

IL28B RealFast™ Assay

REF 7-200 / 7-203 100 / 32 reactions
-20°C 2-8°C CE IVD



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

1. Intended Use

The IL28B RealFast™ Assay is a fast and accurate real-time PCR test for the detection of the TT>ΔG dinucleotide frame-shift variant in the human *interferon lambda 4 (IFNL4)* gene/pseudogene, which is located upstream of the gene encoding interleukin 28B (IL28B). Genotyping helps to predict the therapeutic response in Hepatitis C Virus (HCV) infected patients who are being considered for pegylated-interferon/ribavirin (pegIFN/RBV) therapy. Homozygous carriers of the favorable TT allele are predisposed to an up to threefold higher sustained virological response (SVR) than carriers of the ΔG allele. In a human DNA extract the qualitative assay discriminates the three possible IFNL4 TT>ΔG genotypes associated with high (TT/TT) or low (TT/ΔG and ΔG/ΔG) treatment-induced or spontaneous HCV clearance. Reference sequence: HGVS: NG_042193.1:g.1457_1458delAAinsC; NCBI dbSNP: rs368234815.

2. Introduction

Chronic HCV infection affects around 3% of the world population and is the leading cause of cirrhosis, liver cancer and liver transplantation. Success of the recommended standard pegIFN/RBV therapy depends on both viral and host factors. Patients infected with the unfavorable HCV type 1 or 4 have lower SVR than those infected with type 2 or 3. Host factors influencing treatment response include age, gender, ethnicity and genetic polymorphisms affecting antiviral activity. The *IFNL4* rs368234815 TT>ΔG variant is strongly linked to rs12979860 C>T, a well-established marker for long-term therapeutic success. Several studies demonstrated rs368234815 as the functional variant for IL28B mRNA regulation and, compared to rs12979860, as the better predictor of SVR and HCV clearance particularly in patients with African ancestry. The IFNL4 genotype TT/TT favors spontaneous as well as treatment-induced viral clearance in HCV patients, primarily in those infected with type 1 or 4.

3. Kit Contents

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 vial	□ white cap	1000 / 320 µl
IL28B Assay Mix	1 vial	■ purple cap	550 / 550 µl
IL28B TT/TT-Control	1 vial	■ green cap	75 / 75 µl
IL28B ΔG/ΔG-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 IL28B Assay Mix consists of *IFNL4* gene-specific primers and two allele-specific, dual-labeled hydrolysis probes. Controls representing IL28B TT/TT and ΔG/ΔG genotypes are supplied with the kit.

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

4. Storage and Stability

IL28B RealFast™ Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -20°C. Alternatively, store at 2 to 8°C for short-term use within one month. The kit withstands up to 20 freeze/thaw cycles with no loss of activity. Avoid prolonged exposure to intense light. If stored correctly, the kit will retain full activity until the expiration date indicated on the label.

5. Product Description

5.1. Principle of the Test

The test is based on the fluorogenic 5' nuclease assay, also known as TaqMan® assay. Each reaction contains a gene-specific primer pair which amplifies a 110 bp fragment of the *IFNL4* gene, and two dual-labeled, allele-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequence of the amplified 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 homozygous TT/TT samples the **HEX-labeled TT probe** hybridizes to the complementary strand of the gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the HEX channel (556nm) and no or only a baseline signal in the FAM channel (520nm). Vice versa, in homozygous ΔG/ΔG samples the **FAM-labeled ΔG probe** binds to the gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the FAM channel and no or only a baseline signal in the HEX channel. In heterozygous samples (TT/ΔG) both probes bind to the amplicons and generate intermediate signals in both channels.

5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The IL28B RealFast™ Assay is validated for use with the AB 7500 Fast instrument.

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

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyclers (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

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

The IL28B RealFast™ Assay and a reference kit for the detection of the highly linked rs12979860 C>T polymorphism showed 99,4% concordance of genotyping results obtained on 84 samples.

Out of 168 alleles, the IL28B RealFast™ Assay identified 113 favorable TT and 55 unfavorable ΔG alleles, whereas the reference kit identified 114 favorable C alleles and 54 unfavorable T alleles. Sequencing of one discrepant sample revealed that the ΔG allele was present, but not correlated with the rs12979860 T allele on one chromosome.

The **sensitivity** and **specificity** of the IL28B RealFast™ Assay showed a 100% true positive and a 100% true negative rate, respectively.

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 IL28B **TT/TT-Control** and IL28B **ΔG/ΔG-Control** as positive reference signals for your unknown samples. Some real-time PCR software, e.g. AB 7500 Fast, requires signals for all three possible genotypes for correct allelic discrimination. In order to obtain a heterozygous control (TT/ΔG-Control), mix an aliquot of TT/TT-Control and ΔG/ΔG-Control in a ratio of 1:1.

» **Note:** TT/TT- and ΔG/ΔG-Controls are potential sources of contamination. Make sure to handle them carefully. «

7.3. Preparation of IL28B 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 controls + 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
IL28B Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

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

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

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

7.4. PCR Program

Program the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions for allelic discrimination / genotyping experiments. Place the samples into the thermal cycler and run the following program:

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 <i>*for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension –
			Data acquisition on Green and Yellow channel

8. Data Analysis / Interpretation of Results

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

Controls	Amplification in FAM channel (520 nm)	Amplification in HEX channel (556 nm)	Genotype / HCV clearance
TT/TT-Control	NO	YES	homozygous TT / high
TT/ΔG -Control	YES	YES	heterozygous TT/ΔG / low
ΔG/ΔG-Control	YES	NO	homozygous ΔG / low
NTC	NO	NO	----

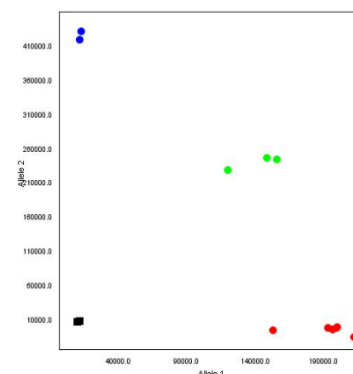
Some instrument software needs manual threshold settings for accurate genotype calling.

Recommendations for Threshold Settings (C_a):

Set threshold value for the FAM channel just above the background fluorescent signal generated by the TT/TT-Control (HEX-positive). Vice versa, set threshold value for the HEX channel just above the background fluorescent signal of the ΔG/ΔG-Control (FAM-positive).

Samples crossing the threshold line beyond C_a 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.

IL28B RealFast™ Assay

REF 7-200 / 7-203 Σ 100 / 32 Reaktionen
-20°C \downarrow 2-8°C CE IVD



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

1. Verwendungszweck

Der IL28B RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion der TT> Δ G Dinukleotid-Variante im humanen *Interferon lamda 4 (IFNL4)* Gen, das strangaufwärts vor dem IL28B kodierenden Gen liegt. Die Genotypisierung dieser Variante ermöglicht die Vorhersage einer spontanen Hepatitis C Ausheilung (Clearance) und eines dauerhaften Ansprechens (sustained virological response, SVR) auf pegylierte Interferon/Ribavirin Therapy (pegIFN/RBV) in chronisch infizierten Patienten. Der qualitative Test unterscheidet in humaner DNA die drei möglichen IFNL4 TT> Δ G Genotypen, die mit hoher (TT/TT) oder niedriger (TT/ Δ G und Δ G/ Δ G) behandlungsabhängiger und spontaner HCV Clearance assoziiert sind.

Referenzsequenz: HGVS: NG_042193.1:g.1457_1458delAAinsC; NCBI dbSNP: rs368234815.

2. Einleitung

Chronische HCV Infektion, die ~3% der Weltbevölkerung betrifft, ist die Hauptursache für Zirrhose, Leberkrebs und Lebertransplantation. Der Erfolg der empfohlenen Standardtherapie mit pegIFN/RBV hängt von Virus- und Wirtsfaktoren ab. Patienten, die mit dem prognostisch ungünstigen HCV-Typ 1 oder 4 infiziert sind, haben eine niedrigere SVR als solche die mit Typ 2 oder 3 infiziert sind. Den Behandlungserfolg beeinflussende Wirtsfaktoren sind Alter, Geschlecht, Ethnie und auf die virale Aktivität sich auswirkende genetische Polymorphismen. Die *IFNL4* rs368234815 TT> Δ G Variante ist eng mit rs12979860 C>T gekoppelt, einem gut etablierten Marker für dauerhaften therapeutischen Erfolg. Studien haben rs368234815 als die funktionelle Variante der IL28B mRNA Regulierung bestätigt. Im Vergleich zu rs12979860 kann sie eine bessere Vorhersage für SVR und HCV Clearance vor allem in Patienten mit afrikanischer Abstammung treffen. Der IFNL4 Genotyp TT/TT begünstigt die spontane und behandlungsinduzierte Virusclearance in HCV-Patienten, vor allem in jenen mit Typ 1 oder 4.

3. Kit Bestandteile 100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> weisser Deckel	1000 / 320 μ l
IL28B Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> violetter Deckel	550 / 550 μ l
IL28B TT/TT-Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> grüner Deckel	75 / 75 μ l
IL28B Δ G/ Δ G-Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> roter Deckel	75 / 75 μ l

Der RealFast™ 2x Genotyping Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der IL28B Assay Mix besteht aus *IFNL4* genspezifischen Primern und zwei allelspezifischen, doppelt-markierten Hydrolysesonden. Weiters sind Kontrolltemplates für den IL28B TT/TT und Δ G/ Δ G Genotyp im Kit vorhanden.

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

4. Lagerung und Stabilität

Der IL28B RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -20°C. Alternativ bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2-8°C. Die Reagenzien überdauern ohne Aktivitätsverlust bis zu 20 Einfrier-/Auftauzyklen. Vermeiden Sie längere Exposition gegenüber direktem Licht. Bei korrekter Lagerung behält der Kit seine volle Funktionsfähigkeit bis zum angegebenen Ablaufdatum.

5. Produktbeschreibung

5.1. Testprinzip

Der Test basiert auf dem fluorogenen 5'-Nuklease-Assay, bekannt auch als TaqMan®-Assay. Jede Reaktion enthält ein genspezifisches Primerpaar zur Amplifizierung eines 110 bp Fragments im *IFNL4* Gen und zwei doppelt-markierte, allelspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz des amplifizierten 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 homozygoten TT/TT Proben hybridisiert die **HEX-markierte TT-Sonde** an den komplementären Strang des amplifizierten Genfragments. Das Resultat ist ein starkes Fluoreszenzsignal im HEX-Kanal (556nm) und ein geringes, an der Basislinie liegendes Signal im FAM-Kanal (520nm). Im umgekehrten Fall von homozygoten Δ G/ Δ G Proben hybridisiert die **FAM-markierte Δ G-Sonde** an den komplementären Strang des amplifizierten Genfragments. Somit wird ein starkes Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal und ein geringes, an der Basislinie liegendes Signal im HEX-Kanal detektiert. Bei heterozygoten Proben binden beide Sonden an die Zielregion der Amplikons und verursachen ein intermediäres Signal in beiden Detektionskanälen.

5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der IL28B 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:

- ✓ 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)

» **Anmerkung:** RealFast™ Genotyping 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 μ M dem 2x Genotyping Mix zugefügt werden.

5.3. Testspezifikationen

Der IL28B RealFast™ Assay und ein Referenzkit zur Detektion der rs12979860 C>T Variante zeigten 99,4% Übereinstimmung der Ergebnisse bei 84 Proben. Von den 168 Allelen identifizierte der IL28B RealFast™ Assay 113 prognostisch günstige TT und 55 prognostisch ungünstige Δ G Allele, während der Referenzkit 114 günstige C und 54 ungünstige T Allele identifizierte. Die Sequenzierung der abweichenden Probe zeigte dass die korrelierenden Varianten rs368234815 TT> Δ G und rs12979860 C>T auf einem Chromosom nicht gekoppelt waren.

Die **Sensitivität** und **Spezifität** des IL28B RealFast™ Assays zeigte eine 100% Richtig-Positiv-Rate bzw eine 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 ng genomische DNA (pro Reaktion). Empfohlene DNA Konzentration: 2 bis 20 ng/ μ l 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 Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 μ l), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionssystem, Kühl- oder Gefrierschrank, Abfallbehälter.

7. Arbeitsanleitung

7.1. DNA Extraktion

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

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

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

7.2. PCR Kontrollen

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

Führen Sie in jedem Lauf **immer** die IL28B **TT/TT-Control** und die IL28B **ΔG/ΔG-Control** als Referenzsignale für unbekannte Proben durch. Einige real-time PCR Programme, beispielsweise für AB 7500 Fast, erfordern zur korrekten Auswertung im "Allelic Discrimination Plot" Signale für alle drei möglichen Genotypen. Zur Herstellung einer heterozygoten Kontrolle (TT/ΔG-Control) mischen Sie ein Aliquot von TT/TT-Control und ΔG/ΔG-Control im Verhältnis 1:1.

» **Anmerkung:** TT/TT- und ΔG/ΔG-Controls stellen potentielle Kontaminationsquellen dar und müssen daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

7.3. Vorbereitung des IL28B 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. 24+1 Reaktionen
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
IL28B Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

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

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

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

7.4. PCR Programm

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

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 <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension - Datenaufnahme im Green- und Yellow-Kanal

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

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

Kontrollen	Amplifikation im FAM-Kanal (520 nm)	Amplifikation im HEX-Kanal (556 nm)	Genotyp / HCV clearance
TT/TT-Control	NEIN	JA	homozygot TT / hoch
TT/ΔG -Control	JA	JA	heterozygot TT/ΔG / niedrig
ΔG/ΔG-Control	JA	NEIN	homozygot ΔG / niedrig
NTC	NEIN	NEIN	----

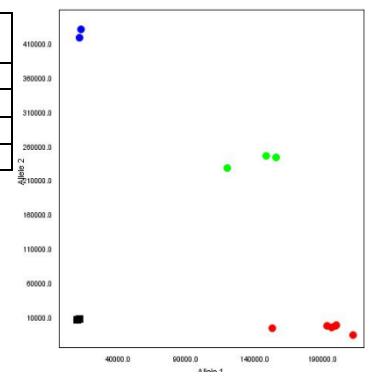
Einige Auswertprogramme benötigen manuell gesetzte Schwellenwerte (Threshold) zur korrekten Genotypisierung.

Empfehlungen zur Einstellung des Schwellenwertes (C_q):

Setzen Sie den Schwellenwert für den FAM-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der TT/TT-Control (HEX positiv). Setzen Sie umgekehrt den Schwellenwert für den HEX-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der ΔG/ΔG-Control (FAM positiv).

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

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



9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

IL28B RealFast™ Assay

REF 7-200 / 7-203 Σ 100 / 32 réactions
-20°C 2-8°C CE IVD



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

1. Utilisation

Le IL28B RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter la variante dinucléotide TT> Δ G dans le gène ou pseudogène *interferon lambda 4 humain (IFNL4)* qui se situe en amont du gène codé interleukine 28B (IL28B). Le génotypage de cette variante permet de prédire la guérison spontanée d'une Hépatite C (Clearance) et d'apporter une réponse durable (sustained virological response, SVR) à la thérapie ribavirine/interféron pégylé (pegIFN/RBV) chez les patients présentant une infection chronique. Ce test qualitatif permet de différencier les 3 génotypes IFN4 TT> Δ G possibles dans l'ADN humain, qui sont associés à une Clearance HCV spontanée ou induite par le traitement élevée (TT/TT) ou basse (TT/ Δ G et Δ G/ Δ G).

Séquence de référence: HGVS: NG_042193.1:g.1457_1458delAAinsC; NCBI dbSNP: rs368234815.

2. Introduction

Les infections HCV chroniques, qui touchent ~3% de la population mondiale, sont la cause principale de cirrhoses, de cancers du foie et de transplantations du foie. Le succès des thérapies standards avec pegIFN/RBV dépend des facteurs endogènes et de ceux du virus. Les patients infectés d'un virus HCV de type 1 ou 4 défavorables présentent un SVR plus bas que ceux infectés par le virus de type 2 et 3. Les facteurs endogènes influençant le succès du traitement sont l'âge, le genre, l'origine ethnique et les polymorphismes génétiques agissant sur l'activité virale. La variante *IFNL4* rs368234815 TT> Δ G est étroitement liée à rs12979860 C>T, un marqueur bien établi pour un succès thérapeutique durable. Des études ont attesté que rs368234815 est une variante fonctionnelle de la régulation IL28B mRNA. Comparée à la rs12979860, elle peut mieux prédire la SVR et la Clearance HCV spontanée, particulièrement pour les patients d'origine africaine. Le génotype IFNL4 TT/TT favorise la guérison spontanée et induite par le traitement chez les patients HCV, surtout de type 1 ou 4.

3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle blanc	1000 / 320 μ l
IL28B Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle violet	550 / 550 μ l
IL28B TT/TT -Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle vert	75 / 75 μ l
IL28B Δ G/ Δ G-Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle rouge	75 / 75 μ l

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymerase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le IL28B Assay Mix se compose de primers géno-spécifiques *IFNL4* et de deux sondes d'hydrolyse spécifiques d'allèle munies d'un double marqueur. De plus vous disposez dans le kit des matrices témoins pour le génotype IL28B TT/TT et Δ G/ Δ G.

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

4. Stockage et stabilité

Le IL28B RealFast™ Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception à -20°C. Ou bien si vous l'utilisez à court terme en l'espace d'un mois, conservez-le de 2 à 8°C. Les réactifs perdurent sans perdre leur activité jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation. Evitez les expositions prolongées à la lumière directe. Stocké de manière correcte, le kit conserve toute sa fonctionnalité jusqu'à la date de péremption indiquée.

5. Description du produit

5.1. Principe du test

Le test repose sur un test fluorogène à la nucléase 5', connu aussi sous le nom de TaqMan®-Assay. Chaque réaction contient une paire de primers génospcifiques qui amplifie un fragment 110 bp du gène *IFNL4* et deux sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques, munies d'un marqueur double, qui s'hybride à la séquence cible du fragment amplifié. 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 homozygotes TT/TT, la **sonde TT marquée HEX** s'hybride au brin complémentaire du fragment de gène amplifié. Il en résulte un fort signal fluorescent dans le canal HEX (556nm) et aucun signal ou un moins fort situé sur la ligne de base dans le canal FAM (520nm). Inversement, dans des échantillons homozygotes Δ G/ Δ G, la **sonde Δ G marquée FAM** s'hybride au brin complémentaire du fragment de gène amplifié. On peut ainsi détecter un signal fluorescent fort dans le canal FAM et aucun ou un signal plus faible situé sur la ligne de base dans le canal HEX. Pour les échantillons hétérozygotes (TT/ Δ G), les deux sondes se lient aux amplicons et génèrent un signal intermédiaire dans les deux canaux de détection.

5.2. Compatibilité avec les machines de la PCR temps réel

Le IL28B 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)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

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 μ M à 2x Genotyping Mix.

5.3. Spécifications du test

Le IL28B RealFast™ Assay et le kit de référence pour dépister la variante rs12979860 C>T ont montré une concordance des résultats à 99,4% pour 84 échantillons. De 168 allèles, le IL28B RealFast™ Assay a identifié 113 allèles TT favorables et 55 allèles Δ G défavorables, tandis que le kit de référence a identifié 114 allèles C favorables et 54 défavorables T. Le séquençage d'échantillon divergent montre que les variantes corollaires rs368234815 TT> Δ G et rs12979860 ne sont pas couplées sur un chromosome.

La **sensibilité** et la **spécificité** de IL28B RealFast™ Assay montre un taux de vrais positifs de 100 %, à savoir 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/ μ l 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 μ l), des pointes de pipettes stériles avec des filtres aérosol, eau ultrapure, système d'extraction d'ADN, réfrigérateur et congélateur, contenant pour déchets biomédicaux.

7. Procédure

7.1. Extraction de l'ADN

Les réactifs d'extraction d'ADN **ne sont pas inclus** dans le kit.

L'ADN isolé à partir de différents échantillons (par ex. sang total, gouttes de sang séché, frottement à l'intérieur de la joue ou salive) peut être utilisé. L'extrait d'ADN doit bien sûr convenir à une amplification en terme de concentration, de pureté et d'intégrité.

Pour réaliser un génotypage fiable, la quantité d'ADN pour chaque réaction doit se situer dans une fourchette de 10 à 100 ng pour tous les échantillons.

7.2. Contrôle de la PCR

Incluez **toujours** un **No Template Control (NTC)** dans chaque test pour contrôler la présence d'éventuelles contaminations. Il est recommandé d'effectuer les NTC (utilisez une eau ultrapure à la place de l'ADN) comme duplicat.

Effectuez **toujours** le IL28B **TT/TT-Control** et le IL28B **ΔG/ΔG-Control** pour chaque test comme signaux de référence pour des échantillons inconnus. Certains logiciels de la PCR en temps réel, comme par ex. AB 7500 Fast, nécessitent pour interpréter correctement les résultats des signaux pour l'ensemble des trois génotypes possibles dans la "Allelic Discrimination Plot". Pour réaliser un contrôle hétérozygote (TT/ΔG-Control) mélangez une aliquote du TT/TT-Control et du ΔG/ΔG-Control dans un rapport 1:1.

» **Remarque:** les TT/TT- et ΔG/ΔG-Controls représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin. «

7.3. Préparation du IL28B 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
IL28B Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Mettez **15 µl de Master-Mix** dans chaque godet. Pipetez et ajoutez **5 µl d'ADN** ou de **Control Template** pour obtenir un volume final de 20 µl.

Pour minimiser les risques de contaminations, pipetez les échantillons dans cet ordre: premièrement NTC, ensuite les échantillons, et finalement les contrôles positifs. Fermez immédiatement les récipients de réaction.

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

7.4. Programme de la PCR

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

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>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension – Réception de données dans le canal Green et Yellow

8. Analyse des données / interprétation des résultats

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

Contrôles	Amplification dans le canal FAM (520 nm)	Amplification dans le canal HEX (556 nm)	Génotype / Clearance HCV
TT/TT-Control	NON	OUI	TT / élevé
TT/ΔG -Control	OUI	OUI	TC / basse
ΔG/ΔG-Control	OUI	NON	CC / basse
NTC	NON	NON	----

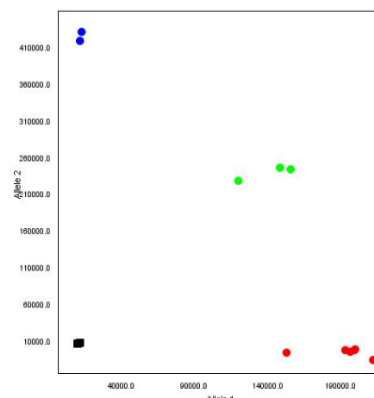
Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil (threshold) pour effectuer le génotypage correctement.

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

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM juste au-dessus du signal fluorescent de fond généré par le TT/TT-Control (HEX positif). Fixez à l'inverse la valeur seuil pour le canal HEX juste au-dessus du signal fluorescent de fond du ΔG/ΔG-Control (FAM positif).

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

Suivez les instructions de votre logiciel d'évaluation de la PCR en temps réel, pour analyser les données que vous avez obtenues.



9. Mises en garde et précautions

- Le kit est à utiliser uniquement pour des diagnostics *in vitro*.
- Pour manipuler les échantillons et les réactifs, mettez toujours des gants poudrés à usage unique et des vêtements de laboratoire appropriés.
- Effectuez l'extraction de l'ADN dans un endroit strictement séparé de celui où vous réalisez la préparation de la PCR.
- Utilisez un jeu de pipettes uniquement destiné à la préparation de la PCR et utilisez des pointes de pipettes avec un filtre aérosol.
- Utilisez uniquement des récipients PCR compatibles avec la machine, aux parois fines, avec un couvercle approprié à faire des mesures optiques.
- Ne mélangez pas de réactifs avec différents numéros de lot.
- N'utilisez pas de kits et de composants de kit périmés.

IL28B RealFast™ Assay

REF 7-200 / 7-203 Σ 100 / 32 reazioni
-20°C \updownarrow 2-8°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Utilizzo

IL28B RealFast™ Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione della variante frameshift del nucleotide TT> Δ G nel gene/pseudogene *interferone lambda 4 (IFNL4)*, situato a monte del gene che codifica per l'interleuchina 28B (IL28B). La genotipizzazione contribuisce a predire la risposta terapeutica nei pazienti affetti da virus dell'epatite C (HCV), per i quali si stia considerando una terapia con interferone pegilato e ribavirina (pegIFN/RBV). I portatori omozigoti dell'allele favorevole TT sono predisposti a una risposta virologica sostenuta (SVR) di tre volte più alta rispetto a quella dei portatori dell'allele Δ G. In un estratto di DNA umano il test qualitativo discrimina i tre possibili genotipi IFNL4 TT> Δ G associati a una *clearance* dell'HCV elevata (TT/TT) o scarsa (TT/ Δ G e Δ G/ Δ G) indotta da terapia oppure spontanea.
Sequenza di riferimento: HGVS: NG_042193.1:g.1457_1458delAAinsC; NCBI dbSNP: rs368234815.

2. Introduzione

L'infezione da HCV cronica colpisce circa il 3% della popolazione mondiale e rappresenta la causa principale di cirrosi, cancro del fegato e trapianto di fegato. Il successo della terapia pegIFN/RBV standard raccomandata dipende tanto da fattori virali quanto da fattori legati all'ospite. I pazienti affetti da HCV sfavorevole di tipo 1 o 4 hanno una SVR più bassa rispetto ai pazienti affetti dal tipo 2 o 3. I fattori legati all'ospite che influiscono sulla risposta alla terapia comprendono l'età, il genere, l'appartenenza etnica e i polimorfismi genetici che incidono sull'attività antivirale. La variante IFNL4 rs368234815 TT> Δ G è fortemente legata all'rs12979860 C>T, un *marker* consolidato per un successo terapeutico a lungo termine. Vari studi hanno dimostrato che l'rs368234815 è la variante funzionale per la regolazione dell'mRNA di IL28B e, paragonata all'rs12979860, è il miglior predittore della SVR e della *clearance* dell'HCV particolarmente in pazienti di ascendenza africana. Il genotipo TT/TT di IFNL4 favorisce la *clearance* virale spontanea e indotta da terapia nei pazienti con HCV, principalmente in quelli affetti dal tipo 1 o 4.

3. Contenuto del kit

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 fiala	□ tappo bianco	1000 / 320 μ l	100 / 32 Rxn
IL28B Assay Mix	1 fiala	■ tappo viola	550 / 550 μ l	
IL28B TT/TT-Control	1 fiala	■ tappo verde	75 / 75 μ l	
IL28B Δ G/ Δ G-Control	1 fiala	■ tappo rosso	75 / 75 μ l	

Il RealFast™ 2x Genotyping Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTP in un sistema tampone ottimizzato. IL28B Assay Mix consiste di primer specifici per il gene *IFNL4* e di due sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta. Insieme al kit sono forniti controlli che rappresentano i genotipi di IL28B TT/TT e Δ G/ Δ G.

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

4. Conservazione e stabilità

IL28B RealFast™ Assay viene inviato su blocchi refrigeranti. Al suo arrivo, conservare il kit a -20°C. In alternativa, il kit può essere conservato a una temperatura tra i 2 e gli 8°C per un uso a breve termine entro un mese. Il kit sopporta fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza perdita di attività. Evitare un'esposizione prolungata a luce intensa. Se conservato in modo adeguato, il kit manterrà piena attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

5. Descrizione del prodotto

5.1. Principio del Test

Il test è basato sul saggio fluorogenico della 5' nucleasi, anche denominato TaqMan® Assay. Ciascuna reazione contiene una coppia di primer gene-specifici che amplifica un frammento di 110 bp del gene *IFNL4*, e due sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta che ibridano con la sequenza target del frammento amplificato. 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 TT/TT omozigoti la **sonda marcata con HEX per TT** ibrida con il filamento complementare del frammento del gene. Nel canale HEX (556nm) si rileva un forte segnale di fluorescenza, mentre il segnale è assente o soltanto di base nel canale FAM (520nm). Viceversa, nei campioni Δ G/ Δ G omozigoti la **sonda per Δ G marcata con FAM** si lega al frammento del gene. Si rileva un forte segnale di fluorescenza nel canale FAM, mentre il segnale è assente o soltanto di base nel canale HEX. Nei campioni eterozigoti (TT/ Δ G) le sonde sia di tipo TT che Δ G si legano agli ampliconi, generando segnali intermedi in entrambi i canali.

5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

L'IL28B 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)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

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 μ M al 2x Genotyping Mix.

5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

IL28B RealFast™ Assay e il kit di riferimento per la rilevazione del polimorfismo rs12979860 C>T altamente legato hanno mostrato una concordanza del 99,4% dei risultati della genotipizzazione ottenuti su 84 campioni.

Su 168 alleli, il IL28B RealFast™ Assay ha identificato 113 alleli TT favorevoli e 55 Δ G sfavorevoli, mentre il kit di riferimento ha identificato 114 alleli C favorevoli e 54 alleli T sfavorevoli. Il sequenziamento di un campione discrepante ha rivelato che l'allele Δ G era presente, ma non correlato all'allele rs12979860 T su un cromosoma.

La **sensibilità** e la **specificità** dell'IL28B RealFast™ Assay hanno mostrato tassi del 100% sia di veri positivi sia di veri negativi.

Limite di rilevazione: 0.2 ng di DNA genomico (per reazione). Concentrazione di DNA raccomandata: da 2 a 20 ng/ μ l 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 compatibili con lo strumento, guanti monouso senza polvere, vortex, minicentrifuga per provette da 2.0 ml, portaprovette, set di micropipette calibrate (0.5 – 1000 μ l), 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'IL28B TT/TT-Control** e l'IL28B $\Delta G/\Delta G$ -Control come segnali di riferimento positivi per i vostri campioni non noti.

Alcuni software Real-time PCR, per es. l'AB 7500 Fast, richiedono segnali per tutti e tre i possibili genotipi per una corretta discriminazione allelica. Allo scopo di ottenere un controllo eterozigote (TT/ ΔG -Control), miscelare un'aliquota di TT/TT-Control e $\Delta G/\Delta G$ -Control in un rapporto 1:1.

» **Nota:** I TT/TT- e $\Delta G/\Delta G$ -Controls costituiscono potenziali fonti di contaminazione. Assicuratevi di maneggiarli con cautela. «

7.3. Preparazione del Master Mix dell'IL28B 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 μ l	250 μ l
IL28B Assay Mix	5 μ l	125 μ l
Master Mix	15 μl	375 μl

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

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

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

7.4. Programma della PCR

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

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 *)for 36-well rotor: 56°C	1 min	Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nel canale Green e Yellow

8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

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

Controlli	Amplificazione nel canale FAM (520 nm)	Amplificazione nel canale HEX (556 nm)	Genotipo / HCV clearance
TT/TT-Control	NO	SI	omozigote TT / elevata
TT/ ΔG -Control	SI	SI	eterozigote TT/ ΔG / scarsa
$\Delta G/\Delta G$ -Control	SI	NO	omozigote ΔG / scarsa
NTC	NO	NO	----

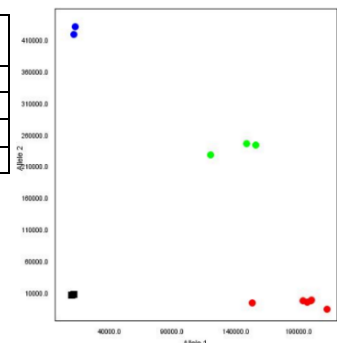
Alcuni software dello strumento richiedono l'impostazione manuale dei valori soglia (threshold) ai fini di un'accurata determinazione dei genotipi.

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

Impostare la soglia per il canale FAM immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal TT/TT-Control (HEX-positivo). Viceversa, impostare la soglia per il canale HEX immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal $\Delta G/\Delta G$ -Control (FAM-positivo).

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

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



9. Avvertenze e precauzioni

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

IL28B RealFast™ Assay

REF 7-200 / 7-203 Σ 100 / 32 reacciones
-20°C 2-8°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Aplicación

IL28B RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección de la variante de dinucleótido TT>ΔG en el *interferón humano lambda 4 (IFNL4)* gen, que se sitúa en flujo ascendente ante el gen que codifica la interleucina 28B (IL28B). Los portadores homocigóticos del alelo TT favorable están predispuestos a una respuesta virológica sostenida (sustained virological response, SVR) hasta tres veces mayor, que los portadores del alelo ΔG. La determinación del genotipo de esta variante permite la predicción de la hepatitis C curación (aclaramiento) espontánea y una respuesta sostenida en terapia de interferón/ribavirina pegilado (pegIFN/RBV) en pacientes con infección crónica. La prueba cualitativa discrimina en el extracto de ADN humano los tres genotipos posibles, que están asociados con la elevada (TT/TT) o bajo (TT/ΔG y ΔG/ΔG) inducido por tratamiento y aclaramiento espontáneo de HCV. Secuencia de referencia: HGVS: NG_042193.1:g.1457_1458delAAinsC; NCBI dbSNP: rs368234815.

2. Introducción

La infección crónica por el HCV (en castellano VHC), que afecta a un 3% de la población mundial, es la causa principal de la cirrosis, el cáncer de hígado y el trasplante de hígado. El éxito de la terapia estándar recomendada con pegIFN/RBV depende de factores virales y del huésped. Los pacientes que están infectados con el HCV de pronóstico adverso de tipo 1 o 4, tienen una SVR menor que los infectados con el tipo 2 o tipo 3. Los factores del organismo que hospeda que influyen en el éxito del tratamiento son la edad, el género, el origen étnico y la actividad del virus que afecta a los polimorfismos genéticos. La variante *IFNL4* rs368234815 TT>ΔG está estrechamente vinculada con rs12979860 C>T, un marcador bien establecido para el éxito terapéutico a largo plazo. Los estudios han confirmado a rs368234815 como la variante funcional de la regulación de la IL28B mRNA. En comparación con rs12979860 puede efectuar una mejor predicción para SVR y HCV aclaramiento en particular en pacientes de origen africano. El *IFNL4* genotipo TT/TT favorece el aclaramiento viral espontáneo e inducido con el tratamiento en pacientes con HCV (hepatitis C), especialmente en aquellos con el tipo 1 o 4.

3. Componentes del kit

		100 / 32 Rxn
RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 vial □ tapón blanco	1000 / 320 µl
IL28B Assay Mix	1 vial ■ tapón violeta	550 / 550 µl
IL28B TT/TT-Control	1 vial ■ tapón verde	75 / 75 µl
IL28B ΔG/ΔG-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 IL28B Assay Mix se compone de *IFNL4* primers de genes específicos y dos sondas de hidrólisis, doblemente marcadas alelo-específicas. Además en el kit se incluyen las plantillas de control para el genotipo IL28B TT/TT y el ΔG/ΔG.

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

4. Almacenamiento y estabilidad

El IL28B RealFast™ Assay se suministra sobre bloques de enfriamiento. Conserve el kit a -20°C después de su recepción. Alternativamente para su utilización en el espacio de un mes a 2 hasta 8°C. Los reactivos sobreviven sin pérdida de actividad hasta 20 ciclos de congelación/descongelación. Evite la exposición prolongada a la luz directa. Cuando se conserva correctamente, el kit mantiene su funcionalidad hasta la fecha de caducidad indicada.

5. Descripción del producto

5.1. Principio de la prueba

La prueba basada en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocido como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene un par de cebadores (primers) específicos de gen para la amplificación de un fragmento de 110 pb en el gen *IFNL4* y dos sondas de hidrólisis doblemente marcadas alelo específicas, que enlazan con la secuencia de objetivo del fragmento amplificado. La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad 5' - 3' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq escinde el reporter de la sonda hibridada. La separación espacial del fluoróforo del quencher ocasiona una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR.

En las muestras de homocigotos TT/TT la **sonda TT marcada-HEX** hibrida a la cadena complementaria del fragmento de gen amplificado. El resultado es una intensa señal de fluorescencia en el canal HEX (556nm) y una baja señal situada en la línea de base en el canal FAM (520 nm). En el caso inverso de las muestras homocigotos ΔG/ΔG la **sonda ΔG marcada-FAM** hibrida a la cadena complementaria del fragmento de gen amplificado. De este modo se detecta una intensa señal de fluorescencia en el canal FAM, y una baja señal situada en la línea de base en el canal HEX. Para las muestras heterocigóticas (TT/ΔG) las dos sondas se unen en la zona de destino de los amplicones y generan una señal intermedia en los dos canales de detección.

5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

El IL28B 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 Cyclers (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

¡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 prueba IL28B RealFast™ Assay y un kit de referencia para la detección de rs12979860 C>T mostraron un 99,4% de coincidencia de los resultados con 84 muestras.

De los 168 alelos el IL28B RealFast™ Assay identificaba 113 de pronóstico favorable TT y 55 alelos ΔG de pronóstico desfavorable, mientras que el kit de referencia identificaba 114 favorables C y 54 desfavorables alelos T. La secuenciación de la prueba divergente mostraba que las variantes correlacionadas rs368234815 TT>ΔG y rs12979860 C>T no estaban vinculados a un cromosoma.

La **sensibilidad** y **especificidad** del ensayo IL28B RealFast™ Assay demostró una tasa positiva correcta en un 100% bien una tasa negativa correcta en un 100%, respectivamente.

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

Realice en cada ejecución **siempre** el IL28B **TT/TT-Control** y el IL28B **ΔG/ΔG-Control** como señales de referencia para las muestras desconocidas. Algunos programas de PCR en tiempo real, tales como AB 7500 Fast, requieren para la correcta evaluación en el "Allelic Discrimination Plot" las señales para los tres posibles genotipos. Para producir un control heterocigoto (TT/ΔG-Control) mezcle una alícuota de TT/TT-Control y ΔG/ΔG-Control en la proporción 1:1.

» **Nota:** Los TT/TT- y ΔG/ΔG-Controls pueden ser fuentes potenciales de contaminación y por lo tanto deben manejarse con mucho cuidado. «

7.3. Preparación de IL28B 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
IL28B 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 µl 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 la "Allelic Discrimination" o "Experimentos de genotipo". 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 *)for 36-well rotor: 56°C	1 min	Annealing/Extensión - registro de datos en el canal Green y Yellow

8. Análisis de datos / Interpretación de los resultados

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

Controles	Amplificación en FAM-canal (520 nm)	Amplificación en HEX-canal (556 nm)	Genotipo / HCV aclaramiento
TT/TT-Control	NO	SI	homocigoto TT / elevada
TT/ΔG -Control	SI	SI	heterocigoto TT/ΔG / bajo
ΔG/ΔG-Control	SI	NO	homocigoto ΔG / bajo
NTC	NO	NO	---

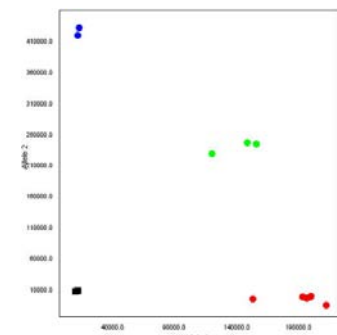
Algunos programas de evaluación tienen que configurar manualmente el valor límite (threshold) para el genotipo correcto.

Recomendaciones para establecer el valor límite (C_q):

Fije el valor límite para el canal FAM ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del TT/TT-Control (HEX positivo). Ponga a la inversa el valor límite para el HEX-canal ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del ΔG/ΔG-Control (FAM positivo).

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

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



9. Indicaciones y medidas de seguridad

- El kit se destina únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Al manipular muestras y reactivos utilice siempre guantes desechables sin polvo y vestimenta adecuada de laboratorio.
- Entre las áreas para la extracción de ADN y 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.

IL28B RealFast™ Assay

REF 7-200 / 7-203 100 / 32 reações

-20°C / 2-8°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Utilização prevista

O IL28B RealFast™ Assay é um teste de PCR em tempo real rápido e preciso para a deteção da variante frameshift do dinucleótido TT>ΔG do gene/pseudogene do *interferão lambda 4 (IFNL4)* humano, localizado a montante do gene que codifica a interleucina 28B (IL28B). A determinação do genótipo ajuda a prever a resposta terapêutica em doentes infetados pelo vírus da hepatite C (VHC) considerados para a terapêutica com interferão-peguilado/ribavirina (pegIFN/RBV). Os portadores homocigóticos do alelo TT favorável apresentam predisposição para uma resposta virológica sustentada (RVS) três vezes superior à dos portadores do alelo ΔG. Num extrato de ADN humano, o ensaio qualitativo discrimina os três possíveis genótipos IFNL4 TT>ΔG associados a elevada (TT/TT) ou baixa (TT/ΔG e ΔG/ΔG) eliminação do VHC, induzida pelo tratamento ou espontânea.

Sequência de referência: HGVS: NG_042193.1:g.1457_1458delAAinsC; NCBI dbSNP: rs368234815.

2. Introdução

A infeção crónica pelo VHC afeta cerca de 3% da população mundial e é a principal causa de cirrose, cancro do fígado e transplantação hepática. O êxito da terapêutica padrão com pegIFN/RBV recomendada depende de fatores tanto virais como do hospedeiro. Os doentes infetados com o tipo 1 ou 4 desfavoráveis apresentam menor RVS do que os infetados pelo tipo 2 ou 3. Os fatores do hospedeiro que influenciam a resposta do tratamento incluem a idade, o sexo, a etnia e polimorfismos genéticos que afetam a atividade antiviral. A variante rs368234815 TT>ΔG do *IFNL4* está fortemente associada a rs12979860 C>T, um marcador bem estabelecido do êxito da terapêutica a longo prazo. Vários estudos demonstraram que rs368234815 é a variante funcional da regulação do ARNm de IL28B e, em comparação com rs12979860, melhor preditor da RVS e da eliminação do VHC, sobretudo em doentes de ascendência africana. O genótipo TT/TT do *IFNL4* favorece tanto eliminação viral tanto espontânea como induzida pelo tratamento em doentes com VHC, sobretudo nos infetados com o tipo 1 ou 4.

3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 ampola	□ tampa branca	1000 / 320 µl
IL28B Assay Mix	1 ampola	■ tampa roxa	550 / 550 µl
IL28B TT/TT-Control	1 ampola	■ tampa verde	75 / 75 µl
IL28B ΔG/ΔG-Control	1 ampola	■ tampa vermelha	75 / 75 µl

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

A IL28B Assay Mix consiste em primers do gene *IFNL4* e duas sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo. Os controlos representativos do genótipo IL28B TT/TT e ΔG/ΔG são fornecidos com o kit.

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

4. Armazenamento e estabilidade

O IL28B RealFast™ Assay é enviado em blocos de arrefecimento. Após a receção, armazene o kit a -20°C. Em alternativa, armazene entre 2 e 8°C para utilização a curto prazo, dentro de um mês. O kit suporta até 20 ciclos de congelamento/descongelamento sem ocorrer perda de atividade. Evitar a exposição prolongada a luz intensa. Se for armazenado corretamente, o kit permanece totalmente ativo até à data de validade indicada no rótulo.

5. Descrição do produto

5.1. Princípio do teste

O teste utiliza o ensaio fluorogénico 5' nuclease, também conhecido como ensaio TaqMan®. Cada reação contém um par de iniciadores específicos do gene, que amplificam um fragmento de 110 bp do gene *IFNL4*, assim como duas sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo, que hibridizam a sequência alvo do fragmento amplificado. A proximidade do gene repórter fluorescente 5' e o corante supressor 3' em sondas intactas impede a fluorescência do gene repórter. Durante a fase de extensão da PCR, a atividade da exonuclease 5' – 3' da Taq DNA polimerase cliva o gene repórter fluorescente 5' da sonda hibridada. A separação física do fluoróforo do corante supressor produz um sinal fluorescente em tempo real, que é proporcional ao produto de PCR acumulado.

Em amostras TT/TT homocigóticas, a **sonda TT marcada com HEX** é hibridada com a cadeia complementar do fragmento do gene. É detetado um sinal fluorescente forte no canal HEX (556 nm), ao passo que não é detetado qualquer sinal ou é detetado apenas um sinal de base no canal FAM (520 nm). Inversamente, em amostras ΔG/ΔG homocigóticas, a **sonda ΔG marcada com FAM** liga-se ao fragmento do gene. É detetado um sinal fluorescente forte no canal FAM, ao passo que não é detetado qualquer sinal ou é detetado apenas um sinal de base no canal HEX. Em amostras heterocigóticas (TT/ΔG), ambas as sondas ligam-se aos amplificadores e produzem sinais intermédios em ambos os canais.

5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O IL28B 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™ Genotyping 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

O IL28B RealFast™ Assay e um kit de referência para a deteção do polimorfismo rs12979860 C>T altamente ligado revelaram 99,4% de concordância nos resultados de determinação do genótipo em 84 amostras.

Dos 168 alelos, o IL28B RealFast™ Assay identificou 113 alelos TT favoráveis e 55 alelos ΔG, enquanto o kit de referência identificou 114 alelos C favoráveis e 54 alelos T desfavoráveis. A sequência de uma amostra discrepante revelou que o alelo ΔG estava presente, mas que não estava correlacionado com o alelo T rs12979860 em um cromossoma.

A **sensibilidade** e a **especificidade** do IL28B RealFast™ Assay apresentaram 100% de verdadeiros positivos e 100% de verdadeiros negativos, respetivamente.

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 IL28B **TT/TT-Control** e o IL28B **$\Delta G/\Delta G$ -Control** como sinais de referência positiva para as amostras desconhecidas.

Alguns softwares de PCR em tempo real, p.ex., AB 7500 Fast, necessita de receber sinais dos três genótipos possíveis para a discriminação correta dos alelos. Para obter um controlo heterozigótico (TT/ ΔG -Control), misture uma alíquota do TT/TT-Control e do $\Delta G/\Delta G$ -Control numa proporção de 1:1.

» **Nota:** Os TT/TT- e $\Delta G/\Delta G$ -Controls são potenciais fontes de contaminação. Manuseie com cautela. «

7.3. Preparação da IL28B 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 μ l	250 μ l
IL28B Assay Mix	5 μ l	125 μ l
Master-Mix	15 μl	375 μl

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

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

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

7.4. Programa de PCR

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

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P
e outros instrumentos de bloco de calor Peltier:

MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000*):

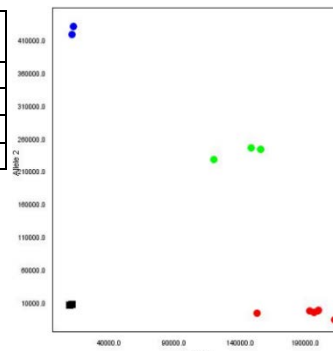
Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	95°C	3 min	Desnaturação inicial
40	95°C	15 sec	Desnaturação
	60°C	1 min	Hibridação/Extensão- Aquisição de dados no canal FAM e HEX

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

8. Análise dos dados/interpretação dos resultados

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

Controlos	Amplificação no canal FAM (520 nm)	Amplificação no canal HEX (556 nm)	Genótipo / eliminação do VHC
TT/TT-Control	NÃO	SIM	homozigótico TT / elevada
TT/ ΔG -Control	SIM	SIM	heterozigótico TT/ ΔG / baixa
$\Delta G/\Delta G$ -Control	SIM	NÃO	homozigótico ΔG / baixa
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 TT/TT-Control (HEX positivo). Inversamente, defina o valor do limiar para o canal HEX imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo $\Delta G/\Delta G$ -Control (FAM positivo).

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.