento Sanger e un kit di riferimento marchiato CE. L'HLA-B1502 RealFast™ Assay ha determinato la negatività di tutti i 45 alleli, con una percentuale di veri negativi pari al 100%.

Limite di rilevazione: 2.5 ng di DNA genomico (per reazione). Concentrazione di DNA raccomandata: da 2 a 20 ng/µl di DNA genomico.

6. Materiali richiesti ma non forniti

Strumento Real-time PCR con filtri FAM (520 nm) e HEX (556 nm), contenitori di reazione da compatibili con lo strumento, guanti monouso senza polvere, vortex, minicentrifuga per provette da 2.0 ml, portaprovette, set di micropipette calibrate (0.5 – 1000 µl), punte sterili con filtro barriera antiaerosol, acqua di grado molecolare, sistema per l'estrazione del DNA, congelatore, contenitore per rifiuti biologici.

7. Protocollo sperimentale

7.1. Estrazione del DNA

I reagenti per l'estrazione del DNA **non sono forniti** con il kit.

E' possibile utilizzare DNA isolato da campioni diversi (per es. sangue periferico intero, campioni di sangue secco, tamponi orali o saliva). Accertarsi che il DNA estratto sia idoneo per l'amplificazione dal punto di vista della concentrazione, della purezza e dell'integrità.

Per un'accurata determinazione dei genotipi, la quantità di DNA per reazione dev'essere compresa tra 10 e 100 ng per tutti i campioni.

7.2. Controlli della PCR

Includere **sempre** un **No Template Control (NTC)** in ciascun esperimento per confermare l'assenza di potenziali contaminazioni. E' consigliabile condurre l'NTC in duplicato (utilizzare acqua di grado PCR invece di DNA).

Includere **sempre** l'HLA-B1502 **Positive Control** come segnale di riferimento positivo per i campioni non noti e l'HLA-B1502 **Negative Control** come segnale di riferimento negativo per impostare la soglia per il canale FAM.

» **Nota:** I Controlli costituiscono potenziali fonti di contaminazione. Assicuratevi di maneggiarli con cautela. «

7.3. Preparazione del Master Mix delle HLA-B1502 RealFast™:

Una volta scongelate, vortexare leggermente e centrifugare brevemente tutte le soluzioni. Allestire la PCR a temperatura ambiente. Preparare una quantità di **Master Mix** che sia sufficiente per tutte le reazioni (N campioni + controlli positivi + controlli negativi) nonché almeno una reazione aggiuntiva per rimediare a eventuali imprecisioni nel pipettaggio:

Componenti	per reazione	Per es. 24+1 reazioni
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B1502 Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Dispensare **15 µl** di **Master Mix** in ciascun pozzetto. Aggiungere **5 µl** di **DNA** purificato o di **Control** template per ottenere un volume di reazione finale di 20 µl.

Minimizzare il rischio di contaminazione, pipettare sempre i template nel seguente ordine: prima l'NTC, quindi i campioni e, per ultimi, i controlli positivi. Chiudere immediatamente i contenitori di reazione.

» **Nota:** Evitare la creazione di bolle nel mix di reazione finale ed evitare di toccare la superficie ottica del tappo o la pellicola sigillante senza guanti. Entrambi possono interferire con le misurazioni della fluorescenza. Centrifugare brevemente se necessario. «

7.4. Programma della PCR

Programmare lo strumento Real-time PCR secondo le istruzioni del fabbricante per gli esperimenti di quantificazione. Collocare i campioni nel termociclatore e svolgere il seguente programma:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480
e altri strumenti Peltier basati su blocco di riscaldamento:

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	95°C	3 min	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione
	60°C	1 min	Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nel canale FAM e HEX

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	95°C	3 min	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione
	60°C *for 36-well rotor: 56°C	1 min	Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nel canale Green e Yellow

8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

La presenza o assenza dell'allele HLA-B1502 è determinata dalla presenza o meno di un segnale nel **canale FAM**. Una buona riuscita della PCR può essere verificata da un'amplificazione del gene di controllo rilevata nel **canale HEX** (controllo della PCR). Pertanto, i campioni di DNA genomico positivi per l'HLA-B1502 e l'HLA-B1502 Positive Control presentano un'amplificazione in entrambi i canali, HEX e FAM. I campioni negativi per l'HLA-B1502 e l'HLA-B1502 Negative Control presentano un'amplificazione soltanto nel canale HEX. I livelli di fluorescenza e le corrispondenti curve di amplificazione vengono rappresentati automaticamente nei grafici di amplificazione del software Real-time PCR.

Campioni	Amplificazione nel canale FAM (520 nm)	Amplificazione nel canale HEX (556 nm)
HLA-B1502 positivi	SI	SI
HLA-B1502 negativi	NO	SI
HLA-B1502 Positive Control	SI	SI
HLA-B1502 Negative Control	NO	SI
NTC	NO	NO

Alcuni software dello strumento richiedono l'impostazione manuale dei valori soglia (threshold) ai fini di un'accurata determinazione dei genotipi.

Raccomandazioni per l'impostazione dei valori soglia (C_q):

Impostare la soglia per il canale FAM immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal HLA-B1502 Negative Control.

I campioni che superano la soglia C_q 37 non danno risultati validi e vanno ripetuti.

Per l'analisi dei dati acquisiti, seguire le istruzioni del software dello strumento.

9. Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Indossare sempre guanti monouso senza polvere e un camice da laboratorio appropriato quando si maneggiano campioni e reagenti.
- Allestire la reazione in un'area separata da quella della preparazione dell'acido nucleico e dell'analisi del prodotto della PCR.
- Utilizzare pipette dedicate soltanto all'allestimento della PCR, avvalersi di punte per pipette provviste di barriera antiaerosol.
- Utilizzare contenitori di reazione compatibili con lo strumento provvisti di tappi otticamente trasparenti o di pellicole sigillanti.
- Non mescolare reagenti di lotti diversi.
- Non utilizzare kit, o componenti di kit, scaduti.

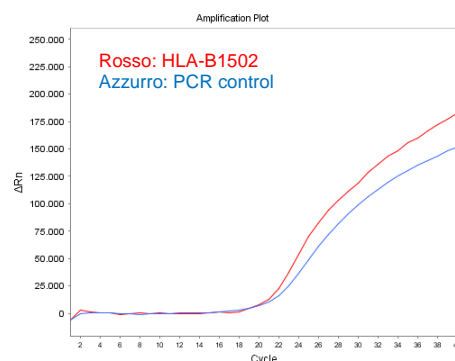


Grafico di amplificazione:
campione **HLA-B1502 positivo**.

HLA-B1502 RealFast™ Assay

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

REF 7-630 / 7-633 100 / 32 reacciones
-20°C 2-8°C CE IVD



1. Aplicación

HLA-B1502 RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección del alelo HLA-B1502, una variante del gen de *antígeno leucocitario humano B (HLA-B)* que está fuertemente asociado con una hipersensibilidad a la carbamazepina. El kit se utiliza antes del comienzo de la terapia con carbamazepina para la identificación de pacientes HLA-B1502 positivos. Los portadores de esta variante deben excluirse de una medicación con carbamazepina. La prueba cualitativa diferencia entre la presencia o ausencia del alelo HLA-B1502 en un extracto de ADN humano.

Secuencia de referencia: HGVS: NG_023187.1

2. Introducción

La carbamazepina es un medicamento anticonvulsivo y estabilizador emocional que se prescribe para varias indicaciones como epilepsia, trastorno bipolar, neuralgia del trigémino y dolor crónico. Aproximadamente entre el 5% y el 10% de los pacientes puede experimentar reacciones de hipersensibilidad a este medicamento, entre las que se encuentran, como complicaciones más graves, el síndrome de Stevens-Johnson (SJS) y la necrolisis epidérmica tóxica (TEN). Aunque infrecuentes, SJS / TEN son responsables de un índice de mortalidad de hasta el 50 %, siendo sus manifestaciones clínicas fiebre, malestar y reacciones de ampollas mucocutáneas de rápida formación. En la TEN se observaron amplios desprendimientos de la piel e índices de mortalidad superiores. Múltiples estudios describen la intensa asociación del alelo HLA-B1502 con SJS/TEN inducido por la carbamazepina en muchas poblaciones asiáticas, donde la prevalencia de HLA-B1502 en partes de China, Tailandia, Malasia, Indonesia, Filipinas y Taiwán puede ser de hasta el 15 % o más. La población del Sudeste Asiático tiene una prevalencia media de HLA-B1502, mientras que en Japón y Corea el alelo es infrecuente (<1%). El cribado de pacientes prospectivo de HLA-B1502 en las poblaciones de riesgo reduce significativamente la frecuencia de las reacciones de hipersensibilidad debido a la carbamazepina.

3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 vial	□ tapón blanco	1000 / 320 µl
HLA-B1502 Assay Mix	1 vial	■ tapón violeta	550 / 550 µl
HLA-B1502 Positive Control	1 vial	■ tapón verde	75 / 75 µl
HLA-B1502 Negative Control	1 vial	■ tapón rojo	75 / 75 µl

El RealFast™ 2x Genotyping Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer. El HLA-B1502 Assay Mix consta de primers específicos de genes y sondas de hidrólisis de doble marcado para *HLA-B1502* y un gen de control. Además, existe un control positivo y uno negativo para HLA-B1502 en el kit.

El kit contiene reactivos para 100 / 32 reacciones con cada 20 µl de volumen final.

4. Almacenamiento y estabilidad

El HLA-B1502 RealFast™ Assay se suministra sobre bloques de enfriamiento. Conserve el kit a -20°C después de su recepción. Alternativamente para su utilización en el espacio de un mes a 2 hasta 8°C. Los reactivos sobreviven sin pérdida de actividad hasta 20 ciclos de congelación/ descongelación. Evite la exposición prolongada a la luz directa. Cuando se conserva correctamente, el kit mantiene su funcionalidad hasta la fecha de caducidad indicada.

5. Descripción del producto

5.1. Principio de la prueba

La prueba basada en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocido como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene pares de primers específicos de gen para la amplificación de un fragmento de 137 pb del gen *HLA-B1502* y de un fragmento de 119 bp de un gen de control. Este último actúa como un control de PCR. Otros componentes son dos sondas de hidrólisis doble marcado de genes específicos, que se enlazan a la secuencia de objetivo del fragmento correspondiente. La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad 5' - 3' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq escinde el reporter de la sonda hibridada. La separación espacial del fluoróforo del quencher ocasiona una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR.

En las pruebas positivas HLA-B1502 enlaza tanto la **HLA-B1502 marcada con FAM**, como también la **sonda marcada con HEX** para el control de PCR al fragmento de gen correspondiente. El resultado una fuerte señal de fluorescencia en el canal de FAM- (520nm) y de HEX (556nm). En las pruebas negativas HLA-B1502 hibrida solamente la sonda marcada con HEX del control de PCR a la cadena complementaria del fragmento de gen de control. De este modo se detecta una fuerte señal de fluorescencia en el canal de HEX y una reducida señal situada en la línea de base en el canal de FAM.

5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

El HLA-B1502 RealFast™ Assay su uso está autorizado con el aparato AB 7500 Fast.

El kit es compatible con diferentes aparatos usuales de PCR en tiempo real, que puedan detectar fluorescencia FAM y HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** RealFast Variant Detection Guías rápidas para la programación y evaluación de ensayos RealFast™ Assays están disponibles para su descarga en www.viennalab.com.

¡Al utilizar AB StepOne™ el colorante de referencia pasiva debe ponerse a "ROX"! «

El kit **no** contiene ROX. El uso de dispositivos de PCR en tiempo real, que requieren una alta concentración de ROX para normalizar los datos (por.ej.: Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), ROX tiene que ser añadido a una concentración final de 1 µM al 2x Genotyping Mix.

5.3. Especificaciones de la prueba

La **sensibilidad** se determinó en base 58 alelos positivos HLA-B1502, que se comprobaron con la secuenciación de Sanger y una prueba de referencia con la marca CE. El HLA-B1502 RealFast™ Assay tipificó los 58 alelos como positivo = 100% correcto-positivo-tanto por ciento.

La **especificidad** se determinó en base 45 alelos negativos HLA-B1502, que se comprobaron con la secuenciación de Sanger y una prueba de referencia con la marca CE. El HLA-B1502 RealFast™ Assay tipificó los 45 alelos como negativo = 100% correcto-negativo-tanto por ciento.

Límite de detección: 2.5 ng de ADN genómico (por reacción). Concentración de ADN recomendada: de 2 a 20 ng/µl de ADN genómico.

6. Materiales necesarios, pero no proporcionados

El aparato PCR en tiempo real con FAM (520 nm) y el filtro HEX (556 nm), recipientes PCR ópticos compatibles con aparatos, guantes desechables sin polvo, vórtex, mini centrífuga para 2.0 ml tubos, bastidor de tubos, juego de micro pipetas calibradas (0.5 - 1000 µl), puntas de pipeta estériles con filtros de aerosol, agua de gran pureza, sistema de extracción de ADN, refrigerador o congelador, contenedor de residuos.

7. Instrucciones

7.1. Extracción ADN

Reactivos de extracción de ADN **no se incluyen** en el kit. Se puede utilizar ADN de diferentes muestras (por ejemplo, sangre total, tarjetas de sangre, frotis de mejilla o la saliva). El ADN purificado debe estar disponible para la amplificación de forma altamente molecular y en cantidad y pureza suficientes. Para determinar el genotipo fiable la cantidad de ADN por reacción para todas las pruebas debe ser entre 10 y 100 ng.

7.2. Controles PCR

Incluya en cada ejecución **siempre** un **No Template Control** (NTC) para controlar la posibilidad de una contaminación potencial. Se recomienda utilizar el NTC (agua ultra pura en lugar de ADN) como duplicado.

En cada ejecución debe incluir **siempre** el HLA-B1502 **Positive Control** de como señal de referencia positiva para muestras desconocidas y el HLA-B1502 **Negative Control** de como señal de referencia negativa para la fijación del valor umbral en el canal FAM.

»**Nota:** Los controles pueden ser fuentes potenciales de contaminación y, por lo tanto, deben manipularse con mucho cuidado. «

7.3. Preparación de HLA-B1502 RealFast™ Master-Mix

Descongele completamente todas las soluciones, mezclar suavemente y centrifugar brevemente. La preparación de la PCR debe llevarse a cabo a temperatura ambiente. Preparar suficiente **Master-Mix** (mezcla maestra) para el número total del depósito de PCR planificado (pruebas N + controles positivos + controles negativos), y calcular al menos una reacción adicional para nivelar inexactitudes del pipeteando:

Componentes	por reacción	p.ej. 24+1 reacciones
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B1502 Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Coloque previamente **15 µl Master-Mix** en cada recipiente. Pipetee **5 µl** de **ADN** purificado o de **Control** Template en él con el fin de alcanzar el volumen final de 20 ul 5 ul de ADN.

Para minimizar el riesgo de contaminación de las muestras de la pipeta en este orden: en primer lugar NTC, a continuación sus muestras, por último los controles positivos. Cerrar inmediatamente los recipientes de reacción.

»**Nota:** Evite las burbujas de aire en la mezcla de PCR y las huellas dactilares sobre las superficies ópticas de los recipientes de reacción. Las dos cosas pueden afectar la medición de fluorescencia. «

7.4. Programa PCR

Programa su aparato PCR en tiempo real según lo especificado por el fabricante para los experimentos en la "cuantificación". Fije los depósitos de PCR en el termociclador y ejecute el siguiente programa:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480

y otros aparatos basados en el bloque de calentamiento Peltier:

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	95°C	3 min	Desnaturalización inicial
40	95°C	15 seg	Desnaturalización
	60°C	1 min	Annealing/Extensión – registro de datos en el canal FAM y HEX

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	95°C	3 min	Desnaturalización inicial
40	95°C	15 seg	Desnaturalización
	60°C *)for 36-well rotor: 56°C	1 min	Annealing/Extensión - registro de datos en el canal Green y Yellow

8. Análisis de datos / Interpretación de los resultados

La presencia o ausencia de HLA-B1502 se define por la presencia o ausencia de una señal en el **canal FAM**. El éxito de PCR puede verificarse gracias a la amplificación del gen de control (control PCR), que se detecta en el **canal HEX**. Por ello, una muestra de ADN genómica positiva para HLA-B1502, como también el HLA-B1502 Positive Control, presenta una amplificación en el canal HEX y en el FAM. Las muestras negativas de HLA-B1502 y el HLA-B1502 Negative Control de presentan una amplificación solo en el canal HEX. Fluorescencia y correspondientes curvas de amplificación se visualizan automáticamente dentro del software PCR en tiempo real en un gráfico de amplificación.

Pruebas	Amplificación en FAM-canal (520 nm)	Amplificación en HEX-canal (556 nm)
HLA-B1502 positiva	SI	SI
HLA-B1502 negativa	NO	SI
HLA-B1502 Positive Control	SI	SI
HLA-B1502 Negative Control	NO	SI
NTC	NO	NO

Algunos programas de evaluación tienen que configurar manualmente el valor límite (threshold) para el genotipo correcto.

Recomendaciones para establecer el valor límite (C_q):

El valor umbral para el canal FAM debe ajustarse algo mayor que la fluorescencia de fondo del HLA-B1502 Negative Control.

Las muestras, que excedan el valor límite después de C_q 37 no se consideran válidas y deben repetirse.

Siga las indicaciones de su programa de evaluación PCR en tiempo real para analizar los datos obtenidos.

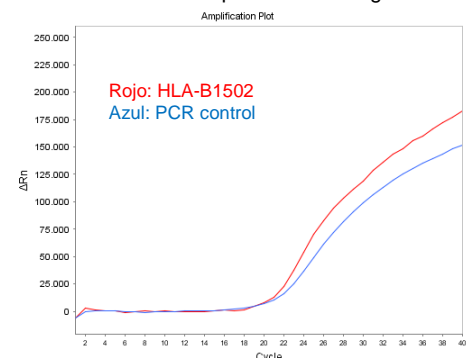


Gráfico de amplificación:
prueba **positiva HLA-B1502**

9. Indicaciones y medidas de seguridad

- El kit se destina únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Al manipular muestras y reactivos utilice siempre guantes desechables sin polvo y vestimenta adecuada de laboratorio.
- Entre las áreas para la extracción de ADN y el depósito PCR Master Mix debe mantener un espacio de separación estricto
- Utilice solamente un set de pipetas propio sólo para el depósito de PCR y utilice puntas de pipeta con filtro de aerosol.
- Utilice únicamente recipientes de paredes finas, recipientes de PCR compatibles con los aparatos para mediciones ópticas cierre adecuado.
- No mezclar reactivos con números de lotes diferentes.
- No utilizar kits o componentes del kit caducados.

HLA-B1502 RealFast™ Assay

REF 7-630 / 7-633 100 / 32 reações

-20°C / 2-8°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Utilização prevista

O HLA-B1502 RealFast™ Assay é um teste de PCR em tempo real, rápido e exato, para a detecção do alelo HLA-B1502, uma variante específica do gene do *antígeno leucócito humano B (HLA-B)*, fortemente associado a reações adversas graves induzidas pela carbamazepina. O kit foi concebido para estratificar o risco genético de pacientes antes do início da terapia com carbamazepina. Pacientes HLA-B1502 positivos devem ser excluídos do tratamento a base de carbamazepina. O ensaio qualitativo discrimina a presença ou ausência de HLA-B1502 num extrato de ADN genómico humano.

Sequência de referência: HGVS: NG_023187.1

2. Introdução

A Carbamazepina é um medicamento anticonvulsivante e estabilizador do humor, prescrito com frequência para múltiplas indicações, como: epilepsia, transtorno bipolar, neuralgia trigeminal e dor crónica. Em aproximadamente 5 a 10% dos indivíduos, este medicamento pode causar reações de hipersensibilidade, sendo a síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) e a necrólise tóxica epidérmica (TEN) entre as complicações mais graves. Embora rara, a SSJ/TEN é responsável por uma taxa de mortalidade que chega a 50%, com febre, mal-estar e erupção mucocutânea de desenvolvimento rápido, como manifestações clínicas. Observaram-se taxas de desprendimento de pele mais extensas e taxas de mortalidade mais elevadas na TEN. Inúmeros estudos descrevem a forte associação do alelo HLA-B1502 com SSJ/TEN induzida pela carbamazepina em muitas populações asiáticas. A prevalência de HLA-B1502 pode chegar a 15% ou mais em regiões da China, Tailândia, Malásia, Indonésia, Filipinas e Taiwan. Os sul-asiáticos relatam uma prevalência intermediária de HLA-B1502, enquanto no Japão e na Coreia o alelo é raro (<1%). O rastreio prospectivo de HLA-B1502 em pacientes de populações de risco reduz portanto significativamente as reações de hipersensibilidade ligadas à carbamazepina.

3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 ampola	□ tampa branca	1000 / 320 µl	A RealFast™ 2x Genotyping Mix inclui HotStart Taq DNA
HLA-B1502 Assay Mix	1 ampola	■ tampa roxa	550 / 550 µl	polymerase e dNTPs num sistema tampão otimizado.
HLA-B1502 Positive Control	1 ampola	■ tampa verde	75 / 75 µl	A HLA-B1502 Assay Mix consiste em iniciadores específicos
HLA-B1502 Negative Control	1 ampola	■ tampa vermelha	75 / 75 µl	para o gene, sondas de hidrólise com marcação dupla para

HLA-B1502 e um gene de controlo. Um controlo positivo e negativo para HLA-B1502 são fornecidos com o kit.

O kit contém reagentes para 100 / 32 reações, num volume final de 20 µl cada.

4. Armazenamento e estabilidade

O HLA-B1502 RealFast™ Assay é enviado em blocos de arrefecimento. Após a receção, armazene o kit a -20°C. Em alternativa, armazene entre 2 e 8°C para utilização a curto prazo, dentro de um mês. O kit suporta até 20 ciclos de congelamento/descongelamento sem ocorrer perda de atividade. Evitar a exposição prolongada a luz intensa. Se for armazenado corretamente, o kit permanece totalmente ativo até à data de validade indicada no rótulo.

5. Descrição do produto

5.1. Princípio do teste

O teste utiliza o ensaio fluorogénico 5' nuclease, também conhecido como ensaio TaqMan®. Cada reação contém pares de iniciadores específicos do gene que amplificam um fragmento de 137 pb do gene *HLA-B1502* e um fragmento de 119 bp de um gene de controlo, funcionando este como controlo da PCR. Outros componentes são sondas de hidrólise específicas para o gene, com marcação dupla, que hibridam a sequência-alvo do fragmento correspondente. A proximidade do gene repórter fluorescente 5' e o corante supressor 3' em sondas intactas impede a fluorescência do gene repórter. Durante a fase de extensão da PCR, a atividade da exonuclease 5' – 3' da Taq DNA polimerase cliva o gene repórter fluorescente 5' da sonda hibridada. A separação física do fluoróforo do corante supressor produz um sinal fluorescente em tempo real, que é proporcional ao produto de PCR acumulado.

Em amostras positivas para HLA-B1502, tanto a sonda **HLA-B1502 marcada com FAM** como a sonda de **controlo de PCR marcada com HEX** se ligam ao fragmento correto do gene. É detetado um sinal fluorescente forte no canal FAM (520 nm) e no canal HEX (556 nm). Em amostras negativas para HLA-B1502, somente a sonda de controlo de PCR marcada com HEX hibrida a cadeia complementar do fragmento do gene de controlo. É detetado um sinal fluorescente forte no canal HEX, ao passo que não é detetado qualquer sinal ou é detetado apenas um sinal de base no canal FAM.

5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O HLA-B1502 RealFast™ Assay está validado para a utilização com o instrumento AB 7500 Fast.

O kit é compatível com vários equipamentos comuns de PCR em tempo real com capacidade de registar fluorescência FAM e HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyciler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** É possível transferir os RealFast™ Variant Detection QuickGuides para informações sobre a configuração e análise de experiências com diferentes tipos de instrumentos em www.viennalab.com.

«Ao utilizar o AB StepOne™, configure o supressor de referência passiva para "ROX"! «

O kit é fornecido **sem ROX**. Para a utilização com instrumentos de PCR em tempo real que exijam ROX elevado para a normalização dos dados (por exemplo, instrumentos Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), adicione ROX a uma concentração final de 1 µM à 2x Genotyping Mix.

5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi efetuada em 58 alelos com resultado positivo quanto ao alelo HLA-B1502 com sequenciamento de Sanger e um kit de referência com marcação CE. O HLA-B1502 RealFast™ Assay determinou todos os 58 alelos como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 45 alelos com resultado negativo quanto ao alelo HLA-B1502 com sequenciamento de Sanger e um kit de referência com marcação CE. O HLA-B1502 RealFast™ Assay determinou todos os 45 alelos como negativos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros negativos de 100%.

Limite de deteção: 2.5 ng de ADN genómico (por reação). Concentração de ADN recomendada: 2 a 20 ng/µl de ADN genómico.

6. Materiais necessários, mas não fornecidos

Instrumento de PCR em tempo real com filtros FAM (520 nm) e HEX (556 nm), recipientes de reação compatíveis com o instrumento, luvas sem talco descartáveis, vórtex, minicentrífugadora para tubos de 2.0 ml, suportes para tubos, conjunto de micropipetas calibradas (0.5 – 1000 µl), pontas estéreis com filtro de barreira de aerossóis, água de grau molecular, sistema de extração de ADN, congelador, recipiente para resíduos de risco biológico.

7. Protocolo experimental

7.1. Extração do ADN

Os reagentes de extração do ADN **não são fornecidos** com o kit.

É possível utilizar ADN isolado de vários tipos de amostra (p. ex., sangue periférico total, gota seca de sangue, esfregaço bucal ou saliva). Certifique-se de que o ADN extraído é adequado para a amplificação em termos de concentração, pureza e integridade.

Para a determinação exata do genótipo, a quantidade de ADN por reação deve situar-se entre 10 e 100 ng em todas as amostras.

7.2. Controlos de PCR

Inclua **sempre** um **No Template Control** (NTC) em cada experiência para confirmar a ausência de potencial contaminação. Recomenda-se a análise do NTC (utilizando água de grau para PCR em vez de ADN) em duplicado.

Inclua **sempre** o HLA-B1502 **Positive Control** como sinal positivo de referência para as amostras desconhecidas e o HLA-B1502 **Negative Control** como sinal negativo de referência para a definição de limiar para o canal FAM.

» **Nota:** Os Controlos são fontes potenciais de contaminação. Manuseie com cautela. «

7.3. Preparação da HLA-B1502 RealFast™ Master-Mix

Agite lentamente no vórtex e centrifugue rapidamente todas as soluções após o descongelamento. Configure a PCR à temperatura ambiente. Prepare **Master-Mix** (mistura principal) suficiente para todas as reações (amostras N + controlos positivos + controlos negativos) e pelo menos mais uma reação adicional para compensar erros de pipetagem:

Componente	por reação	p. ex. 24+1 reações
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B1502 Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Coloque **15 µl** de **Master-Mix** em cada poço. Adicione **5 µl** de **ADN** purificado ou modelo de **Controlo** para obter um volume de reação final de 20 µl.

Para minimizar o risco de contaminação, pipete sempre modelos pela seguinte ordem: primeiro o NTC, seguido das amostras e, por último, os controlos positivos. Feche imediatamente os recipientes de reação.

» **Nota:** Evite a formação de bolhas na mistura de reação final e evite tocar na superfície ótica da tampa ou na película de vedação sem luvas. Isto pode interferir com as medições de fluorescência. Se necessário, centrifugue brevemente. «

7.4. Programa de PCR

Programe o instrumento de PCR em tempo real de acordo com as instruções do fabricante para experiências de quantificação. Coloque as amostras no termociclador e execute o seguinte programa:

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480
e outros instrumentos de bloco de calor Peltier:

Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	95°C	3 min	Desnaturação inicial
40	95°C	15 sec	Desnaturação
	60°C	1 min	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados no canal FAM e HEX

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	95°C	3 min	Desnaturação inicial
40	95°C	15 sec	Desnaturação
	60°C *)for 36-well rotor: 56°C	1 min	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados no canal Green e Yellow

8. Análise dos dados/interpretação dos resultados

A presença ou ausência do alelo HLA-B1502 define-se pela existência ou inexistência de um sinal no **canal FAM**. O sucesso da PCR pode ser verificado por uma amplificação do gene de controlo detetado no **canal HEX** (controlo da PCR). Assim, as amostras de ADN genómico positivas para HLA-B1502, bem como o HLA-B1502 Positive Control exibem amplificação nos canais HEX e FAM. As amostras negativas para HLA-B1502 e o HLA-B1502 Negative Control apenas exibem amplificação no canal HEX. Os níveis de fluorescência e as correspondentes curvas de amplificação são automaticamente apresentados em gráficos de amplificação pelo software da PCR em tempo real.

Amostras	Amplificação no canal FAM (520 nm)	Amplificação no canal HEX (556 nm)
HLA-B1502 positivo	SIM	SIM
HLA-B1502 negativo	NÃO	SIM
HLA-B1502 Positive Control	SIM	SIM
HLA-B1502 Negative Control	NÃO	SIM
NTC	NÃO	NÃO

O software de alguns instrumentos requer a definição manual de limiares (threshold) para a determinação exata do genótipo.

Definições de limiar recomendadas (C_q):

Defina o valor do limiar para o canal FAM logo acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo HLA-B1502 Negative Control.

As amostras que ultrapassam o limiar para além de C_q 37 dão resultados inválidos e têm de ser repetidas.

Para analisar os dados obtidos, siga as instruções do software do seu instrumento.

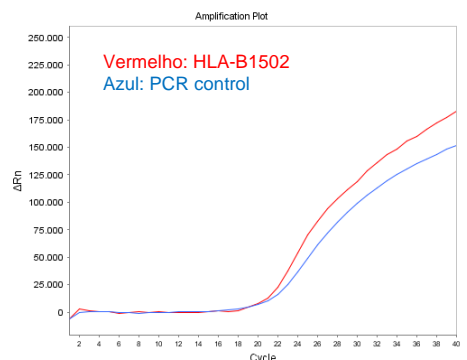


Gráfico de amplificação:
Amostra **positiva** para **HLA-B1502**.

9. Avisos e precauções

- Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Utilizar sempre luvas sem talco descartáveis e vestuário de laboratório adequado ao manusear as amostras e os reagentes.
- Preparar a reação numa área separada da preparação de ácidos nucleicos e da análise do produto de PCR.
- Utilizar pipetas dedicadas apenas à configuração da PCR e pontas de pipeta com filtro de barreira de aerossóis.
- Utilizar recipientes de reação compatíveis com o instrumento e com tampas ou vedantes transparentes.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes.
- Não utilizar kits ou componentes do kit que estejam fora do prazo de validade.