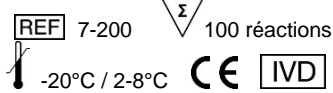


# IL28B RealFast™ Assay



100 réactions



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. Utilisation

Le IL28B RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter la variante dinucléotide TT>ΔG 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>ΔG possibles dans l'ADN humain, qui sont associés à une Clearance HCV spontanée ou induite par le traitement élevée (TT/TT) ou basse (TT/ΔG et ΔG/ΔG).

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>ΔG 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

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 Vial	□ couvercle blanc	1000 µl
IL28B Assay Mix	1 Vial	■ couvercle violet	550 µl
IL28B TT/TT -Control	1 Vial	■ couvercle vert	75 µl
IL28B ΔG/ΔG-Control	1 Vial	■ couvercle rouge	75 µl

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 gène-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 ΔG/ΔG.

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

## 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 gènespécifiques 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 ΔG/ΔG, la **sonde ΔG 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/ΔG), 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)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ 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](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

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 ΔG 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>ΔG 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/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.

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
<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 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 – <b>Réception de données</b> dans le canal FAM et HEX

**Rotor-Gene® 6000:**

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

## 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 apparaît en bas à gauche.

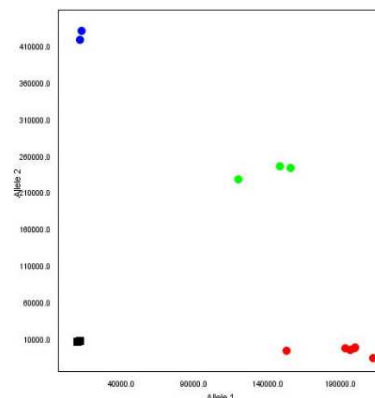
Contrôles	Amplification dans le canal FAM (520 nm)	Amplification dans le canal HEX (556 nm)	Génotype / Clearance HCV
TT/TT-Control	NON	OUI	TT / élevé
TT/ΔG -Control	OUI	OUI	TC / basse
ΔG/ΔG-Control	OUI	NON	CC / basse
NTC	NON	NON	----

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<sub>q</sub>):

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).

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.