




HLA-B5701 RealFast™ Assay

REF 7-610 Σ 100 réactions
-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. Utilisation

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

2. Introduction

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

3. Composants du kit

RealFast™ 2x **Genotyping Mix** 1 Vial  couvercle blanc 1000 µl
HLA-B5701 **Assay Mix** 1 Vial  couvercle violet 550 µl
HLA-B5701 **Positive Control** 1 Vial  couvercle vert 75 µl

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le HLA-B5701 Assay Mix se compose de primers géno-spécifiques et de sondes d'hydrolyse munies de marqueurs doubles pour HLA-B5701 et d'un gène témoin. Le kit dispose de plus d'un contrôle positif pour HLA-B5701.

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

4. Stockage et stabilité

Le HLA-B5701 RealFast™ Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception 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 des paires de primers géno-spécifiques pour amplifier un fragment 97 bp du gène HLA-B5701 et un fragment 147 bp d'un gène témoin, ce dernier sert de contrôle à la PCR. Les autres composants sont deux sondes hydrolyses géno-spécifiques munies d'un double marqueur qui s'hybrident à la séquence cible du fragment correspondant. La proximité directe entre les indicateurs fluorescents 5' et les colorants 3' sur une sonde intacte inhibe la fluorescence. Au cours de la PCR l'activité exonucléase 5' – 3' de la polymérase ADN Taq clive l'indicateur fluorescent 5' de l'échantillon hybridisé. La séparation spatiale du fluorophore du quencher provoque un signal fluorescent en temps réel, qui est proportionnel à la quantité du produit de la PCR.

Dans les échantillons testés positifs HLA-B5701, la **sonde marquée FAM HLA-B5701** tout comme le **contrôle PCR marqué HEX** s'hybrident sur le fragment du gène approprié. On peut détecter une forte fluorescence dans le canal FAM (520nm) et dans le canal HEX (556nm). Dans les échantillons testés négatifs HLA-B5701, seule la sonde marquée HEX du contrôle PCR, s'hybride au brin complémentaire du fragment du gène témoin. On peut ainsi détecter un signal de forte fluorescence dans le canal HEX et, dans le canal FAM, aucun ou bien seulement un signal plus faible sur la ligne de base.

5.2. Compatibilité avec les machines de la PCR temps réel

Le HLA-B5701 RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast.

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

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

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

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

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

5.3. Spécifications du test

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

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

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

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.

Incluez **toujours** le HLA-B5701 **Positive Control** comme signal de référence positif pour des échantillons inconnus.

» **Remarque:** les échantillons de contrôle représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin. «

7.3. Préparation du HLA-B5701 RealFast™ Master Mix

Décongelez complètement toutes les solutions, centrifugez-les brièvement après les avoir mélangées avec précaution. La réalisation de la PCR s'effectue à température ambiante. Préparez suffisamment de **Master Mix** pour le nombre total d'amorces PCR prévues (N échantillons + contrôles positifs + contrôles négatifs) et calculez en plus au moins une réaction supplémentaire pour compenser une imprécision de pipetage:

Composants	Par réaction	Par ex. 24+1 réactions
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B5701 Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

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

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

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

7.4. Programme de la PCR

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

AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P
et autres machines reposant sur le bloc thermique Peltier:

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	3 min	Dénaturation initiale
40	95 °C	15 sec	Dénaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Réception de données dans le canal FAM et HEX

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 72-well rotor: 60°C	1 min	Annealing/Extension – Réception de données dans le canal Green et Yellow

8. Analyse des données / interprétation des résultats

La présence ou l'absence de l'allèle HLA-B5701 est définie si un signal apparaît ou non dans le **canal FAM**. La réussite d'une PCR peut être vérifiée par une amplification du gène témoin qui sera détectée dans le **canal HEX** (contrôle PCR). Ainsi, les échantillons d'ADN génomique testés positifs HLA-B5701 tout comme le HLA-B5701 Positive Control montre une amplification dans les deux canaux, le canal HEX et le canal FAM. Les échantillons testés négatifs HLA-B5701 manifeste une amplification uniquement dans le canal HEX. La fluorescence et les courbes d'amplification correspondantes sont représentées automatiquement dans le logiciel PCR en temps réel dans les graphiques d'amplification.

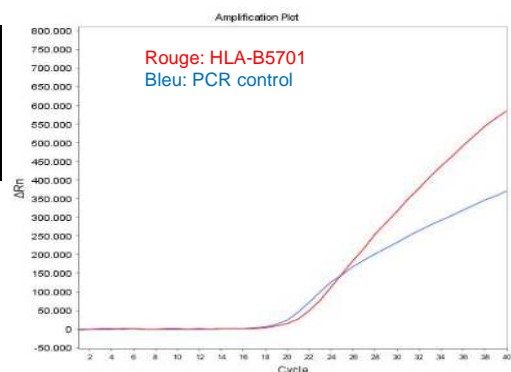
Echantillon	Amplification dans le canal FAM (520 nm)	Amplification dans le canal HEX (556 nm)
HLA-B5701 positif	OUI	OUI
HLA-B5701 négatif	NON	OUI
HLA-B5701 Positive Control	OUI	OUI
NTC	NON	NON

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 et le canal HEX un peu au-dessus du signal fluorescent généré par le No Template Control (NTC).

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.