

# HLA-A3101 RealFast™ Assay

REF 7-640 / 7-643  $\Sigma$  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](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Intended Use

The HLA-A3101 RealFast™ Assay is a fast and accurate real-time PCR test for detection of the HLA-A3101 allele, a specific variant of the *human leukocyte antigen A (HLA-A)* gene that is associated with carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions. The kit is designed for genetic risk stratification of patients prior to initiation of carbamazepine therapy. HLA-A3101 positive patients must be excluded from carbamazepine treatment. The qualitative assay discriminates the presence or absence of HLA-A3101 in a human genomic DNA extract. Reference sequence: NG\_029217.2

## 2. Introduction

Carbamazepine is an anticonvulsant and mood-stabilizing drug commonly prescribed for multiple indications such as epilepsy, bipolar disorder, trigeminal neuralgia and chronic pain. In approximately 5% to 10% of individuals this medication can cause hypersensitivity reactions, including relatively mild maculopapular exanthema (MPE), but also severe conditions like drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS), Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN). The mortality rate of DRESS and SJS patients is around 10%, and with TEN up to 50%. It has been shown that the HLA-A3101 allele is associated with carbamazepine-induced MPE, DRESS and SJS/TEN in many populations, with strongest data for Europeans and Japanese. Also, in Han Chinese populations the allele is a risk factor for MPE and DRESS. Thus, HLA-A3101 screening of patients before starting therapy reduces the incidence of hypersensitivity reactions due to carbamazepine.

## 3. Kit Contents

		100 / 32 Rxn
RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 vial □ white cap	1000 / 320 µl
HLA-A3101 Assay Mix	1 vial ■ purple cap	550 / 550 µl
HLA-A3101 Positive Control	1 vial ■ green cap	75 / 75 µl
HLA-A3101 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-A3101 Assay Mix consists of gene-specific primers and dual-labeled hydrolysis probes for *HLA-A3101* 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-A3101 are supplied with the kit.

## 4. Storage and Stability

HLA-A3101 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 83 bp fragment of the *HLA-A3101* gene and a 119 bp fragment of a control gene, the latter serving as PCR control. Further components are two dual-labeled, gene-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequence of the corresponding fragment. The proximity of the 5'-fluorescent reporter and 3'-quencher dye on intact probes prevents the reporter from fluorescing. During the extension phase of PCR the 5' – 3' exonuclease activity of the Taq DNA polymerase cleaves the 5'-fluorescent reporter from the hybridized probe. The physical separation of the fluorophore from the quencher dye generates a fluorescent signal in real-time, which is proportional to the accumulated PCR product.

In samples positive for HLA-A3101 both, the **FAM-labeled HLA-A3101** probe as well as the **HEX-labeled PCR control** probe bind to the appropriate gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the FAM channel (520nm) and in the HEX channel (556nm). In samples negative for HLA-A3101 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-A3101 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 Cyclers (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Note:** RealFast™ Variant Detection QuickGuides for setting up and analyzing experiments on different types of instruments can be downloaded from [www.viennalab.com](http://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 24 alleles testing positive for the HLA-A3101 allele with Sanger sequencing. The HLA-A3101 RealFast™ Assay determined all 24 alleles as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 62 alleles testing negative for the HLA-A3101 allele with Sanger sequencing. The HLA-A3101 RealFast™ Assay determined all 62 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

## 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-A3101 **Positive Control** as positive reference signal for your unknown samples and the HLA-A3101 **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-A3101 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-A3101 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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

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

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

### 7.4. PCR Program

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

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

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

## 8. Data Analysis / Interpretation of Results

The presence or absence of the HLA-A3101 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-A3101 as well as the HLA-A3101 Positive Control show amplification in both, the HEX and FAM channel. HLA-A3101 negative samples and the HLA-A3101 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.

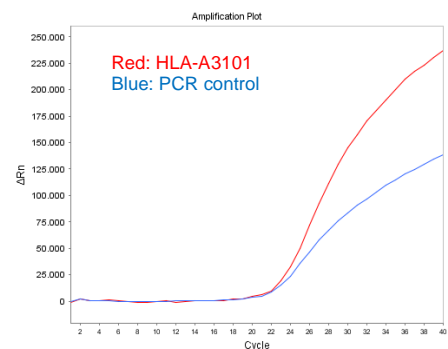
Sample Type	Amplification in FAM channel (520 nm)	Amplification in HEX channel (556 nm)
HLA-A3101 positive	<b>YES</b>	<b>YES</b>
HLA-A3101 negative	NO	<b>YES</b>
HLA-A3101 Positive Control	<b>YES</b>	<b>YES</b>
HLA-A3101 Negative Control	NO	<b>YES</b>
NTC	NO	NO

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

Recommendations for Threshold Settings ( $C_q$ ):

Set the threshold value for the FAM channel just above the background fluorescent signal generated by the HLA-A3101 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.



Amplification plot: **HLA-A3101 positive sample.**

## 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-A3101 RealFast™ Assay

REF 7-640 / 7-643 100 / 32 Reaktionen

-30°C -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Verwendungszweck

Der HLA-A3101 RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion des HLA-A3101 Allels, eine Variante des *humanen Leukozytenantigen A (HLA-A)* Gen, welches stark mit einer Überempfindlichkeit auf Carbamazepin assoziiert ist. Der Kit wird vor Therapiebeginn mit Carbamazepin zur Identifizierung von HLA-A3101 positiven Patienten eingesetzt. Träger dieser Variante sollen von einer Carbamazepin Medikation ausgeschlossen werden. Der qualitative Test unterscheidet zwischen Vorhandensein oder Fehlen des HLA-A3101 Allels in einem humanen DNA-Extrakt.

Referenzsequenz: NG\_029217.2

## 2. Einleitung

Carbamazepin ist ein antikonvulsives und stimmungsstabilisierendes Medikament, das für mehrere Indikationen wie Epilepsie, bipolare Störung, Trigeminusneuralgie und chronische Schmerzen verschrieben wird. Bei etwa 5% bis 10% der Patienten kann dieses Medikament Überempfindlichkeitsreaktionen verursachen, einschließlich relativ leichter makulopapulöser Exantheme (MPE), aber auch schwerer Zustände wie Arzneimittellexanthem mit Eosinophilie und systemischen Symptomen (DRESS), Stevens-Johnson-Syndrom (SJS) und toxische epidermale Nekrolyse (TEN). Die Mortalitätsrate von DRESS- und SJS- Patienten liegt bei 10%, bei TEN kann sie bis zu 50% betragen. Es wurde gezeigt, dass das HLA-A3101-Allel mit Carbamazepin-induziertem MPE, DRESS und SJS/TEN assoziiert ist. Hierbei ist die Datenlage am stärksten bei Europäern und Japanern. Auch bei Han-Chinesen ist das Allel ein Risikofaktor für MPE und DRESS. Folglich senkt das HLA-A3101 Screening der Patienten vor Beginn der Therapie die Häufigkeit von Überempfindlichkeitsreaktionen aufgrund von Carbamazepin.

## 3. Kit Bestandteile

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	weisser Deckel	1000 / 320 µl	Der 2x RealFast™ Genotyping Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der HLA-A3101 Assay Mix besteht aus genspezifischen Primern und doppelt-markierten Hydrolysesonden für HLA-A3101 und ein Kontrollgen. Weiters sind eine Positiv- und eine Negativkontrolle für HLA-A3101 im Kit vorhanden.
HLA-A3101 Assay Mix	1 Vial	violetter Deckel	550 / 550 µl	
HLA-A3101 Positive Control	1 Vial	grüner Deckel	75 / 75 µl	
HLA-A3101 Negative Control	1 Vial	roter Deckel	75 / 75 µl	

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

## 4. Lagerung und Stabilität

Der HLA-A3101 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 83 bp Fragments des *HLA-A3101* Gens und eines 119 bp Fragments eines Kontrollgens. Letzteres fungiert als PCR Kontrolle. Weitere Komponenten sind zwei doppelt-markierte, genspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz des entsprechenden Fragments binden. Die unmittelbare Nähe von 5'-Fluoreszenzreporter und 3'-Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz der intakten Sonde. Während des Extensionsschrittes der PCR spaltet die 5' – 3' Exonuklease Aktivität der Taq DNA-Polymerase den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher verursacht in Echtzeit ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

In HLA-A3101 positiven Proben bindet sowohl die **FAM-markierte HLA-A3101 Sonde**, als auch die **HEX-markierte Sonde** für die **PCR Kontrolle** an das zugehörige Genfragment. Resultat ist ein starkes Fluoreszenzsignal im FAM- (520nm) und im HEX- (556nm) Kanal. In HLA-A3101 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-A3101 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- und HEX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel:

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)</li><li>✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)</li><li>✓ CFX96™ (Bio-Rad)</li><li>✓ LightCycler® 480 (Roche)</li><li>✓ MIC qPCR Cycler (bms)</li><li>✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)</li></ul> | <p>» <b>Anmerkung:</b> RealFast™ Variant Detection QuickGuides zur Programmierung und Auswertung von Assays auf verschiedenen Geräten sind als Download verfügbar: <a href="http://www.viennalab.com">www.viennalab.com</a>. Bei Verwendung von AB StepOne™ muss der passive Referenzfarbstoff auf "ROX" gesetzt werden ! «</p> |
|--|---|

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 24 HLA-A3101 positiven Allelen, die mit Sanger Sequenzierung getestet wurden, bestimmt. Der HLA- A3101 RealFast™ Assay typisierte alle 24 Allele als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 62 HLA- A3101 negativen Allelen, die mit Sanger Sequenzierung getestet wurden, bestimmt. Der HLA- A3101 RealFast™ Assay typisierte alle 62 Allele als negativ = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 ng genomische DNA.

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

## 6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

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

## 7. Arbeitsanleitung

### 7.1. DNA Extraktion

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

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

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

### 7.2. PCR Kontrollen

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

Inkludieren Sie in jedem Lauf **immer** die HLA-A3101 **Positive Control** als positives Referenzsignal für unbekannte Proben und die HLA-A3101 **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-A3101 RealFast™ Master-Mixes

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

Komponente	pro Reaktion	z.B. 25 Reaktionen
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-A3101 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master-Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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

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

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

### 7.4. PCR Programm

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

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

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

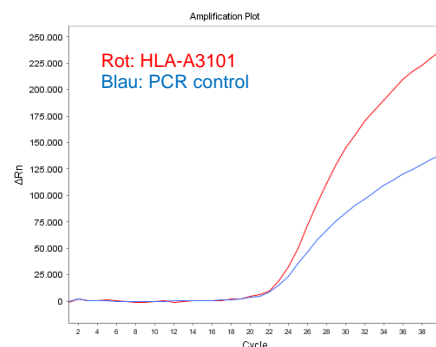
**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

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

## 8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Das Vorhandensein oder Fehlen des HLA-A3101 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-A3101 positive genomische DNA Probe, als auch die HLA-A3101 Positive Control eine Amplifikation im HEX Kanal und im FAM Kanal. HLA-A3101 negative Proben und die HLA-A3101 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 <b>FAM</b> Kanal (520 nm)	Amplifikation im <b>HEX</b> Kanal (556 nm)
HLA-A3101 positiv	<b>JA</b>	<b>JA</b>
HLA-A3101 negativ	<b>NEIN</b>	<b>JA</b>
HLA-A3101 Positive Control	<b>JA</b>	<b>JA</b>
HLA-A3101 Negative Control	<b>NEIN</b>	<b>JA</b>
NTC	<b>NEIN</b>	<b>NEIN</b>



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-A3101 Negative Control.

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

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

## 9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

# HLA-A3101 RealFast™ Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

REF 7-640 / 7-643  $\Sigma$  100 / 32 réactions

-30°C / -15°C



## 1. Utilisation

Le HLA-A3101 RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour la détection de l'allèle HLA-A3101, une variante spécifique de l'antigène humain leucocyte B (HLA-B) qui est fortement associé à une hypersensibilité à la carbamazépine. Le kit sert à identifier les patients HLA-A3101 positifs avant le début du traitement par la carbamazépine. Il faut écarter les porteurs de cette variante d'un traitement à base de carbamazépine. Le test qualitatif distingue la présence ou l'absence de l'allèle HLA-A3101 dans un extrait d'ADN humain. Séquence de référence: HGVS: NG\_029217.2

## 2. Introduction

La carbamazépine est un anticonvulsivant et un psychorégulateur prescrit pour plusieurs indications, dont l'épilepsie, le trouble bipolaire, la névralgie trigéminal et la douleur chronique. Chez environ 5 à 10 % des patients, ce médicament peut causer des réactions d'hypersensibilité, y compris un exanthème maculopapuleux (MPE) relativement léger, mais aussi des affections graves comme l'éosinophilie et les symptômes systémiques (DRESS), le syndrome de Stevens-Johnson (SJS) et une épidermolyse nécrotique (TEN). Le taux de mortalité des patients DRESS et SJS est de 10%, pour les TEN il peut atteindre jusqu'à 50%. Il a été démontré que l'allèle HLA-A3101 est associé à MPE, DRESS et SJS/TEN induits par la carbamazépine. C'est parmi les Européens et les Japonais que les données sont les plus fortes. Pour le chinois HAN, l'allèle présente également un facteur de risque MPE et DRESS. Par conséquent, le dépistage de la présence HLA-A3101 chez les patients avant le traitement réduit l'incidence des réactions d'hypersensibilité à la carbamazépine.

## 3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/>	couvercle blanc	1000 / 320 µl
HLA-A3101 Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/>	couvercle violet	550 / 550 µl
HLA-A3101 Positive Control	1 Vial	<input type="checkbox"/>	couvercle vert	75 / 75 µl
HLA-A3101 Negative Control	1 Vial	<input type="checkbox"/>	couvercle rouge	75 / 75 µl

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymerase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le HLA-A3101 Assay Mix se compose de primers génos-spécifiques et de sondes d'hydrolyse munies de marqueurs doubles pour HLA-A3101 et d'un gène témoin. Le kit contient en outre un contrôle positif et un contrôle négatif pour HLA-A3101.

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

## 4. Stockage et stabilité

Le HLA-A3101 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 83 bp du gène HLA-A3101 et un fragment 119 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-A3101, la sonde marquée FAM HLA-A3101 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-A3101, 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-A3101 RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast.

Le kit est compatible avec différentes machines de la PCR en temps réel standards du commerce capables de détecter la fluorescence FAM et HEX:

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

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

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

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

### 5.3. Spécifications du test

La sensibilité a été déterminée à l'aide de 24 allèles positifs HLA-A3101 testés avec séquençage Sanger et un test de référence marqué CE. Le HLA-A3101 RealFast™ Assay a typé positives l'ensemble des 24 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La spécificité a été déterminée à l'aide de 62 allèles négatifs HLA-A3101 testés avec séquençage Sanger et un test de référence marqué CE. Le HLA-A3101 RealFast™ Assay a typé négatives l'ensemble des 62 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.

## 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-A3101 **Positive Control** comme signal de référence positif pour les échantillons inconnus et le HLA-A3101 **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-A3101 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-A3101 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

Mettez **15 µl** de **Master Mix** dans chaque godet. Pipetez et ajoutez **5 µl d'ADN** ou de **Control Template** pour obtenir un volume final de 20 µl. Pour minimiser les risques de contaminations, pipetez les échantillons dans cet ordre: premièrement NTC, ensuite les échantillons, et finalement les contrôles positifs. Fermez immédiatement les récipients de réaction.

» **Remarque:** évitez les bulles d'air dans les mélanges finaux de réaction et les empreintes digitales sur les surfaces optiques des récipients de réaction qui peuvent toutes les deux altérer la mesure de la fluorescence. Centrifugez si nécessaire. «

### 7.4. Programme de la PCR

Programmez la machine PCR en temps réel comme indiqué par le fabricant pour les expériences de quantification. Mettez les échantillons PCR dans le thermocycleur et lancez le programme suivant:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480**  
et autres machines reposant sur le bloc thermique Peltier:

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

## 8. Analyse des données / interprétation des résultats

La présence ou l'absence de l'allèle HLA-A3101 est définie si un signal apparaît ou non dans le **canal FAM**. La réussite d'une PCR peut être vérifiée par une amplification du gène témoin qui sera détectée dans le **canal HEX** (contrôle PCR). Par conséquent, un échantillon d'ADN génomique positif pour HLA-A3101 ainsi que le HLA-A3101 Positive Control affichent une amplification dans le canal HEX et dans le canal FAM. Les échantillons négatifs HLA-A3101 et le HLA-A3101 Negative Control n'affichent que l'amplification dans le canal HEX. La fluorescence et les courbes d'amplification correspondantes sont représentées automatiquement dans le logiciel PCR en temps réel dans les graphiques d'amplification.

Echantillon	Amplification dans le canal FAM (520 nm)	Amplification dans le canal HEX (556 nm)
HLA-A3101 positif	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>
HLA-A3101 négatif	<b>NON</b>	<b>OUI</b>
HLA-A3101 Positive Control	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>
HLA-A3101 Negative Control	<b>NON</b>	<b>OUI</b>
NTC	<b>NON</b>	<b>NON</b>

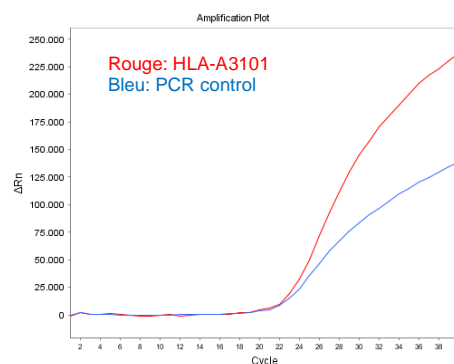
Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil (threshold) pour effectuer le génotypage correctement.

Recommandations pour le réglage de la valeur seuil (C<sub>q</sub>):

Régler la valeur seuil du canal FAM légèrement supérieure à la fluorescence de fond du HLA-A3101 Negative Control.

Les échantillons dépassant le seuil C<sub>q</sub> 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-A3101 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-A3101 RealFast™ Assay



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

REF 7-640 / 7-643 100 / 32 reazioni

-30°C -15°C



## 1. Utilizzo

L'HLA-A3101 RealFast™ Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione dell'allele HLA-A3101, una specifica variante del gene dell'*antigene leucocitario umano B (HLA-B)*, strettamente associato a reazioni avverse cutanee severe indotte dalla carbamazepina. Il kit è concepito per la stratificazione del rischio genetico dei pazienti prima dell'avvio della terapia con carbamazepina. I pazienti positivi all'HLA-A3101 vanno esclusi dal trattamento con carbamazepina. Il test qualitativo discrimina la presenza o l'assenza di HLA-A3101 in un estratto di DNA genomico umano.  
Sequenza di riferimento: HGVS: NG\_029217.2

## 2. Introduzione

La carbamazepina è un farmaco anticonvulsivante stabilizzatore dell'umore comunemente prescritto per molteplici indicazioni come epilessia, disturbi bipolari, nevralgia del trigemino e dolore cronico. In circa il 5-10% degli individui, questo farmaco può causare reazioni di ipersensibilità, inclusa l'eruzione maculopapulare (MPE) relativamente lieve, ma anche condizioni severe come reazione al farmaco con eosinofilia e sintomi sistemici (DRESS), sindrome di Stevens-Johnson (SJS) e necrolisi epidermica tossica (TEN). Il tasso di mortalità dei pazienti con DRESS e SJS si aggira intorno al 10%, in quelli affetti da TEN arriva fino al 50% circa. È stato dimostrato che l'allele HLA-A3101 è associato a MPE indotta da carbamazepina, DRESS e SJS/TEN presso molte popolazioni, con maggiore evidenza tra gli europei e i giapponesi. Inoltre, nelle popolazioni cinesi Han l'allele costituisce un fattore di rischio per MPE e DRESS. Lo screening dell'HLA-A3101 dei pazienti precedente alla terapia riduce, pertanto, l'incidenza delle reazioni di ipersensibilità indotte dalla carbamazepina.

## 3. Contenuto del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 fiala	□ tappo bianco	1000 / 320 µl
HLA-A3101 Assay Mix	1 fiala	■ tappo viola	550 / 550 µl
HLA-A3101 Positive Control	1 fiala	■ tappo verde	75 / 75 µl
HLA-A3101 Negative Control	1 fiala	■ tappo rosso	75 / 75 µl

Il RealFast™ 2x Genotyping Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTPs in un sistema tampone ottimizzato. L'HLA-A3101 Assay Mix consiste di primer gene-specifici, di sonde di idrolisi a doppia etichetta per l'HLA-A3101 e di un gene di controllo. Con il kit vengono forniti un controllo positivo e un controllo negativo per l'HLA-A3101.

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

## 4. Conservazione e stabilità

L'HLA-A3101 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. Ogni reazione contiene coppie di primer gene-specifici che amplificano un frammento di 83 bp del gene *HLA-A3101* e un frammento di 119 bp di un gene di controllo, il quale funge da controllo per la PCR. Tra le altre componenti vi sono due sonde di idrolisi gene-specifiche a doppia etichetta che ibridano con la sequenza target del frammento corrispondente. La prossimità del reporter fluorescente in 5' e del quencher colorante in 3' sulle sonde intatte induce la soppressione della fluorescenza del reporter. Durante la fase di estensione della PCR, l'attività 5' - 3' esonucleasica della Taq DNA polimerasi cliva il reporter fluorescente in 5' dalla sonda ibridata. La separazione fisica del fluoroforo dal quencher colorante genera un segnale fluorescente in tempo reale, che è proporzionale al prodotto della PCR accumulato.

Nei campioni positivi per l'HLA-A3101 sia la sonda **HLA-A3101 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-A3101 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-A3101 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 Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

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

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

### 5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 24 alleli risultati positivi per l'allele HLA-A3101 con sequenziamento Sanger e un kit di riferimento marchiato CE. L'HLA-A3101 RealFast™ Assay ha determinato la positività di tutti i 24 alleli, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 62 alleli risultati negativi per l'allele HLA-A3101 con sequenziamento Sanger e un kit di riferimento marchiato CE. L'HLA-A3101 RealFast™ Assay ha determinato la negatività di tutti i 62 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.

## 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-A3101 **Positive Control** come segnale di riferimento positivo per i campioni non noti e l'HLA-A3101 **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-A3101 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-A3101 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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

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

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

### 7.4. Programma della PCR

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

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

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

## 8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

La presenza o assenza dell'allele HLA-A3101 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-A3101 e l'HLA-A3101 Positive Control presentano un'amplificazione in entrambi i canali, HEX e FAM. I campioni negativi per l'HLA-A3101 e l'HLA-A3101 Negative Control presentano un'amplificazione soltanto nel canale HEX. I livelli di fluorescenza e le corrispondenti curve di amplificazione vengono rappresentati automaticamente nei grafici di amplificazione del software Real-time PCR.

Campioni	Amplificazione nel canale <b>FAM</b> (520 nm)	Amplificazione nel canale <b>HEX</b> (556 nm)
HLA-A3101 positivi	<b>SI</b>	<b>SI</b>
HLA-A3101 negativi	<b>NO</b>	<b>SI</b>
HLA-A3101 Positive Control	<b>SI</b>	<b>SI</b>
HLA-A3101 Negative Control	<b>NO</b>	<b>SI</b>
NTC	<b>NO</b>	<b>NO</b>

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

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

Impostare la soglia per il canale FAM immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal HLA-A3101 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.

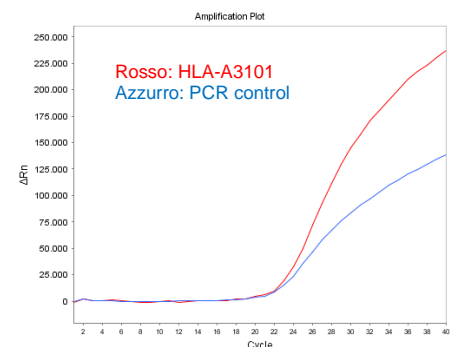


Grafico di amplificazione:  
campione **HLA-A3101 positivo**.

## 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-A3101 RealFast™ Assay

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

REF 7-640 / 7-643 100 / 32 reacciones  
-30°C -15°C CE IVD



## 1. Aplicación

HLA-A3101 RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección del alelo HLA-A3101, una variante del gen de *antígeno leucocitario humano B (HLA-B)* que está fuertemente asociado con una hipersensibilidad a la carbamazepina. El kit se utiliza antes del comienzo de la terapia con carbamazepina para la identificación de pacientes HLA-A3101 positivos. Los portadores de esta variante deben excluirse de una medicación con carbamazepina. La prueba cualitativa diferencia entre la presencia o ausencia del alelo HLA-A3101 en un extracto de ADN humano.

Secuencia de referencia: HGVS: NG\_029217.2

## 2. Introducción

La carbamazepina es un medicamento anticonvulsivo y estabilizador emocional que se prescribe para varias indicaciones como epilepsia, trastorno bipolar, neuralgia del trigémino y dolor crónico. Aproximadamente, entre el 5% y el 10% de los pacientes puede experimentar reacciones de hipersensibilidad a este medicamento, incluido el exantema maculopapular (MPE) relativamente leve, pero también estados más graves, como el exantema medicamentoso con eosinofilia y síntomas sistémicos (DRESS), síndrome Stevens-Johnson (SJS) y necrolisis epidérmica tóxica (TEN). El índice de mortalidad de los pacientes con DRESS y SJS es del 10%, en TEN puede llegar a ser de hasta el 50%. Se puso de relieve que el alelo HLA-A3101 está asociado con MPE, DRESS y SJS/TEN inducido por la carbamazepina. Los grupos más afectados son los europeos y japoneses. También los chinos de la etnia Han tienen en el alelo un factor de riesgo de MPE y DRESS. Consecuentemente, el cribado HLA-A3101 de los pacientes antes del comienzo de la terapia reduce la frecuencia de las reacciones de hipersensibilidad debido a la carbamazepina.

## 3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 vial	□ tapón blanco	1000 / 320 µl
HLA-A3101 Assay Mix	1 vial	■ tapón violeta	550 / 550 µl
HLA-A3101 Positive Control	1 vial	■ tapón verde	75 / 75 µl
HLA-A3101 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-A3101 Assay Mix consta de primers específicos de genes y sondas de hidrólisis de doble marcado para HLA-A3101 y un gen de control. Además, existe un control positivo y uno negativo para HLA-A3101 en el kit.

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

## 4. Almacenamiento y estabilidad

El HLA-A3101 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 83 pb del gen HLA-A3101 y de un fragmento de 119 bp de un gen de control. Este último actúa como un control de PCR. Otros componentes son dos sondas de hidrólisis doble marcado de genes específicos, que se enlazan a la secuencia de objetivo del fragmento correspondiente. La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad 5' – 3' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq escinde el reporter de la sonda hibridada. La separación espacial del fluoróforo del quencher ocasiona una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR.

En las pruebas positivas HLA-A3101 enlaza tanto la **HLA-A3101 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-A3101 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-A3101 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)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** RealFast Variant Detection Guías rápidas para la programación y evaluación de ensayos RealFast™ Assays están disponibles para su descarga en [www.viennalab.com](http://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 24 alelos positivos HLA-A3101, que se comprobaron con la secuenciación de Sanger y una prueba de referencia con la marca CE. El HLA-A3101 RealFast™ Assay tipificó los 24 alelos como positivo = 100% correcto-positivo-tanto por ciento.

La **especificidad** se determinó en base 62 alelos negativos HLA-A3101, que se comprobaron con la secuenciación de Sanger y una prueba de referencia con la marca CE. El HLA-A3101 RealFast™ Assay tipificó los 62 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.

## 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-A3101 **Positive Control** de como señal de referencia positiva para muestras desconocidas y el HLA-A3101 **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-A3101 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-A3101 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master-Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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

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

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

### 7.4. Programa PCR

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

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

y otros aparatos basados en el bloque de calentamiento Peltier:

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

## 8. Análisis de datos / Interpretación de los resultados

La presencia o ausencia de HLA-A3101 se define por la presencia o ausencia de una señal en el **canal FAM**. El éxito de PCR puede verificarse gracias a la amplificación del gen de control (control PCR), que se detecta en el **canal HEX**. Por ello, una muestra de ADN genómica positiva para HLA-A3101, como también el HLA-A3101 Positive Control, presenta una amplificación en el canal HEX y en el FAM. Las muestras negativas de HLA-A3101 y el HLA-A3101 Negative Control de presentan una amplificación solo en el canal HEX. Fluorescencia y correspondientes curvas de amplificación se visualizan automáticamente dentro del software PCR en tiempo real en un gráfico de amplificación.

Pruebas	Amplificación en FAM-canal (520 nm)	Amplificación en HEX-canal (556 nm)
HLA-A3101 positiva	<b>SI</b>	<b>SI</b>
HLA-A3101 negativa	NO	<b>SI</b>
HLA-A3101 Positive Control	<b>SI</b>	<b>SI</b>
HLA-A3101 Negative Control	NO	<b>SI</b>
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<sub>q</sub>):

El valor umbral para el canal FAM debe ajustarse algo mayor que la fluorescencia de fondo del HLA-A3101 Negative Control.

Las muestras, que excedan el valor límite después de C<sub>q</sub> 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.

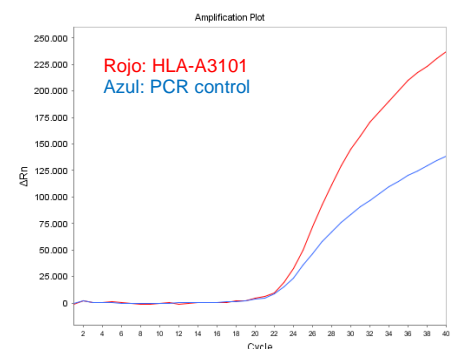


Gráfico de amplificación:  
prueba **positiva HLA-A3101**

## 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-A3101 RealFast™ Assay

REF 7-640 / 7-643 100 / 32 reações

-30°C / -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilização prevista

O HLA-A3101 RealFast™ Assay é um teste de PCR em tempo real, rápido e exato, para a detecção do alelo HLA-A3101, uma variante específica do gene do *antígeno leucócito humano B (HLA-B)*, fortemente associado a reações adversas graves induzidas pela carbamazepina. O kit foi concebido para estratificar o risco genético de pacientes antes do início da terapia com carbamazepina. Pacientes HLA-A3101 positivos devem ser excluídos do tratamento a base de carbamazepina. O ensaio qualitativo discrimina a presença ou ausência de HLA-A3101 num extrato de ADN genómico humano.

Sequência de referência: HGVS: NG\_029217.2

## 2. Introdução

A Carbamazepina é um medicamento anticonvulsivante e estabilizador do humor, prescrito com frequência para múltiplas indicações, como: epilepsia, transtorno bipolar, neuralgia trigeminal e dor crónica. Em aproximadamente 5 a 10% dos indivíduos, este medicamento pode causar reações de hipersensibilidade, incluindo exantema maculopapular (MPE) relativamente leve, mas também condições graves como reações a drogas com eosinofilia e sintomas sistémicos (DRESS), síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) e necrólise tóxica epidérmica (TEN). A taxa de mortalidade dos pacientes com DRESS e SSJ é de cerca 10%, e dos pacientes com TEN de até 50%. Foi comprovada a associação entre o alelo HLA-A3101 e MPE, DRESS e SSJ/TEN induzidos pela carbamazepina em muitas populações, em particular europeus e japoneses. Na população chinesa Han o alelo é também um fator de risco para MPE e DRESS. Portanto, o rastreio de HLA-A3101 nos pacientes antes do início da terapia reduz a incidência de reações de hipersensibilidade ligadas à carbamazepina.

## 3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 ampola	□ tampa branca	1000 / 320 µl	A RealFast™ 2x Genotyping Mix inclui HotStart Taq DNA
HLA-A3101 Assay Mix	1 ampola	■ tampa roxa	550 / 550 µl	polymerase e dNTPs num sistema tampão otimizado.
HLA-A3101 Positive Control	1 ampola	■ tampa verde	75 / 75 µl	A HLA-A3101 Assay Mix consiste em iniciadores específicos
HLA-A3101 Negative Control	1 ampola	■ tampa vermelha	75 / 75 µl	para o gene, sondas de hidrólise com marcação dupla para

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

HLA-A3101 e um gene de controlo. Um controlo positivo e negativo para HLA-A3101 são fornecidos com o kit.

## 4. Armazenamento e estabilidade

O HLA-A3101 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 83 pb do gene *HLA-A3101* e um fragmento de 119 bp de um gene de controlo, funcionando este como controlo da PCR. Outros componentes são sondas de hidrólise específicas para o gene, com marcação dupla, que hibridam a sequência-alvo do fragmento correspondente. A proximidade do gene repórter fluorescente 5' e o corante supressor 3' em sondas intactas impede a fluorescência do gene repórter. Durante a fase de extensão da PCR, a atividade da exonuclease 5' – 3' da Taq DNA polimerase cliva o gene repórter fluorescente 5' da sonda hibridada. A separação física do fluoróforo do corante supressor produz um sinal fluorescente em tempo real, que é proporcional ao produto de PCR acumulado.

Em amostras positivas para HLA-A3101, tanto a sonda **HLA-A3101 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-A3101, 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-A3101 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 Cycloer (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** É possível transferir os RealFast™ Variant Detection QuickGuides para informações sobre a configuração e análise de experiências com diferentes tipos de instrumentos em [www.viennalab.com](http://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 24 alelos com resultado positivo quanto ao alelo HLA-A3101 com sequenciamento de Sanger e um kit de referência com marcação CE. O HLA-A3101 RealFast™ Assay determinou todos os 24 alelos como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 62 alelos com resultado negativo quanto ao alelo HLA-A3101 com sequenciamento de Sanger e um kit de referência com marcação CE. O HLA-A3101 RealFast™ Assay determinou todos os 62 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.

## 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-A3101 **Positive Control** como sinal positivo de referência para as amostras desconhecidas e o HLA-A3101 **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-A3101 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-A3101 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master-Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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

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

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

### 7.4. Programa de PCR

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

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

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

## 8. Análise dos dados/interpretação dos resultados

A presença ou ausência do alelo HLA-A3101 define-se pela existência ou inexistência de um sinal no **canal FAM**. O sucesso da PCR pode ser verificado por uma amplificação do gene de controlo detetado no **canal HEX** (controlo da PCR). Assim, as amostras de ADN genómico positivas para HLA-A3101, bem como o HLA-A3101 Positive Control exibem amplificação nos canais HEX e FAM. As amostras negativas para HLA-A3101 e o HLA-A3101 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 <b>FAM</b> (520 nm)	Amplificação no canal <b>HEX</b> (556 nm)
HLA-A3101 positivo	<b>SIM</b>	<b>SIM</b>
HLA-A3101 negativo	<b>NÃO</b>	<b>SIM</b>
HLA-A3101 Positive Control	<b>SIM</b>	<b>SIM</b>
HLA-A3101 Negative Control	<b>NÃO</b>	<b>SIM</b>
NTC	<b>NÃO</b>	<b>NÃO</b>

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

Definições de limiar recomendadas ( $C_q$ ):

Defina o valor do limiar para o canal FAM logo acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo HLA-A3101 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.

## 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.

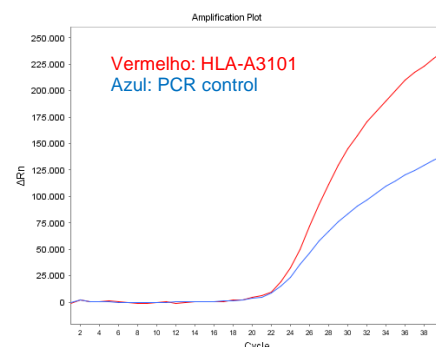


Gráfico de amplificação:  
Amostra **positiva** para HLA-A3101.