

HLA-B5701 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 7-610 / 7-613 Σ 100 / 32 reactions
-30°C / -15°C CE IVD



1. Intended Use

The HLA-B5701 RealFast™ Assay is a fast and accurate real-time PCR test for detection of the HLA-B5701 allele, a specific variant of the *human leukocyte antigen B (HLA-B)* gene that is strongly associated with abacavir hypersensitivity. The kit is designed for genetic risk stratification of HIV-infected patients prior to initiation of abacavir therapy. HLA-B5701 positive patients must be excluded from abacavir treatment. The qualitative assay discriminates the presence or absence of HLA-B5701 in a human genomic DNA extract. The kit does not interfere with the closely related HLA-B5702 and HLA-B5703 variants.

Reference sequence: HGVS: NG_023187.1

2. Introduction

Abacavir is a nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitor used to treat HIV-1 infection. Approximately 5% to 8% of Caucasians with HIV-1 infection who undergo a combination antiretroviral therapy containing abacavir develop a hypersensitivity reaction. Manifestations usually appear within the first 6 weeks after start of the treatment and include multisystem involvement resulting in skin rash, fever, constitutional, gastrointestinal tract or respiratory symptoms that become more severe with continued dosing. Immediate and permanent discontinuation of treatment leads to a rapid reversal of side effects. Conversely, re-challenge with abacavir after a hypersensitivity reaction can provoke potentially life-threatening conditions. Prospective employment of routine screening for HLA-B5701 before starting therapy significantly reduces the incidence of hypersensitivity reactions due to abacavir.

3. Kit Contents

100 / 32 Rxn

| | | | |
|-----------------------------|--------|--------------|---------------|
| RealFast™ 2x Genotyping Mix | 1 vial | □ white cap | 1000 / 320 µl |
| HLA-B5701 Assay Mix | 1 vial | ■ purple cap | 550 / 550 µl |
| HLA-B5701 Positive Control | 1 vial | ■ green cap | 75 / 75 µl |
| HLA-B5701 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-B5701 Assay Mix consists of gene-specific primers and dual-labeled hydrolysis probes for *HLA-B5701* and a control gene.

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

A positive and a negative control for HLA-B5701 are supplied with the kit.

4. Storage and Stability

HLA-B5701 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 gene-specific primer pairs which amplify a 97 bp fragment of the *HLA-B5701* gene and a 147 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-B5701 both, the **FAM-labeled HLA-B5701** 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 (520 nm) and in the HEX channel (556 nm). In samples negative for HLA-B5701 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-B5701 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)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycloer (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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 64 alleles testing positive for the HLA-B5701 allele with a reverse SSO based reference kit. The HLA-B5701 RealFast™ Assay determined all 64 alleles as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 66 alleles testing negative for the HLA-B5701 allele with a reverse SSO based reference kit. The HLA-B5701 RealFast™ Assay determined all 66 alleles as negative, 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.

Detectable HLA-B5701 alleles are listed in the Productnote 03: HLA-B5701 (www.viennalab.com/products/pharmacogenetics/hla-b5701).

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-B5701 **Positive Control** as positive reference signal.

Always include the HLA-B5701 **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-B5701 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-B5701 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, Mx3005P 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 *for 36-well rotor: 56°C | 1 min | Annealing/Extension – Data acquisition on Green and Yellow channel |

8. Data Analysis / Interpretation of Results

The presence or absence of the HLA-B5701 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-B5701 as well as the HLA-B5701 Positive Control show amplification in both, the HEX and the FAM channel. HLA-B5701 negative samples and the HLA-B5701 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-B5701 positive | YES | YES |
| HLA-B5701 negative | NO | YES |
| HLA-B5701 Positive Control | YES | YES |
| HLA-B5701 Negative Control | NO | YES |
| NTC | NO | NO |

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

Recommendations for Threshold Settings (C_q):

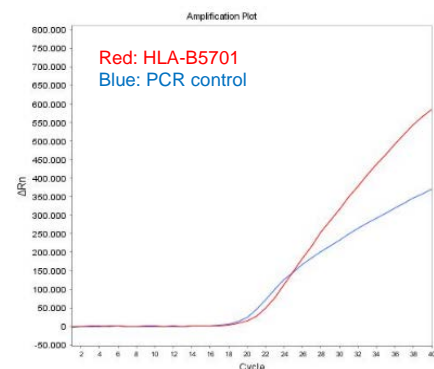
Set threshold value for the FAM channel just above the background fluorescent signal generated by the HLA-B5701 Negative Control.

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-B5701 RealFast™ Assay

REF 7-610 / 7-613 100 / 32 Reaktionen
-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. Verwendungszweck

Der HLA-B5701 RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion des HLA-B5701 Allels, eine Variante des *humanen Leukozytenantigen B (HLA-B)* Gen, welches stark mit einer Überempfindlichkeit auf Abacavir assoziiert ist. Der Kit wird bei HIV-infizierten Patienten vor Therapiebeginn mit Abacavir für das Screening auf HLA-B5701 eingesetzt. Träger dieser Variante sollten von einer Abacavir Medikation ausgeschlossen werden. Der qualitative Test unterscheidet zwischen Vorhandensein oder Fehlen des HLA-B5701 Allels in einem humanen DNA-Extrakt. Der Test reagiert nicht mit den nahe verwandten HLA-B5702 und HLA-B5703 Varianten.
Referenzsequenz: HGVS: NG_023187.1

2. Einleitung

Abacavir ist ein nukleosidischer Reverse-Transkriptasehemmer, der zur Behandlung einer HIV-1 (Typ 1) Infektion verwendet wird. Circa 5 bis 8% der mit HIV-1 infizierten kaukasischen Bevölkerung, welche sich einer antiretroviralen Kombinationstherapie (cART) unterziehen, entwickeln eine Überempfindlichkeitsreaktion. Klinische Manifestationen erscheinen üblicherweise innerhalb der ersten 6 Wochen nach Behandlungsbeginn und beinhalten eine multisystemische Beteiligung, die gekennzeichnet ist durch Hautausschläge, Fieber, konstitutionelle, gastrointestinale und respiratorische Symptome. Je länger das Präparat verabreicht wird, umso stärker die Symptome. Ein unverzügliches und permanentes Absetzen der Behandlung führt zu einem raschen Verschwinden der Nebenwirkungen. Umgekehrt kann eine erneute Verabreichung von Abacavir nach einer Überempfindlichkeitsreaktion zu lebensbedrohender Hypotonie und zum Tod führen. Mehrere Studien haben einen deutlichen Zusammenhang zwischen Überempfindlichkeit auf Abacavir und dem HLA-B5701 Allel gezeigt. Die prospektive Durchführung eines Routine-Screenings auf HLA-B5701 vor Therapiestart kann das Auftreten von Überempfindlichkeitsreaktionen im Zusammenhang mit Abacavir signifikant verringern.

3. Kit Bestandteile

100 / 32 Rxn

| | | | |
|-----------------------------|--------|------------------|---------------|
| 2x RealFast™ Genotyping Mix | 1 Vial | weisser Deckel | 1000 / 320 µl |
| HLA-B5701 Assay Mix | 1 Vial | violetter Deckel | 550 / 550 µl |
| HLA-B5701 Positive Control | 1 Vial | grüner Deckel | 75 / 75 µl |
| HLA-B5701 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-B5701 Assay Mix besteht aus genspezifischen Primern und doppelt-markierten Hydrolysesonden für HLA-B5701 und ein Kontrollgen. Weiters ist eine Positiv- und eine Negativkontrolle für HLA-B5701 im Kit vorhanden.

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

4. Lagerung und Stabilität

Der HLA-B5701 RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°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 97 bp Fragments des *HLA-B5701* Gens und eines 147 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-B5701 positiven Proben bindet sowohl die **FAM-markierte HLA-B5701 Sonde**, als auch die **HEX-markierte Sonde** für die **PCR Kontrolle** an das zugehörige Genfragment. Resultat ist ein starkes Fluoreszenzsignal im FAM- (520 nm) und im HEX- (556 nm) Kanal. In HLA-B5701 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-B5701 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)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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 64 Allelen, die mit einer reversen SSO DNA-Typisierungsmethode positiv auf das HLA-B5701 Allel getestet wurden, bestimmt. Der HLA-B5701 RealFast™ Assay typisierte alle 64 Allele als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate. Die **Spezifität** wurde anhand von 66 Allelen, die mit einer reversen SSO DNA-Typisierungsmethode negativ auf das HLA-B5701 Allel getestet wurden, bestimmt. Der HLA-B5701 RealFast™ Assay typisierte alle 66 Allele als negativ = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 ng genomische DNA. Empfohlene DNA Konzentration: 2 bis 20 ng/µl genomische DNA. Detektierbare HLA-B5701 Allele sind in der Productnote 03: HLA-B5701 (www.viennalab.com/products/pharmacogenetics/hla-b5701) gelistet.

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-B5701 **Positive Control** als positives Referenzsignal und die HLA-B5701 **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-B5701 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 Pipettierungenauigkeiten auszugleichen:

| Komponente | pro Reaktion | z.B. 25 Reaktionen |
|-----------------------------|--------------|--------------------|
| 2x RealFast™ Genotyping Mix | 10 µl | 250 µl |
| HLA-B5701 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, Mx3005P 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 *)36-well Rotor: 56°C | 1 min | Annealing/Extension - Datenaufnahme im Green- und Yellow-Kanal |

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Das Vorhandensein oder Fehlen des HLA-B5701 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-B5701 positive genomische DNA Probe, als auch die HLA-B5701 Positive Control eine Amplifikation im HEX Kanal und im FAM Kanal. HLA-B5701 negative Proben und die HLA-B5701 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.

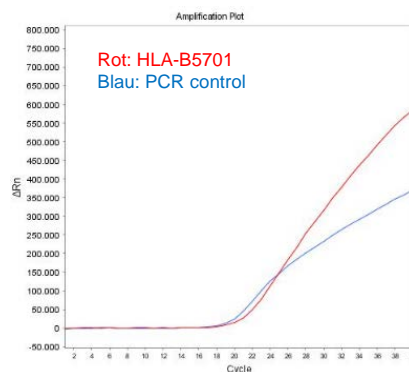
| Probe | Amplifikation im FAM Kanal (520 nm) | Amplifikation im HEX Kanal (556 nm) |
|----------------------------|--|--|
| HLA-B5701 positiv | JA | JA |
| HLA-B5701 negativ | NEIN | JA |
| HLA-B5701 Positive Control | JA | JA |
| HLA-B5701 Negative Control | NEIN | JA |
| NTC | NEIN | NEIN |

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-B5701 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, gerätekompabile PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.

HLA-B5701 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 7-610 / 7-613 Σ 100 / 32 réactions

-30°C -15°C



1. Utilisation

Le HLA-B5701 RealFast™ Assay est un test PCR en temps réel rapide et précis pour détecter l'allèle HLA-B5701, une variante spécifique de l'antigène humain leucocyte B (HLA-B), fortement associé à l'hypersensibilité à l'abacavir. Ce kit est conçu pour dépister les risques génétiques chez les patients infectés par le VIH avant de mettre en place une thérapie comportant de l'abacavir. Les patients testés positifs à HLA-B5701 doivent être exclus du traitement à l'abacavir. Ce test qualitatif permet de distinguer la présence ou l'absence de HLA-B5701 dans un extrait d'ADN humain. Le kit n'interfère pas avec les variantes parentes et proches HLA-B5702 et HLA-B5703. Séquence de référence: HGVS: NG_023187.1.

2. Introduction

L'abacavir est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse qui est utilisé pour traiter l'infection au VIH-1. Environ 5% à 8% de la population caucasienne infectée par le VIH-1 et traitée par une thérapie antirétrovirale combinée contenant de l'abacavir développe une réaction d'hypersensibilité. Les manifestations cliniques apparaissent habituellement dans les 6 premières semaines après le début du traitement et comprennent une implication multi-systémique, caractérisée par une éruption cutanée, de la fièvre, des symptômes constitutionnels, gastro-intestinaux et respiratoires. Plus on prolonge le traitement, plus les symptômes sont sévères. Une suspension immédiate et permanente du traitement mène à la disparition rapide des effets secondaires. Inversement une nouvelle administration de l'abacavir après une réaction hypersensible peut provoquer une hypotonie extrêmement dangereuse et la mort. Plusieurs études ont démontré qu'il existait une relation claire entre l'hypersensibilité à l'abacavir et l'HLA-B5701. La mise en place d'un dépistage prospectif et systématique de HLA-B5701 avant de démarrer une thérapie réduit de manière significative l'apparition de réactions hypersensibles à l'abacavir.

3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

| | | | | |
|-----------------------------|--------|--|------------------|---------------|
| RealFast™ 2x Genotyping Mix | 1 Vial | | couvercle blanc | 1000 / 320 µl |
| HLA-B5701 Assay Mix | 1 Vial | | couvercle violet | 550 / 550 µl |
| HLA-B5701 Positive Control | 1 Vial | | couvercle vert | 75 / 75 µl |
| HLA-B5701 Negative Control | 1 Vial | | 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-B5701 Assay Mix se compose de primers génos-spécifiques et de sondes d'hydrolyse munies de marqueurs doubles pour HLA-B5701 et d'un gène témoin. Le kit contient en outre un contrôle positif et un contrôle négatif pour HLA-B5701.

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

4. Stockage et stabilité

Le HLA-B5701 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 des paires de primers génos-spécifiques pour amplifier un fragment 97 bp du gène HLA-B5701 et un fragment 147 bp 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-B5701, la sonde marquée FAM HLA-B5701 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-B5701, 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-B5701 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 Cycloer (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

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

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

5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 64 allèles, qui ont été testées positives à l'allèle HLA-B5701 avec une méthode de typage ADN inverse avec une sonde spécifique d'oligonucléotides. Le HLA-B5701 RealFast™ Assay a typé positives 64 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%. La **spécificité** a été déterminée à partir de 66 allèles qui ont été testées négatives à l'allèle HLA-B5701 avec une méthode de typage ADN inverse avec une sonde spécifique d'oligonucléotides. Le HLA-B5701 RealFast™ Assay a typé négatives l'ensemble des 66 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100%.

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

Les allèles détectables HLA-B5701 sont répertoriés dans la Productnote 03: HLA-B5701 (www.viennalab.com/products/pharmacogenetics/hla-b5701).

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-B5701 **Positive Control** comme signal de référence positif et le HLA-B5701 **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-B5701 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-B5701 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, Mx3005P
et autres machines reposant sur le bloc thermique Peltier:

| Cycles | Temp | Durée | Etape |
|--------|------|--------|---|
| 1 | 95°C | 3 min | Dénaturation initiale |
| 40 | 95°C | 15 sec | Dénaturation |
| | 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>*1/36-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-B5701 est définie si un signal apparaît ou non dans le **canal FAM**. La réussite d'une PCR peut être vérifiée par une amplification du gène témoin qui sera détectée dans le **canal HEX** (contrôle PCR). Ainsi, les échantillons d'ADN génomique testés positifs HLA-B5701 tout comme le HLA-B5701 Positive Control montre une amplification dans les deux canaux, le canal HEX et le canal FAM. Les échantillons testés négatifs HLA-B5701 et le HLA-B5701 Negative Control montrent une amplification uniquement dans le canal HEX. La fluorescence et les courbes d'amplification correspondantes sont représentées automatiquement dans le logiciel PCR en temps réel dans les graphiques d'amplification.

| Echantillon | Amplification dans le canal FAM (520 nm) | Amplification dans le canal HEX (556 nm) |
|----------------------------|--|--|
| HLA-B5701 positif | OUI | OUI |
| HLA-B5701 négatif | NON | OUI |
| HLA-B5701 Positive Control | OUI | OUI |
| HLA-B5701 Negative Control | NON | OUI |
| NTC | NON | NON |

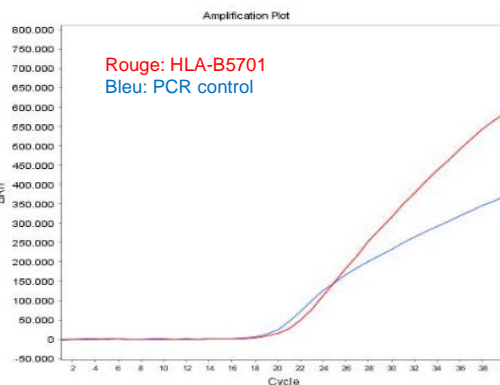
Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil (threshold) pour effectuer le génotypage correctement.

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

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM un peu au-dessus du signal fluorescent généré par le HLA-B5701 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-B5701 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-B5701 RealFast™ Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennialab.com

www.viennialab.com

REF 7-610 / 7-613 100 / 32 reazioni

-30°C / -15°C



1. Utilizzo

L' HLA-B5701 RealFast™ Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione dell'allele HLA-B5701, una specifica variante del gene dell' *antigene leucocitario umano B (HLA-B)*, strettamente associato all'ipersensibilità all'abacavir. Il kit è progettato per la stratificazione del rischio genetico dei pazienti HIV-positivi prima dell'avvio della terapia con abacavir. I pazienti positivi all'HLA-B5701 vanno esclusi dal trattamento con abacavir. Il test qualitativo discrimina la presenza o assenza di HLA-B5701 in un estratto di DNA umano. Il kit non interferisce con le varianti strettamente legate HLA-B5702 e HLA-B5703.
Sequenza di riferimento: HGVS: NG_023187.1.

2. Introduzione

L'abacavir è un analogo nucleosidico inibitore della trascrittasi inversa utilizzato nel trattamento dell'infezione da HIV-1. Tra il 5% e l'8% circa dei soggetti caucasici con HIV-1 sottoposti a una terapia antiretrovirale combinata con abacavir sviluppano una reazione di ipersensibilità. Di solito i sintomi si manifestano entro le prime 6 settimane dopo l'inizio del trattamento e includono un interessamento multisistemico che provoca rash cutaneo, febbre, sintomi costituzionali, gastrointestinali o respiratori la cui severità aumenta continuando la somministrazione. L'interruzione immediata e permanente del trattamento comporta una rapida regressione degli effetti collaterali. Al contrario, una nuova somministrazione di abacavir in seguito a una reazione di ipersensibilità può essere potenzialmente letale. L'uso preventivo di screening di routine per l'HLA-B5701 prima di iniziare la terapia riduce significativamente l'incidenza delle reazioni di ipersensibilità causate dall'abacavir.

3. Contenuto del kit

100 / 32 Rxn

| | | | |
|-----------------------------|---------|----------------|---------------|
| RealFast™ 2x Genotyping Mix | 1 fiala | □ tappo bianco | 1000 / 320 µl |
| HLA-B5701 Assay Mix | 1 fiala | ■ tappo viola | 550 / 550 µl |
| HLA-B5701 Positive Control | 1 fiala | ■ tappo verde | 75 / 75 µl |
| HLA-B5701 Negative Control | 1 fiala | ■ tappo rosso | 75 / 75 µl |

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

L'HLA-B5701 Assay Mix consiste di primer gene-specifici, di sonde di idrolisi a doppia etichetta per l'HLA-B5701 e di un gene di controllo. Con il kit vengono forniti un controllo positivo e un controllo negativo per l'HLA-B5701.

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

4. Conservazione e stabilità

L'HLA-B5701 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/scongelamento 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 97 bp del gene *HLA-5701* e un frammento di 147 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-B5701 sia la sonda **HLA-B5701 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-B5701 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-B5701 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 Cyler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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.viennialab.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 64 alleli risultati positivi per l'allele HLA-B5701 con un Oligonucleotide Sequenza-Specifico inverso in base al kit di riferimento. L' HLA-B5701 RealFast™ Assay ha determinato la positività di tutti i 64 alleli, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 66 alleli risultati negativi per l'allele HLA-B5701 con un Oligonucleotide Sequenza-Specifico inverso in base al kit di riferimento. L' HLA-B5701 RealFast™ Assay ha determinato la negatività di tutti i 66 alleli, 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.

Gli alleli HLA-B5701 rilevabili sono elencati nella Productnote 03: HLA-B5701 (www.viennialab.com/products/pharmacogenetics/hla-b5701).

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-B5701 **Positive Control** come segnale di riferimento positivo e l'HLA-B5701 **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-B5701 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-B5701 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, Mx3005P 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 *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-B5701 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-B5701 e l'HLA-B5701 Positive Control mostrano un'amplificazione in entrambi i canali, HEX e FAM. I campioni HLA-B5701 negativi e l'HLA-B5701 Negative Control mostrano 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-B5701 positivi | SI | SI |
| HLA-B5701 negativi | NO | SI |
| HLA-B5701 Positive Control | SI | SI |
| HLA-B5701 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 il valore soglia per il canale FAM appena al di sopra del segnale di fluorescenza di fondo generato dal HLA-B5701 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.

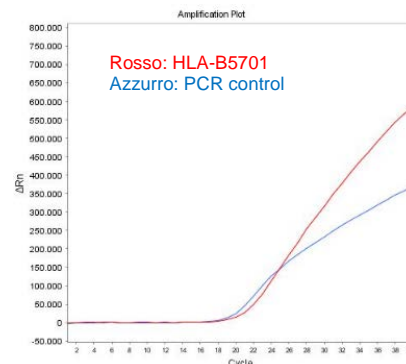


Grafico di amplificazione:
campione **HLA-B5701 positivo**.

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.

HLA-B5701 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 7-610 / 7-613 100 / 32 reacciones

-30°C -15°C



1. Aplicación

HLA-B5701 RealFast™ Assay es una prueba de PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección del alelo HLA-B5701, una variante del gen *antígeno leucocitario humano B (HLA-B)*, que está fuertemente asociado con una hipersensibilidad al abacavir. El kit se utiliza en pacientes infectados por el VIH antes de iniciar la terapia con abacavir para detectar si son portadores de HLA-B5701. Los portadores de esta variante deben excluirse de un tratamiento con abacavir. La prueba cualitativa determina la presencia o la ausencia del alelo HLA-B5701 en un extracto de ADN humano. El kit no interfiere con las estrechamente relacionadas variantes HLA-B5702 y HLA-B5703. Secuencia de referencia: HGVS: NG_023187.1.

2. Introducción

Abacavir es un fármaco sintético análogo de los nucleósidos, inhibidor de la transcriptasa inversa, que es utilizado en el tratamiento contra el VIH 1 (tipo 1). Aproximadamente un 5 - 8% de los infectados con el VIH-1 población caucásica, que se someten a un tratamiento antirretroviral combinado (TARC), desarrollan una reacción de hipersensibilidad. Las manifestaciones clínicas suelen aparecer en las primeras 6 semanas del tratamiento e incluyen una afectación multisistémica, que se caracteriza por erupción, fiebre, síntomas constitucionales, gastrointestinales y respiratorios. Cuanto más tiempo se administra el fármaco, más fuertes son los síntomas. Una suspensión inmediata y permanente del tratamiento conduce a una rápida desaparición de los efectos secundarios. Por el contrario, si se vuelve a administrar abacavir, después de una reacción de hipersensibilidad puede provocar una grave hipotensión y la muerte. Varios estudios han demostrado una relación clara entre la hipersensibilidad a abacavir y el HLA-B5701. La aplicación prospectiva de rutina de detección para HLA-B5701 antes de iniciar la terapia ha reducido significativamente la incidencia de reacciones de hipersensibilidad asociadas con abacavir.

3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

| | | | |
|-----------------------------|--------|-----------------|---------------|
| RealFast™ 2x Genotyping Mix | 1 vial | □ tapón blanco | 1000 / 320 µl |
| HLA-B5701 Assay Mix | 1 vial | ■ tapón violeta | 550 / 550 µl |
| HLA-B5701 Positive Control | 1 vial | ■ tapón verde | 75 / 75 µl |
| HLA-B5701 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-B5701 Assay Mix consta de primers específicos de genes y sondas de hidrólisis de doble marcado para *HLA-B5701* y un gen de control. Además, existe un control positivo y uno negativo para HLA-B5701 en el kit.

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

4. Almacenamiento y estabilidad

El HLA-B5701 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 pares de primers específicos de gen para la amplificación de un fragmento de 97 bp del gen *HLA-B5701* y de un fragmento de 147 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-B5701 enlaza tanto la **HLA-B5701 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-B5701 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-B5701 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 Cycloer (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** RealFast Variant Detection QuickGuides para la programación y evaluación de RealFast™ Assays en diferentes aparatos 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 a 64 alelos, que se probaron con un método de tipificación de ADN de secuencia de oligonucleótidos específicos (SSO) inversa para el alelo HLA-B5701 en positivo. El HLA-B5701 RealFast™ Assay tipificó los 64 alelos como positivo = 100% correcto-positivo-tanto por ciento. La **especificidad** se determinó en base a 66 alelos, que se probaron con un método de tipificación de ADN de secuencia de oligonucleótidos específicos (SSO) inversa para el alelo HLA-B5701 en negativo. El HLA-B5701 RealFast™ Assay tipificó los 66 alelos como negativo = 100% correcto-negativo-tanto por ciento.

Límite de detección: 0.2 ng de ADN genómico (por reacción). Concentración de ADN recomendada: de 2 a 20 ng/µl de ADN genómico.

Los alelos HLA-B5701 detectables se enumeran en la Productnote 03:HLA-B5701 (www.viennalab.com/products/pharmacogenetics/hla-b5701).

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-B5701 **Positive Control** de como señal de referencia positiva y el HLA-B5701 **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-B5701 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-B5701 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

Deposite 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, Mx3005P 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 *)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-B5701 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 lo tanto, una muestra de ADN genómico positiva para HLA-B5701, así como el HLA-B5701 Positive Control muestra una amplificación en el canal HEX y FAM. Las muestras negativas de HLA-B5701 y el HLA-B5701 Negative Control muestran solo una amplificación 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-B5701 positiva | SI | SI |
| HLA-B5701 negativa | NO | SI |
| HLA-B5701 Positive Control | SI | SI |
| HLA-B5701 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):

Establezca el valor umbral para el canal FAM algo mayor que la fluorescencia de fondo del HLA-B5701 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.

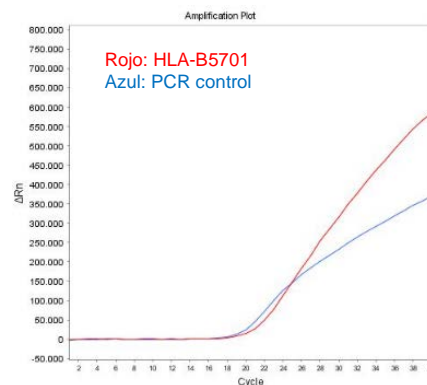


Gráfico de amplificación: prueba **positiva HLA-B5701**

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-B5701 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 7-610 / 7-613 100 / 32 reações

-30°C / -15°C



1. Utilização prevista

O HLA-B5701 RealFast™ Assay é um teste de PCR em tempo real rápido e exato para a detecção do alelo HLA-B5701, uma variante específica do gene do *antígeno leucócito humano B (HLA-B)* que está fortemente associada à hipersensibilidade ao abacavir. O kit foi concebido para a estratificação do risco genético de doentes infetados pelo VIH antes do início da terapia com abacavir. Os doentes positivos para HLA-B5701 têm de ser excluídos do tratamento com abacavir. O ensaio qualitativo discrimina a presença ou ausência de HLA-B5701 num extrato de ADN humano. O kit não interfere com as variantes fortemente relacionadas HLA-B5702 e HLA-B5703. Sequência de referência: HGVS: NG_023187.1.

2. Introdução

O abacavir é um análogo nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa utilizado para tratar a infeção por VIH-1. Aproximadamente 5% a 8% dos caucasianos com infeção por VIH-1 que seguem uma terapêutica antirretroviral de associação contendo abacavir desenvolvem uma reação de hipersensibilidade. As manifestações aparecem geralmente nas primeiras 6 semanas após o início do tratamento e incluem envolvimento multissistémico resultante em exantema, febre e sintomas gastrointestinais ou respiratórios inespecíficos que se agravam com o continuar da administração da terapêutica. A interrupção imediata e permanente do tratamento leva a uma rápida reversão dos efeitos colaterais. Por outro lado, a retoma de abacavir depois de uma reação de hipersensibilidade pode provocar situações médicas potencialmente fatais. A utilização prospectiva de um rastreio de rotina do HLA-B5701 antes de se iniciar a terapia reduz significativamente a incidência de reações de hipersensibilidade provocadas pelo abacavir.

3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

| | | | |
|-----------------------------|----------|------------------|---------------|
| RealFast™ 2x Genotyping Mix | 1 ampola | □ tampa branca | 1000 / 320 µl |
| HLA-B5701 Assay Mix | 1 ampola | ■ tampa roxa | 550 / 550 µl |
| HLA-B5701 Positive Control | 1 ampola | ■ tampa verde | 75 / 75 µl |
| HLA-B5701 Negative Control | 1 ampola | ■ tampa vermelha | 75 / 75 µl |

A RealFast™ 2x Genotyping Mix inclui HotStart Taq DNA polymerase e dNTPs num sistema tampão otimizado.

A HLA-B5701 Assay Mix consiste em iniciadores específicos para o gene, sondas de hidrólise com marcação dupla para *HLA-B5701* e um gene de controlo. O kit vem com um controlo positivo e um controlo negativo para HLA-B5701.

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

4. Armazenamento e estabilidade

O HLA-B5701 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®. Cada reação contém pares de iniciadores específicos do gene que amplificam um fragmento de 97 pb do gene *HLA-B5701* e um fragmento de 147 pb 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-B5701, tanto a sonda **HLA-B5701 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-B5701, 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-B5701 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 Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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 64 alelos com resultado positivo para o alelo HLA-B5701 utilizando um kit de referência com um SSO inverso. O HLA-B5701 RealFast™ Assay determinou todos os 64 alelos como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 66 alelos com resultado negativo para o alelo HLA-B5701 utilizando um kit de referência com um SSO inverso. O HLA-B5701 RealFast™ Assay determinou todos os 66 alelos como negativos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros negativos de 100%.

Limite de deteção: 0.2 ng de ADN genómico (por reação). Concentração de ADN recomendada: 2 a 20 ng/µl de ADN genómico.

Os alelos HLA-B5701 detectáveis estão listados na Productnote03:HLA-B5701 (www.viennalab.com/products/pharmacogenetics/hla-b5701).

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-B5701 **Positive Control** como sinal positivo de referência e o HLA-B5701 **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-B5701 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-B5701 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

Programa 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, Mx3005P 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 *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-B5701 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, tanto as amostras de ADN genómico positivas para HLA-B5701 como o HLA-B5701 Positive Control mostram uma amplificação em ambos os canais HEX e FAM. As amostras negativas para HLA-B5701 e o HLA-B5701 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-B5701 positivo | SIM | SIM |
| HLA-B5701 negativo | NÃO | SIM |
| HLA-B5701 Positive Control | SIM | SIM |
| HLA-B5701 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 imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo HLA-B5701 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.

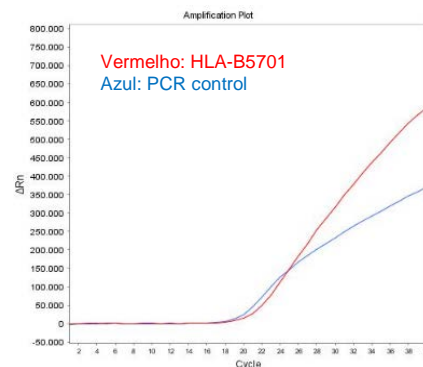


Gráfico de amplificação:
Amostra **positiva** para **HLA-B5701**.

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.