

CYP2C9 mpx RealFast™ Assay

REF 7-225 / 7-228 Σ 100 / 32 reactions
-30°C / -15°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 CYP2C9 mpx RealFast™ Assay is a fast and accurate multiplex real-time PCR test for the simultaneous detection of the c.430C>T (CYP2C9*2) and c.1075A>C (CYP2C9*3) polymorphisms in the human CYP2C9 gene. Both variants of the CYP2C9 enzyme, *2 and *3, exhibit decreased function leading to poor metabolism (PM) phenotypes for various drugs. Patients with low enzyme activity are at risk of adverse drug reactions or therapeutic failure, particularly for CYP2C9 substrates with a narrow therapeutic window, such as S-warfarin or phenytoin. The kit is designed to identify patients carrying one or two copies of the CYP2C9 *2 or *3 variants. In a human DNA extract the qualitative assay discriminates the possible CYP2C9 genotypes: normal *1*1, heterozygous *1*2, *1*3 or *2*3, homozygous *2*2 or *3*3. Ref.Seq.: NM_000771.3: c.430C>T, dbSNP rs1799853 (CYP2C9*2) and c.1075A>C, dbSNP rs1057910 (CYP2C9*3).

2. Introduction

The CYP2C9 isoform is a drug-metabolizing enzyme of the cytochrome P450 superfamily that is highly expressed in the liver. It is estimated to be responsible for the clearance of up to 20% of all drugs undergoing phase I metabolism. CYP2C9*2 and CYP2C9*3, the two most common decreased function alleles among individuals of European ancestry, account for interindividual variability in drug response. For instance, individuals with PM phenotype (i.e. genotypes with homozygous or compound heterozygous *2 or *3 alleles) are at greater risk of severe bleeding during coumarin-based anticoagulation therapy, such as warfarin, acenocoumarol and - to a lesser extent - phenprocoumon. Furthermore, PM phenotypes experience more frequent symptoms of overdose when treated with the anti-epileptic drug phenytoin.

3. Kit Contents

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 vial □ white cap	1000 / 320 µl
CYP2C9 mpx Assay Mix	1 vial ■ purple cap	550 / 550 µl
CYP2C9 mpx *1*1-Control	1 vial ■ green cap	75 / 75 µl
CYP2C9 mpx *2*3-Control	1 vial ■ red cap	75 / 75 µl

The RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The CYP2C9 mpx Assay Mix consists of CYP2C9 gene-specific primers and four allele-specific, dual-labeled hydrolysis probes. Controls representing CYP2C9*1, *2 and *3 variants 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

The CYP2C9 mpx RealFast™ Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -30 to -15°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 two gene-specific primer pairs which amplify a 184 bp (*2) and 140 bp (*3) fragment of the CYP2C9 gene, respectively, as well as four dual-labeled, allele-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequences of the amplified fragments. 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.

CYP2C9 probe	Fluorophore	Channel
*2 (c.430T)	FAM	520 nm
*1 (c.430C)	HEX	556 nm
*3 (c.1075C)	ROX	605 nm
*1 (c.1075A)	Cy5	670 nm

In normal samples the ***1 (c.430C, c.1075A) probes** generate a strong fluorescence signal in the HEX or Cy5 channel and no or only a baseline signal in the FAM or ROX channel. Vice versa, in homozygous variant samples the hybridized ***2 (c.430T)** or ***3 (c.1075C) probes** generate a strong fluorescence signal in the FAM or ROX channel and no or only a baseline signal in the HEX or Cy5 channel. In heterozygous *1*2 (c.430CT) or *1*3 (c.1075AC) samples both probes bind to the amplicons and generate intermediate signals in both channels.

5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The CYP2C9 mpx 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®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

The kit is **not suitable** for use with real-time PCR instruments requiring ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments: StepOne™, 7300, 7900/7900HT) or for instruments without appropriate fluorescence detection channels.

5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 55 CYP2C9 *2 alleles and 35 CYP2C9 *3 alleles, both tested with a CE-marked reference kit. The CYP2C9 mpx RealFast™ Assay correctly determined all *2 and *3 alleles, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 307 alleles testing negative for CYP2C9 *2 and 327 alleles testing negative for CYP2C9 *3 with a CE-marked reference kit. The CYP2C9 mpx RealFast™ Assay correctly determined all negative *2 and *3 alleles, which equaled a true negative rate of 100%.

Limit of detection: 0.2 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), HEX (556 nm), ROX (605 nm) and Cy5 (670nm) 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 CYP2C9 *1*1-Control and CYP2C9 *2*3-Control as positive reference signals for your unknown samples. Some real-time PCR software, e.g. AB 7500 Fast, requires signals for all three possible genotypes for correct allelic discrimination. In order to obtain a heterozygous control (*1*2- and *1*3-Control), mix an aliquot of *1*1-Control and *2*3-Control in a ratio of 1:1.

» **Note:** *1*1- and *2*3-Controls are potential sources of contamination. Make sure to handle them carefully. «

7.3. Preparation of CYP2C9 mpx RealFast™ Master Mixes:

For each sample set up two reactions, one for CYP2C9*2 and one for CYP2C9*3.

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 controls + negative controls) plus at least one additional reaction to compensate for pipetting inaccuracies:

Component	per reaction	e.g. 24+1 reactions
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
CYP2C9 mpx 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 positive 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 allelic discrimination / genotyping experiments. Place the samples into the thermal cycler and run the following program:

Program			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, and other Peltier heating-block based instruments	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Cycles	Temp	Time	Steps	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation	Denaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Data acquisition on FAM, HEX, ROX and Cy5 channels	Annealing/Extension – Data acquisition on Green, Yellow, Orange and Red channels

8. Data Analysis / Interpretation of Results

The genotype of each sample is determined by calculating the ratio between signals recorded in the **HEX or Cy5 channel (normal)** and signals recorded in the **FAM or ROX channel (mutiert)**. Most real-time PCR software automatically resolves data of two channels into clusters in a scatterplot. Data points plotted along the x- and y-axes correspond to normal and homozygous variant genotypes, respectively. Data points clustered in the middle of the scatterplot represent heterozygous genotypes. The NTC appears in the lower left corner.

Controls / Samples	Amplification in channel				Genotype CYP2C9 variants
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
*1*1-Control	NO	YES	NO	YES	*1*1 (normal)
*1*2 / *1*3-Control	YES	YES	YES	YES	*2*3 (heterozygous)
*2*3-Control	YES	NO	YES	NO	---- (positive control for *2 and *3)
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Sample 1	YES	YES	NO	YES	*1*2 (heterozygous)
Sample 2	NO	YES	YES	YES	*1*3 (heterozygous)
Sample 3	YES	NO	NO	YES	*2*2 (homozygous)
Sample 4	NO	YES	YES	NO	*3*3 (homozygous)

Some instrument software needs manual threshold settings for accurate genotype calling.

Recommendations for Threshold Settings (C_q):

Set threshold value for the FAM and ROX channels just above the background fluorescent signal generated by the *1*1-Control (HEX-/Cy5-positive). Vice versa, set threshold value for the HEX and Cy5 channels just above the background fluorescent signal of the *2*3-Control (FAM-/ROX positive).

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* diagnostic 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.

CYP2C9 mpx 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 7-225 / 7-228 Σ 100 / 32 Reaktionen

-30°C / -15°C



1. Verwendungszweck

Der CYP2C9 mpx RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur gleichzeitigen Detektion der c.430C>T (CYP2C9*2) und c.1075A>C (CYP2C9*3) Polymorphismen im humanen CYP2C9 Gen. Beide Varianten des CYP2C9 Enzyms, *2 und *3, zeigen eine verringerte Funktion, die zum Phänotyp eines „poor“ (PM) Metabolizer für verschiedene Medikamente führt. Patienten mit geringer Enzymaktivität sind dem Risiko von Nebenwirkungen oder Nichtansprechen medikamentöser Therapien ausgesetzt, vor allem bei einem CYP2C9 Substrat mit engem therapeutischen Fenster, wie S-warfarin oder Phenytoin. Der Kit dient zur Identifizierung von Patienten die eine oder zwei Kopien der CYP2C9 *2 oder *3 Varianten tragen. Der qualitative Test weist in einem humanen DNA-Extrakt die möglichen CYP2C9 Genotypen nach: normal *1*1, heterozygot *1*2, *1*3 oder *2*3, homozygot *2*2 oder *3*3. Referenzsequenz: NM_000771.3; c.430C>T, dbSNP rs1799853 (CYP2C9*2) und c.1075A>C, dbSNP rs1057910 (CYP2C9*3).

2. Einleitung

Die CYP2C9 Isoform ist ein Phase I metabolisierendes Enzym der Cytochrome P450 Familie, das in der Leber hoch exprimiert wird. Es wird angenommen, dass es für den Abbau von bis zu 25% aller Phase I metabolisierten Medikamente verantwortlich ist. CYP2C9*2 und CYP2C9*3, die häufigsten Allele mit verringerter Funktion in Individuen europäischer Abstammung, sind für die Variabilität zwischen Patienten auf das Ansprechen von Medikamenten verantwortlich. Beispielsweise haben Individuen mit dem PM-Phänotyp (das sind homozygote oder komplex heterozygote Genotypen mit *2 oder *3 Allelen) ein erhöhtes Risiko von schweren Blutungen während einer Coumarin-basierten Antikoagulationstherapie, wie Warfarin, Acenocoumarol und – in einem geringeren Ausmaß – Phenprocoumon. Weiters zeigen PM-Phänotypen häufiger Symptome einer Überdosierung bei der Behandlung mit dem anti-epileptischen Wirkstoff Phenytoin.

3. Kit Bestandteile

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix 1 Vial weisser Deckel 1000 / 320µl
CYP2C9 mpx Assay Mix 1 Vial violetter Deckel 550 / 550µl
CYP2C9 mpx *1*1-Control 1 Vial grüner Deckel 75 / 75µl
CYP2C9 mpx *2*3-Control 1 Vial roter Deckel 75 / 75µl

Der RealFast™ 2x mpx Probe Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der CYP2C9 mpx Assay Mix besteht aus CYP2C9 genspezifischen Primern und vier allelspezifischen, doppelt-markierten Hydrolyse-sonden. Weiters sind Kontrolltemplates für CYP2C9*1, *2 und *3 Varianten im Kit vorhanden.

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

4. Lagerung und Stabilität

Der CYP2C9 mpx RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°C. Alternativ bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2-8°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 zwei genspezifische Primerpaare zur Amplifizierung eines 184 bp (*2) und eines 140 bp (*3) Fragments im CYP2C9 Gen, sowie vier doppelt-markierte, allelspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz der amplifizierten Fragmente 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 normalen Proben erzeugen die *1 (c.430C, c.1075A) Sonden ein starkes Fluoreszenzsignal im HEX- bzw. Cy5-Kanal und kein oder an der Basislinie liegendes Signal im FAM- bzw. ROX-Kanal. Im Fall von homozygot mutierten Proben erzeugen die *2 (c.430T) bzw. *3 (c.1075C) Sonden ein starkes Signal im FAM- bzw. ROX-Kanal, und kein oder an der Basislinie liegendes Signal im HEX- bzw. Cy5-Kanal. Bei heterozygoten *1*2 (c.430CT) oder *1*3 (c.1075AC) Proben binden beide Sonden an die Amplikons und verursachen ein intermediäres Signal in den entsprechenden Detektionskanälen.

CYP2C9 Sonde	Fluorophor	Kanal
*2 (c.430T)	FAM	520 nm
*1 (c.430C)	HEX	556 nm
*3 (c.1075C)	ROX	605 nm
*1 (c.1075A)	Cy5	670 nm

5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der CYP2C9 mpx 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-, HEX-, Cy5- and ROX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel:

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

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

Der Kit **eignet sich nicht** für die Verwendung mit real-time PCR Geräten, die ROX zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 55 CYP2C9 *2 Allelen und 35 CYP2C9 *3 Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der CYP2C9 mpx RealFast™ Assay typisierte alle positiven *2 und *3 Allele richtig = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 307 negativen CYP2C9 *2 und 327 negativen *3 Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der CYP2C9 mpx RealFast™ Assay typisierte alle negativen *2 und *3 Allele richtig = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 ng genomische DNA (pro Reaktion). Empfohlene DNA Konzentration: 2 bis 20 ng/µl genomische DNA.

6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM-(520 nm), HEX-(556 nm), ROX-(610 nm) and Cy5-(660nm) Filter, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionssystem, 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.

Führen Sie in jedem Lauf **immer** die **CYP2C9 *1*1-Control** und **CYP2C9 *2*3-Control** als Referenzsignale für unbekannte Proben durch. Einige real-time PCR Programme, beispielsweise für AB 7500 Fast, erfordern zur korrekten Auswertung im "Allelic Discrimination Plot" Signale für alle drei möglichen Genotypen. Zur Herstellung einer heterozygoten Kontrolle (*1*/2- und *1*/3-Control) mischen Sie ein Aliquot von *1*1-Control und *2*3-Control im Verhältnis 1:1.

» **Anmerkung:** *1*1- und *2*3-Controls stellen potentielle Kontaminationsquellen dar und müssen daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

7.3. Vorbereitung des CYP2C9 mpx 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. 24+1 Reaktionen
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
CYP2C9 mpx 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 Positivkontrollen. Reaktionsgefäße sofort verschließen.

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

7.4. PCR Programm

Programmieren Sie Ihr real-time PCR Gerät wie vom Hersteller angegeben für "Allelic Discrimination" oder "Genotyping" Experimente. Stellen Sie die PCR-Ansätze in den Thermocycler und starten Sie folgendes Programm.

Programm			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, und andere Peltier-Heizblock- basierende Geräte	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Zyklen	Temp	Zeit	Schritt	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung	Denaturierung
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Datenaufnahme im FAM-, HEX-, ROX- und Cy5-Kanal	Annealing/Extension – Datenaufnahme im Green-, Yellow-, Orange- und Red-Kanal

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Der Genotyp einer Probe wird aufgrund des Signalverhältnisses zwischen den Aufnahmekanälen berechnet. Dabei wird das im **HEX-** oder **Cy5-Kanal (normal)** detektierte Signal mit dem im **FAM-** oder **ROX-Kanal (mutiert)** detektierten Signal verglichen. Die meisten real-time PCR Auswertprogramme stellen die Daten zweier Kanäle automatisch als Streudiagramm (Scatterplot) dar. Datenpunkte entlang der X- bzw. Y-Achsen entsprechen normalen bzw. homozygot mutierten Genotypen, während Datenpunkte in der Mitte des Scatterplots heterozygoten Genotypen entsprechen. Die NTC erscheint links unten.

Kontrollen / Proben	Amplifikation pro Kanal				Genotyp CYP2C9 Varianten
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
*1*1-Control	NEIN	JA	NEIN	JA	*1*1 (normal)
*1*2 / *1*3-Control	JA	JA	JA	JA	*2*3 (heterozygot)
*2*3-Control	JA	NEIN	JA	NEIN	---- (Positiv-Kontrolle für *2 und *3)
NTC	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN	----
Probe 1	JA	JA	NEIN	JA	*1*2 (heterozygot)
Probe 2	NEIN	JA	JA	JA	*1*3 (heterozygot)
Probe 3	JA	NEIN	NEIN	JA	*2*2 (homozygot)
Probe 4	NEIN	JA	JA	NEIN	*3*3 (homozygot)

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

Empfehlungen zur Einstellung des Schwellenwertes (C_q):

Setzen Sie den Schwellenwert für den FAM- und ROX-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der *1*1-Control (HEX-/Cy5-positiv). Setzen Sie umgekehrt den Schwellenwert für den HEX- und Cy5-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der *2*3-Control (FAM-/ROX-positiv). Proben, die den Schwellenwert nach C_q 37 übersteigen, gelten als ungünstiges 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, gerätekompabile PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.

CYP2C9 mpx RealFast™ Assay

REF 7-225 / 7-228 100 / 32 réactions

-30°C -15°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. Utilisation

Le CYP2C9 mpx RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter simultanément les polymorphismes c.430C>T (CYP2C9*2) et c.1075A>C (CYP2C9*3) dans le gène humain CYP2C9. Les deux variantes de l'enzyme CYP2C9, *2 et *3, présentent une fonction restreinte conduisant au phénotype d'un métabolisme "pauvre" (PM) pour différents médicaments. Les patients présentant une faible activité enzymatique risquent d'avoir des effets secondaires ou de ne pas répondre aux pharmacothérapies, en particulier dans le cas d'un substrat CYP2C9 ayant une fenêtre thérapeutique étroite, comme la S-warfarine ou la phénytoïne. Ce kit permet d'identifier les patients porteurs d'une et de deux copies des variantes CYP2C9*2 ou *3. Ce test qualitatif permet de distinguer un des trois génotypes CYP2C9 possibles dans un extrait d'ADN: normal *1*1, hétérozygote *1*2, *1*3 ou *2*3 ou homozygote *2*2 ou *3*3.

Séquence de référence: NM_000771.3; c.430C>T, dbSNP rs1799853 (CYP2C9*2) / c.1075A>C, dbSNP rs1057910 (CYP2C9*3)

2. Introduction

L'isoforme CYP2C9 est une enzyme métabolisante de phase I de la famille des cytochromes P450, fortement exprimée dans le foie. On croit qu'il est responsable de la dégradation de jusqu'à 25 % de tous les médicaments métabolisés de la phase I. Les allèles CYP2C9*2 et CYP2C9*3, les allèles les plus communs ayant une fonction restreinte chez les personnes d'ascendance européenne, sont responsables de la variabilité entre les patients quant à la réaction au médicament. Par exemple, les personnes présentant un phénotype de MP (génotypes homozygote ou hétérozygote complexe avec des allèles *2 ou *3) présentent un risque accru d'hémorragie grave pendant le traitement anticoagulant à base de coumarine comme la warfarine, l'acénocoumarol et, dans une moindre mesure, le phénprocoumon. De plus, les phénotypes PM présentent fréquemment des symptômes de surdosage lors du traitement par l'agent anti-épileptique phénytoïne.

3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx **Probe Mix** 1 Vial couvercle blanc 1000 / 320 µl
CYP2C9 Leiden **Assay Mix** 1 Vial couvercle violet 550 / 550 µl
CYP2C9 mpx *1*1-**Control** 1 Vial couvercle vert 75 / 75 µl
CYP2C9 mpx *2*3-**Control** 1 Vial couvercle rouge 75 / 75 µl

Le RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le CYP2C9 mpx Assay Mix se compose de primers génospcifiques CYP2C9 tout comme de quatre sondes d'hydrolyse spécifique d'allèle. De plus vous disposez dans le kit de témoins pour les variantes CYP2C9 *1, *2 et *3.

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

4. Stockage et stabilité

Le CYP2C9 mpx RealFast™ Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception de -30 à -15°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 une paire de primers génospcifiques qui amplifie un fragment 184 bp (2*) et un fragment 140 bp (3*) du gène CYP2C9, tout comme quatre sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques, munies d'un marqueur double, qui s'hybride à la séquence cible des fragments amplifiés.

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 normaux, les **sondes 1* (c.430C., c.1075A)** affichent un fort signal fluorescent dans le canal HEX ou Cy5 et aucun ou un signal moins fort sur la ligne de base dans le canal FAM ou ROX. Inversement, dans des échantillons mutés homozygotes, les **sondes *2 (c.430T) et *3 (c.1075C)** affichent un signal fluorescent fort dans le canal FAM ou ROX et aucun ou un signal plus faible sur la ligne de base dans le canal HEX ou Cy5. Pour les échantillons hétérozygotes *1*2 (c.430CT) ou *1*3 (c.1075AC), les deux sondes se lient aux amplicons et génèrent un signal intermédiaire dans les deux canaux de détection.

5.2. Compatibilité avec les machines de la PCR temps réel

Le CYP2C9 mpx RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast. Le kit est compatible avec différents appareils standards du commerce de la PCR en temps réel capables de détecter la fluorescence FAM, HEX, Cy5 et ROX:

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

» **Remarque** : RealFast™ Genotyping QuickGuides pour la programmation et l'exploitation des RealFast™ Assays sur différents types d'appareils peuvent être téléchargées à partir de: www.viennalab.com. «

Le kit **ne convient pas** à une utilisation sur des appareils de la PCR en temps réel, qui nécessitent ROX pour normaliser les données (par ex. appareils Applied Biosystems: StepOne, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 55 allèles positifs CYP2C9*2 et de 35 CYP2C9*3 qui ont été testés à partir d'un test de référence certifié CE. Le CYP2C9 mpx RealFast™ Assay a typé positifs tous les allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La **spécificité** a été déterminée à partir de 307 allèles CYP2C9*2 négatifs et de 327 allèles CYP2C9*3 négatifs qui ont été testés à partir d'un test de référence certifié CE. Le CYP2C9 mpx RealFast™ Assay a typé correctement tous les allèles négatifs *2 et *3, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100 %.

Limite de détection: 0.2 ng ADN génomique (par réaction) Concentration d'ADN recommandée: 2 à 20 ng/µl ADN génomique

6. Matériel nécessaire, mais non fourni

Appareil de la PCR en temps réel avec des filtres FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) et Cy5 (670nm), des 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.

Effectuez **toujours** le CYP2C9 **Control** *1*1* et le CYP2C9 **Control** *2*3 pour chaque test comme signaux de référence pour des échantillons inconnus. Certains logiciels de la PCR en temps réel, comme par ex. AB 7500 Fast, nécessitent pour interpréter correctement les résultats des signaux pour l'ensemble des trois génotypes possibles dans la "Allelic Discrimination Plot". Pour réaliser un contrôle hétérozygote (Control *1*/*2 et *1*/*3) mélangez une aliquote du *1*/*1-Control et du *2*3-Control dans un rapport 1:1.

» **Remarque:** les contrôles *1*/*1 et *2*3 représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin. «

7.3. Préparation du CYP2C9 mpx 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 mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
CYP2C9 mpx 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 discrimination allélique ou de génotypage. Mettez les échantillons PCR dans le thermocycleur et lancez le programme suivant:

Programme			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, et autres appareils reposant sur le bloc thermique Peltier	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Cycles	Temp	Durée	Étape	Étape
1	95°C	3 min	Dénaturation initiale	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation	Dénaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Réception des données dans le canal FAM, HEX, ROX et Cy5	Annealing/Extension – Réception des données dans le canal respectif: Green, Yellow, Orange et Red

8. Analyse des données / interprétation des résultats

Le génotype d'un échantillon est déterminé à partir du rapport de signal entre les canaux de réception. Le signal détecté dans le **canal HEX** ou **Cy5 (normal)** est pour ce faire comparé au signal détecté dans le **canal FAM** ou **ROX (muté)**. La plupart des programmes d'évaluation PCR en temps réel représentent automatiquement les données issues des deux canaux sous forme d'un nuage de points. Les points de données se situant le long des axiales X- à savoir Y correspondent au génotype normal, à savoir homozygote muté, tandis que les points de données situés au milieu du nuage de points correspondent au génotype hétérozygote. La NTC apparaît en bas à gauche.

Contrôles / Échantillons	Amplification par canal				Génotype Variantes CYP2C9
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
1/*1-Control	NON	OUI	NON	OUI	*1*/*1 normal
1*2*/1*3-Control	OUI	OUI	OUI	OUI	*2*3 hétérozygote
*2*3-Control	OUI	NON	OUI	NON	---- (contrôle positif pour *2 et *3)
NTC	NON	NON	NON	NON	----
Échantillon 1	OUI	OUI	NON	OUI	1*2 (hétérozygote)
Échantillon 2	OUI	NEIN	NON	OUI	1*3 (hétérozygote)
Échantillon 3	NON	OUI	OUI	OUI	*2*2 (homozygote)
Échantillon 4	NON	OUI	OUI	NON	*3*3 (homozygote)

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

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

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM ou ROX juste au-dessus du signal fluorescent de fond généré par le contrôle *1*/*1 (HEX/Cy5 positif).

Fixez à l'inverse la valeur seuil pour le canal HEX et Cy5 juste au-dessus du signal fluorescent de fond du contrôle *2*3 (FAM/ROX positif).

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.

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.

CYP2C9 mpx RealFast™ Assay

REF 7-225 / 7-228 100 / 32 reazioni
-30°C -15°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. Utilizzo

Il CYP2C9 mpx RealFast™ Assay è un test multiplex in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione simultanea dei polimorfismi c.430C>T (CYP2C9*2) e c.1075A>C (CYP2C9*3) del gene umano CYP2C9. Entrambe le varianti dell'enzima CYP2C9, *2 e *3, mostrano una funzione ridotta che comporta fenotipi con scarso metabolismo (PM) per diversi farmaci. I pazienti con bassa attività enzimatica sono a rischio di reazioni avverse ai farmaci o di fallimento terapeutico, particolarmente per i substrati del gene CYP2C9 con una finestra terapeutica stretta, come l'S-warfarin o la fenitoina. Il kit è destinato a individuare pazienti portatori di una o due copie delle varianti CYP2C9*2 o *3. In un estratto di DNA umano, l'esame qualitativo discrimina i possibili genotipi di CYP2C9: *1*1 normale, *1*2, *1*3 o *2*3 eterozigote, *2*2 o *3*3 omozigote.

Sequenza di riferimento: NM_000771.3: c.430C>T, dbSNP rs1799853 (CYP2C9*2) e c.1075A>C, dbSNP rs1057910 (CYP2C9*3).

2. Introduzione

L'isoforma CYP2C9 è un enzima per la metabolizzazione dei farmaci appartenente alla superfamiglia del citocromo P450 avente un'elevata espressione nel fegato. E' ritenuto essere responsabile della clearance di circa il 20% di tutti i farmaci che subiscono il metabolismo di fase I. CYP2C9*2 e CYP2C9*3, i due alleli a funzione ridotta più comuni tra i soggetti di discendenza europea, spiegano la variabilità interindividuale nella risposta al farmaco. Per esempio, i soggetti con fenotipo PM (ovvero i genotipi con alleli *2 o *3 omozigoti o eterozigoti composti) hanno un maggiore rischio di sanguinamento severo durante la terapia anticoagulante a base di cumarina, come la warfarina, l'acenocumarolo e, in minor misura, il fenprocumone. Inoltre, i fenotipi PM mostrano sintomi più frequenti di sovradosaggio se trattati con il farmaco antiepilettico fenitoina.

3. Contenuto del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 fiala □ tappo bianco	1000 / 320 µl
CYP2C9 mpx Assay Mix	1 fiala ■ tappo viola	550 / 550 µl
CYP2C9 mpx *1*1-Control	1 fiala ■ tappo verde	75 / 75 µl
CYP2C9 mpx *2*3-Control	1 fiala ■ tappo rosso	75 / 75 µl

Il RealFast™ 2x mpx Probe Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTPs in un sistema tampone ottimizzato. Il CYP2C9 mpx Assay Mix consiste di primer specifici per il gene CYP2C9 e di quattro sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta. Insieme al kit sono forniti controlli che rappresentano le varianti CYP2C9*1, *2 e *3.

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

4. Conservazione e stabilità

Il CYP2C9 mpx RealFast™ Assay viene inviato su blocchi refrigeranti. Al suo arrivo, conservare il kit da -30 a -15°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. Ciascuna reazione contiene due coppie di primer gene-specifici che amplificano un frammento di 184 bp (*2) e 140 bp (*3) del gene CYP2C9, rispettivamente, e quattro sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta che ibridano con le sequenze target dei frammenti amplificati. 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.

Sonda CYP2C9	Fluoroforo	Canale
*2 (c.430T)	FAM	520 nm
*1 (c.430C)	HEX	556 nm
*3 (c.1075C)	ROX	605 nm
*1 (c.1075A)	Cy5	670 nm

Nei campioni normali le sonde *1 (c.430C, c.1075A) generano un forte segnale di fluorescenza nel canale HEX o Cy5 e nessun segnale o soltanto un segnale di base nel canale FAM o ROX. Viceversa, nei campioni con variante omozigote le sonde ibridate *2 (c.430T) o *3 (c.1075C) generano un forte segnale di fluorescenza nel canale FAM o ROX e nessun segnale o soltanto un segnale di base nel canale HEX o Cy5. Nei campioni eterozigoti *1*2 (c.430CT) o *1*3 (c.1075AC) entrambe le sonde si legano agli ampliconi, generando segnali intermedi in entrambi i canali.

5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

Il CYP2C9 mpx 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, HEX, Cy5 e ROX:

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

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

Il kit non è idoneo all'uso con strumenti Real-time PCR che richiedano il ROX per la normalizzazione dei dati (per es. strumenti Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT) né per strumenti privi di adeguati canali di rilevazione della fluorescenza.

5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della sensibilità è stata eseguita su 55 alleli CYP2C9*2 e 35 CYP2C9*3, entrambi testati con un kit di riferimento marchiato CE. Il CYP2C9 mpx RealFast™ Assay ha determinato correttamente la positività di tutti gli alleli *2 and *3, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della specificità è stata eseguita su 307 alleli risultati negativi per CYP2C9 *2 e 327 alleli risultati negativi per CYP2C9 *3 con kit di riferimento marchiato CE. L' CYP2C9 mpx RealFast™ Assay ha determinato correttamente la negatività di tutti gli alleli alle varianti *2 e *3, con una percentuale di veri negativi pari al 100%.

Limite di rilevazione: 0.2 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) HEX (556 nm), ROX (605 nm) e Cy5 (670nm), contenitori di reazione 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** il **CYP2C9*1*1-Control** e il **CYP2C9*2*3-Control** come segnali di riferimento positivi per i campioni non noti. Alcuni software Real-time PCR, per es. AB 7500 Fast, richiedono segnali per tutti e tre i possibili genotipi per una corretta discriminazione allelica. Allo scopo di ottenere un controllo eterozigote (*1*2- e *1*3-Control, miscelare un'aliquota di *1*1-Control and *2*3-Control in un rapporto di 1:1.

» **Nota:** Gli *1*1- e *2*3-Control costituiscono potenziali fonti di contaminazione. Assicuratevi di maneggiarli con cautela. «

7.3. Preparazione di CYP2C9 mpxRealFast™ Master Mix

Per ciascun campione allestire due reazioni, una per CYP2C9*2 e una per CYP2C9*3.

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:

Componente	Per reazione	per es. 24+1 reazioni
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
CYP2C9 mpx 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 discriminazione allelica / genotipizzazione. Collocare i campioni nel termociclatore e svolgere il seguente programma:

Programma			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, altri strumenti Peltier basati su blocco di riscaldamento	MIC, Rotor-Gene® 6000 (rotore a 36 e 72 pozzetti)
Cicli	Temp	Tempo	Step	Step
1	95°C	3 min	Denaturazione iniziale	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione	Denaturazione
	60°C	1 min	Annealing/Estensione –	Annealing/Estensione –
			Acquisizione dei dati nei canali FAM, HEX, ROX e Cy5	Acquisizione dei dati nei canali Green, Yellow, Orange e Red

8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

Il genotipo di ciascun campione si determina calcolando il rapporto tra i segnali registrati nel **canale HEX o CY5 (normale)** e i segnali registrati nel canale **FAM o ROX (mutante)**. La maggior parte dei software Real-time PCR risolve automaticamente i dati di entrambi i canali in 'cluster' in un grafico a dispersione. I punti dati rappresentati sull'asse delle ascisse e sull'asse delle ordinate corrispondono, rispettivamente, a genotipi normali e omozigoti mutanti. I punti dati raggruppati in 'cluster' al centro del grafico rappresentano i genotipi eterozigoti. L'NTC compare nell'angolo sinistro in basso.

Controlli / Campioni	Amplificazione nel canale				Genotipo Varianti CYP2C9
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
*1*1-Control	NO	SI	NO	SI	*1*1 (normale)
1*2 / *1*3-Control	SI	SI	SI	SI	*2*3 (eterozigote)
*2*3-Control	SI	NO	SI	NO	---- (controllo positivo per *2 e *3)
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Campione 1	SI	SI	NO	SI	*1*2 (eterozigote)
Campione 2	NO	SI	SI	SI	*1*3 (eterozigote)
Campione 3	SI	NO	NO	SI	*2*2 (omozigote)
Campione 4	NO	SI	SI	NO	*3*3 (omozigote)

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

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

Impostare la soglia per i canali FAM e ROX immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal *1*1-Control (HEX-/Cy5-positivo). Viceversa, impostare la soglia per i canali HEX e Cy5 immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal *2*3-Control (FAM-/ROX-positivo).

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.

CYP2C9 mpx 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 7-225 / 7-228 Σ 100 / 32 reacciones
-30°C -15°C  



1. Aplicación





CYP2C9 mpx RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección simultánea de polimorfismos c.430C>T (CYP2C9*2) y c.1075A>C (CYP2C9*3) en el gen humano CYP2C9. Ambas variantes de la enzima CYP2C9, *2 y *3, muestran una función reducida que conduce al fenotipo de un metabolizador "pobre" (PM) para diversos fármacos. Los pacientes con una baja actividad enzimática corren el riesgo de sufrir efectos secundarios o no responder a las terapias farmacológicas, como S-warfarina o fenitoína, especialmente para un sustrato de CYP2C9 con un reducido rango terapéutico en la respuesta. El kit está diseñado para identificar pacientes que portan una o dos copias de las variantes CYP2C9*2 o *3. La prueba cualitativa detecta los posibles genotipos de CYP2C9 en un extracto de ADN humano: normal *1*1, heterocigoto *1*2, *1*3 o *2*3, homocigoto *2*2 o *3*3.
Secuencia de referencia: NM_000771.3; c.430C>T, dbSNP rs1799853 (CYP2C9*2) y c.1075A>C, dbSNP rs1057910 (CYP2C9*3).

2. Introducción

La isoforma CYP2C9 es una enzima metabolizante de fase I de la familia del citocromo P450 que está altamente expresada en el hígado. Se cree que es responsable de la degradación de hasta un 25% de todos los fármacos metabolizados de Fase I. CYP2C9*2 y CYP2C9*3, los alelos más comunes con función reducida en individuos de ascendencia europea, son responsables de la variabilidad entre los pacientes sobre la respuesta al fármaco. Por ejemplo, los individuos con el fenotipo PM (es decir homocigotos o genotipos heterocigotos complejos con alelos *2 o *3) tienen un mayor riesgo a padecer un intenso sangrado durante la terapia de anticoagulación basada en cumarina, como warfarina, acenocumarol y, en menor medida, fenprocumón. Además los fenotipos de PM muestran con mayor frecuencia síntomas de sobredosis en el tratamiento con el fármaco antiepiléptico fenitoína.

3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 vial  tapón blanco	1000 / 320 µl
CYP2C9 mpx Assay Mix	1 vial  tapón violeta	550 / 550 µl
CYP2C9 mpx *1*1-Control	1 vial  tapón verde	75 / 75 µl
CYP2C9 mpx *2*3-Control	1 vial  tapón rojo	75 / 75 µl

RealFast™ 2x mpx Probe Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer. CYP2C9 mpx Assay Mix se compone de CYP2C9 cebadores (primers) de genes específicos y cuatro sondas de hidrólisis, doblemente marcadas alelo-específicas. Además en el kit se incluyen las plantillas de control para las variantes *1, *2 y *3 de CYP2C9.

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

4. Almacenamiento y estabilidad

CYP2C9 mpx RealFast™ Assay se suministra sobre bloques de enfriamiento. Conserve el kit de -30 a -15°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 un par de cebadores (primers) específicos de gen para la amplificación de un fragmento de 184 bp (*2) y de 140 bp (*3) en el gen CYP2C9, así como cuatro sondas de hidrólisis doblemente marcadas alelo específicas, que enlazan con la secuencia de objetivo del fragmento amplificado.

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.

Sonda CYP2C9	Fluoróforo	Canal
*2 (c.430T)	FAM	520 nm
*1 (c.430C)	HEX	556 nm
*3 (c.1075C)	ROX	605 nm
*1 (c.1075A)	Cy5	670 nm

En muestras normales, **las sondas *1 (c.430C, c.1075A)** generan una fuerte señal de fluorescencia en el canal HEX o Cy5 y ninguna o sólo una señal en la línea de base en el canal FAM o ROX. En el caso de pruebas de homocigotos mutantes, **las sondas *2 (c.430T)** o bien ***3 (c.1075C)** generan una fuerte señal en el canal FAM o ROX, y ninguna o sólo una señal en la línea de base en el canal HEX o Cy5. En muestras heterocigotas *1*2 (c.430CT) o *1*3 (c.1075AC) las dos sondas se unen a los amplicones y generan una señal intermedia en los canales de detección correspondientes.

5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

Está autorizado el uso de CYP2C9 mpx RealFast™ Assay con el aparato AB 7500 Fast.

El kit es compatible con diferentes aparatos convencionales de PCR en tiempo real, que puedan detectar fluorescencia FAM, HEX, Cy5 y ROX:

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

» **Nota:** RealFast Genotyping QuickGuides para la programación y evaluación de RealFast™ Assays en diferentes aparatos están disponibles para su descarga en www.viennalab.com. «

El kit **no se puede utilizar** con aparatos de PCR en tiempo real, que requieran ROX para la normalización de los datos (por ejemplo: dispositivos de Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Especificaciones de la prueba

La **sensibilidad** se determinó en base a los alelos 55 CYP2C9*2 y 35 alelos *3, evaluados con un test de referencia de marcado CE. El ensayo CYP2C9 mpx RealFast™ Assay tipificó correctamente todos los alelos positivos, lo que equivale a una tasa de verdaderos positivos del 100%.

La **especificidad** se determinó en base a los 307 alelos negativos CYP2C9*2 y 327 alelos negativos *3, evaluados con una prueba de marcado de CE. El ensayo CYP2C9 mpxRealFast™ Assay tipificó correctamente todos los alelos negativos *2 y *3 = lo que equivale a una tasa de verdaderos negativos del 100%.

Límite de detección: 0.2 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 filtros FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) y Cy5 (670nm), recipientes PCR ópticos compatibles con los aparatos, guantes desechables sin polvo, agitador tipo 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.

Realice en cada ejecución **siempre** el CYP2C9 *1*1-Control y CYP2C9 *2*3-Control como señales de referencia para las muestras desconocidas. Algunos programas del PCR en tiempo real, tales como AB 7500 Fast, requieren para la correcta evaluación en el "Allelic Discrimination Plot" señales para los tres posibles genotipos. Para realizar un control heterocigoto (*1*2- y *1*3-Control) mezcle una alícuota de *1*1-Control y de *2*3-Control en la proporción 1: 1.

» **Nota:** Los controles *1*1 y *2*3 pueden ser fuentes potenciales de contaminación y por lo tanto deben manipularse con mucho cuidado. «

7.3. Preparación de CYP2C9 mpx 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 mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
CYP2C9 mpx Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

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

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 la fluorescencia. Si es necesario centrifugar brevemente. «

7.4. Programa PCR

Programa su aparato PCR en tiempo real según lo especificado por el fabricante para experimentos "Allelic Discrimination" o genotipado". Coloque los depósitos de PCR en el termociclador y ejecute el siguiente programa:

Programa			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, y otros aparatos basados en el bloque de calentamiento Peltier	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Ciclos	Temp	Tiempo	Paso	Paso
1	95°C	3 min	Desnaturalización inicial	Desnaturalización inicial
40	95°C	15 seg	Desnaturalización	Desnaturalización
	60°C	1 min	Annealing/extensión – registro de datos en el canal FAM, HEX, ROX y Cy5.	Annealing/extensión – registro de datos en el canal Green, Yellow, Orange y Red

8. Análisis de datos / Interpretación de los resultados

El genotipo de una muestra se calcula en base a las condiciones de la señal entre los canales de recepción. Por lo que la señal detectada en el **canal HEX o Cy5 (normal)** se compara con la señal detectada en el **canal FAM o ROX (mutado)**. La mayoría de los programas de análisis de PCR en tiempo real proporcionan los datos de ambos canales de forma automática como un diagrama de dispersión (scatterplot). Los puntos de datos a lo largo de los ejes X e Y corresponden a genotipos normales o homocigotos mutantes, mientras que los puntos de datos en el centro de los gráficos de dispersión corresponden a genotipos heterocigotos. La NTC aparece en la parte inferior izquierda.

Controles / muestras	Amplificación por canal				Genotipo CYP2C9 variantes
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
*1*1-control	NO	SI	NO	SI	*1*1 (normal)
1*2 / *1*3-control	SI	SI	SI	SI	*2*3 (heterocigoto)
*2*3-control	SI	NO	SI	NO	---- (control-positivo para *2 y *3)
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Muestra 1	SI	SI	NO	SI	1*2 (heterocigoto)
Muestra 2	NO	SI	SI	SI	1*3 (heterocigoto)
Muestra 3	SI	NO	NO	SI	*2*2 (homocigoto)
Muestra 4	NO	SI	SI	NO	*3*3 (homocigoto)

En algunos programas de evaluación tiene que configurarse manualmente el valor límite (Threshold) para el genotipado correcto.

Recomendaciones para establecer el valor límite (C_q):

Fije el valor límite para el canal FAM y ROX ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del control *1*1 (HEX/Cy5 positivo). Fije a la inversa el valor límite para el canal HEX y Cy5 ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del control *2*3 (FAM/ROX positivo). 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.

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 del depósito PCR Master Mix debe mantenerse 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, compatibles con el aparato PCR con cierre adecuado para medir visualmente.
- No mezclar reactivos con números de lotes diferentes.
- No utilizar kits o componentes del kit caducados.

CYP2C9 mpx RealFast™ Assay

REF 7-225 / 7-228 100 / 32 reações
-30°C -15°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. Utilização prevista

O CYP2C9 mpx RealFast™ Assay é um teste de PCR múltiplo em tempo real, rápido e exato para a detecção para a detecção simultânea dos polimorfismos c.430C>T (CYP2C9*2) e c.1075A>C (CYP2C9*3) do gene CYP2C9 humano. Ambas as variantes da enzima CYP2C9, 2* e 3*, apresentam uma função inferior, dando origem a fenótipos de mau metabolismo (*poor metabolism*, PM) de vários fármacos. Os doentes com baixa atividade enzimática correm risco de sofrer reações adversas medicamentosas ou insucesso terapêutico, sobretudo no caso dos substratos da CYP2C9 com estreita janela terapêutica, tais como a varfarina S ou a fenitoína. O propósito do kit é identificar os doentes portadores de uma ou duas cópias das variantes *2 ou *3 da CYP2C9. Num extrato de ADN humano, o ensaio qualitativo distingue os genótipos que a CYP2C9 pode apresentar: normal *1*1, heterozigótico *1*2, *1*3 ou *2*3, ou ainda homozigótico *2*2 ou *3*3. Sequência de referência: NM_000771.3: c.430C>T, dbSNP rs1799853 (CYP2C9*2) e c.1075A>C, dbSNP rs1057910 (CYP2C9*3).

2. Introdução

A isoforma CYP2C9 é uma enzima metabolizadora de fármacos, da superfamília do citocromo P450, que é altamente expressa no fígado. Estima-se que seja responsável pela depuração de até 20% de todos os fármacos sujeitos a metabolismo de fase I. O CYP2C9*2 e o CYP2C9*3, os dois alelos mais comumente associados à redução do funcionamento da enzima nos indivíduos de ascendência europeia, são responsáveis pela variabilidade da resposta farmacológica entre indivíduos. Por exemplo, indivíduos com fenótipo PM (ou seja, genótipos com alelos *2 ou *3 homozigóticos ou heterozigóticos compostos) correm maior risco de sofrer hemorragia grave durante a terapêutica de anticoagulação cumarínica, incluindo com varfarina, acenocumarol e, em menor grau, com fenoprocumom. Além disso, os fenótipos PM sofrem sintomas de sobredosagem mais frequentes quando tratados com o fármaco antiepiléptico fenitoína.

3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx **Probe Mix** 1 ampola tampa branca 1000 / 320 µl
CYP2C9 mpx **Assay Mix** 1 ampola tampa roxa 550 / 550 µl
CYP2C9 mpx ***1*1-Control** 1 ampola tampa verde 75 / 75 µl
CYP2C9 mpx ***2*3-Control** 1 ampola tampa vermelha 75 / 75 µl

As RealFast™ 2x mpx Probe Mix incluem HotStart Taq DNA polymerase e dNTPs num sistema tampão otimizado. O CYP2C9 mpx Assay Mix consiste em iniciadores específicos do gene CYP2C9 e quatro sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo. Os controlos representativos das variantes CYP2C9*1, *2 *3 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 CYP2C9 mpx RealFast™ Assay é enviado em blocos de arrefecimento. Após a receção, armazene o kit de -30 a -15°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®-Assay. Cada reação contém dois pares de iniciadores específicos do gene, que amplificam um fragmento de 184 bp (*2) e de 140 bp (*3) do gene CYP2C9, assim como quatro sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo, que hibridizam a sequência alvo do fragmento amplificado. 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.

Sonda CYP2C9	Fluoróforo	Canal
*2 (c.430T)	FAM	520 nm
*1 (c.430C)	HEX	556 nm
*3 (c.1075C)	ROX	605 nm
*1 (c.1075A)	Cy5	670 nm

Em amostras normais, as **sondas *1 (c.430C, c.1075A)** geram um sinal de fluorescência forte no canal HEX ou Cy5, e um sinal basal ou inexistente no canal FAM ou ROX. Pelo contrário, em amostras com variantes homozigóticas, as **sondas *2 (c.430T)** ou ***3 (c.1075C)** geram um sinal de fluorescência forte no canal FAM ou ROX e um sinal basal ou nulo no canal HEX ou Cy5. Em amostras heterozigóticas *1*2 (c.430CT) ou *1*3 (c.1075AC) ambas as sondas se ligam aos amplicões e produzem sinais intermédios em ambos os canais.

5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O CYP2C9 mpx 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, HEX, Cy5 e ROX:

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

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

O kit **não é apropriado** para a utilização com instrumentos de PCR em tempo real que exijam ROX para a normalização dos dados (por exemplo, instrumentos Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT) ou para instrumentos sem os canais de detecção de fluorescência necessários.

5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi realizada em 55 alelos CYP2C9*2 e em 35 alelos CYP2C9*3, ambos testados com um kit de referência com marcação CE. O CYP2C9 mpx RealFast™ Assay determinou corretamente todos os alelos *2 e *3, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi realizada em 307 alelos negativos para CYP2C9*2 e em 327 alelos negativos para CYP2C9*3 com um kit de referência com marcação CE. O CYP2C9 mpx RealFast™ Assay determinou corretamente todos os alelos *2 e *3 negativos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros negativos de 100%.

Limite de detecção: 0.2 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), HEX (556 nm), ROX (605 nm) e Cy5 (670 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 CYP2C9 *1*1-Control e o CYP2C9 *2*3-Control como sinais positivos de referência para as amostras desconhecidas. Algum software de PCR em tempo real, p.ex., AB 7500 Fast, necessita de receber sinais dos três genótipos possíveis para a discriminação correta dos alelos. Para obter um controlo heterozigótico (controlos *1/*2 e *1/*3), misture uma alíquota do *1*1-Control e do *2*3-Control numa razão de 1:1.

» **Nota:** Os *1*1- e os *2*3-Controls São potenciais fontes de contaminação. Manuseie com cautela. «

7.3. Preparação da CYP2C9 mpx RealFast™ Assay Master Mix

Prepare duas reações para cada amostra, uma para CYP2C9*2 e uma para CYP2C9*3.

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 mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
CYP2C9 mpx 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 discriminação de alelos/experiências de genotipagem. Coloque as amostras no termociclador e execute o seguinte programa:

Programa			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, e outros instrumentos à base do bloco de calor de Peltier:	MIC, Rotor-Gene® 6000 (rotores de 36 poços e 72 poços)
Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos	Passos
1.	95°C	3 min	Desnaturação inicial	Desnaturação inicial
40	95°C	15 s	Desnaturação	Desnaturação
	60°C	1 min	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados nos canais FAM, HEX, ROX e Cy5	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados nos canais Green, Yellow, Orange e Red

8. Análise dos dados/interpretação dos resultados

O genótipo de cada amostra é determinado através do cálculo do quociente entre os sinais registados no **canal HEX ou Cy5 (normal)** e os sinais registados no **canal FAM ou ROX (mutante)**. A maior parte do software de PCR em tempo real resolve automaticamente os dados dos dois canais em grupos num gráfico de dispersão. Os pontos de dados representados ao longo dos eixos dos xx e dos yy correspondem a genótipos normais e variantes homozigóticas, respetivamente. Os pontos de dados agrupados no centro do gráfico de dispersão representam genótipos heterozigóticos. O NTC aparece no canto inferior esquerdo.

Controlos / Amostras	Amplificação no canal				Genótipo Variantes CYP2C9
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
*1*1-Control	NÃO	SIM	NÃO	SIM	*1*1-Control
1*2 / *1*3-Control	SIM	SIM	SIM	SIM	*2*3 (heterozigótico)
*2*3-Control	SIM	NÃO	SIM	NÃO	--- (controlo positivo para *2 e *3)
NTC	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	---
Amostra 1	SIM	SIM	NÃO	SIM	*1*2 (heterozigótico)
Amostra 2	NÃO	SIM	SIM	SIM	*1*3 (heterozigótico)
Amostra 3	SIM	NÃO	NÃO	SIM	*2*2 (homozigótico)
Amostra 4	NÃO	SIM	SIM	NÃO	*3*3 (homozigótico)

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

Definições de limiar recomendadas (C_q):

Defina o valor do limiar para os canais FAM e ROX imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo *1*1-Control (HEX/Cy5 positivos). Inversamente, defina o valor do limiar para os canais HEX e Cy5 imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo *2*3-Control (FAM/ROX positivos).

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.

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.