

AAT mpx RealFast™ Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

REF 7-265 / 7-268 Σ 100 / 32 reactions

-30°C / -15°C



1. Intended Use

The AAT RealFast™ Assay is a fast and accurate real-time PCR based test for the simultaneous detection of the protease inhibitor (PI) variants *S and *Z of the *SERPINA1* gene. These are the most frequent alleles associated with alpha-1 antitrypsin (AAT) deficiency. The kit is intended for use as a diagnostic tool to identify alpha-1 antitrypsin deficient patients carrying a PI*S or PI*Z allele. In a human DNA extract, the qualitative assay discriminates the possible PI genotypes: normal *MM, heterozygous *MS, *MZ or *SZ, homozygous *SS or *ZZ.

Reference sequence: NG_008290.1; HGVS: PI*S: g.14768A>T, dbSNP: rs17580; PI*Z: g.17083G>A; dbSNP: rs28929474.

2. Introduction

Alpha-1 antitrypsin deficiency is one of the most common hereditary disorders in persons of northern European heritage. The protease inhibitor alpha-1 antitrypsin (AAT) is mainly synthesized in the liver and inactivates proteases like neutrophil elastase in the lung of healthy individuals. Deficient variants are characterized by low serum levels of AAT and, for some alleles including the Z allele, also decreased enzymatic function. Unhindered proteolysis in the lungs causes damage of alveolar tissue and development of chronic obstructive pulmonary disease (i.e. emphysema, persistent airflow obstruction, and/or chronic bronchitis). Accumulation of abnormal AAT in the liver leads to liver disease, especially cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Individuals carrying the PI*ZZ genotype are at a high risk of developing emphysema and liver disease, whereas the PI*SZ genotype is associated with a somewhat lower risk to become symptomatic. For PI*MZ individuals the situation is less clear, but accelerated lung destruction especially in smokers, has been reported. Carriers of PI*MM, *MS or *SS have normal or only slightly decreased AAT plasma levels.

3. Kit Contents

100 / 32 Rxn

| | | |
|----------------------------|--------------------|---------------|
| RealFast™ 2x mpx Probe Mix | 1 vial white cap | 1000 / 320 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 1 vial purple cap | 550 / 550 µl |
| AAT mpx WT-Control | 1 vial green cap | 75 / 75 µl |
| AAT mpx MUT-Control | 1 vial red cap | 75 / 75 µl |

The RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The AAT mpx Assay Mix consists of *SERPINA1* gene-specific primers and four allele-specific, dual-labeled hydrolysis probes. Controls representing wild type (WT-Control) and homozygous mutant (MUT-Control) 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

AAT mpx RealFast™ Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -30 to -15°C. Alternatively, store at 2 to 8°C for short-term use within one month. The kit withstands up to 20 freeze/thaw cycles with no loss of activity. Avoid prolonged exposure to intense light. If stored correctly, the kit will retain full activity until the expiration date indicated on the label.

5. Product Description

5.1. Principle of the Test

The test is based on the fluorogenic 5' nuclease assay, also known as TaqMan® assay. Each reaction contains two gene-specific primer pairs which amplify a 145 bp and a 153 bp fragment of the *SERPINA1* gene, as well as four dual-labeled, allele-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequences of the amplified fragments. 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.

| Hydrolysis probe | Fluorophore | Channel |
|------------------|-------------|---------|
| PI*S mutant | FAM | 520 nm |
| PI*M wild type | HEX | 556 nm |
| PI*Z mutant | ROX | 605 nm |
| PI*M wild type | Cy5 | 670 nm |

In normal samples the **wild type probes** generate a strong fluorescence signal in the HEX or Cy5 channel and no or only a baseline signal in the FAM or ROX channel. Vice versa, in homozygous mutant samples the hybridized **mutant probes** generate a strong fluorescence signal in the FAM or ROX channel and no or only a baseline signal in the HEX or Cy5 channel. In heterozygous samples both wild type and mutant probes bind to the amplicons and generate intermediate signals in the respective channels.

5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The AAT mpx 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, HEX, Cy5 and ROX fluorescence:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyclers (bms)
- ✓ 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. «

The kit is **not suitable** for use with real-time PCR instruments requiring ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 64 alleles testing positive for the PI*S and/or PI*Z allele with a CE-marked reference kit. The AAT mpx RealFast™ Assay determined all 64 alleles as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 62 alleles testing negative for the PI*S or PI*Z allele with a CE-marked reference kit. The AAT mpx RealFast™ Assay determined all 62 alleles as negative, which equaled a true negative rate of 100%.

Limit of detection: 0.2 ng genomic DNA (per reaction).

Recommended DNA concentration: 2 to 20 ng/µl genomic DNA.

6. Materials Required but not Supplied

Real-time PCR instrument with FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) and Cy5 (670 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 AAT mpx **WT-Control** and AAT mpx **MUT-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 (HET-Control), mix an aliquot of WT-Control and MUT-Control in a ratio of 1:1.

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

7.3. Preparation of AAT mpx 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 mpx Probe Mix | 10 µl | 250 µl |
| AAT mpx 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:

| Program | | | AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, and other Peltier heating-block based instruments | MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor) |
|---------|-------------|--------|---|--|
| Cycles | Temp | Time | Steps | Steps |
| 1 | 95°C | 3 min | Initial denaturation | Initial denaturation |
| 40 | 95°C | 15 sec | Denaturation | Denaturation |
| | 60°C | 1 min | Annealing/Extension – Data acquisition on FAM, HEX, ROX and Cy5 channels | Annealing/Extension – Data acquisition on Green, Yellow, Orange and Red channels |

8. Data Analysis / Interpretation of Results

The genotype of each sample is determined by calculating the ratio between signals recorded in the **HEX** or **Cy5 channel (normal)** and signals recorded in the **FAM** or **ROX channel (mutant)**. Most real-time PCR software automatically resolves data of two channels channels into clusters in a scatterplot. Data points plotted along the x- and y-axes correspond to normal and homozygous mutant genotypes, respectively. Data points clustered in the middle of the scatterplot represent heterozygous genotypes. The NTC appears in the lower left corner.

| Controls / Samples | Amplification in channel | | | | Genotype PI* alleles |
|--------------------|--------------------------|---------------|---------------|------------|---|
| | FAM Green | HEX Yellow | ROX Orange | Cy5 Red | |
| mpx WT-Control | NO | YES | NO | YES | PI*MM (normal) |
| mpx HET-Control | YES | YES | YES | YES | PI*SZ (heterozygous) |
| mpx MUT-Control | YES | NO | YES | NO | ---- (positive control for PI*S and PI*Z) |
| NTC | NO | NO | NO | NO | ---- |
| Sample 1 | YES | YES | NO | YES | PI*MS (heterozygous) |
| Sample 2 | YES | NO | NO | YES | PI*SS (homozygous) |
| Sample 3 | NO | YES | YES | YES | PI*MZ (heterozygous) |
| Sample 4 | NO | YES | YES | NO | PI*ZZ (homozygous) |

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

Recommendations for Threshold Settings (C_q):

Set threshold value for the FAM and ROX channels just above the background fluorescent signal generated by the WT-Control (HEX-/Cy5-positive). Vice versa, set threshold value for the HEX and Cy5 channels just above the background fluorescent signal of the MUT-Control (FAM-/ROX-positive).

Samples crossing the threshold line beyond C_q 37 give invalid results and must be repeated.

To analyze acquired data, please follow your instrument software instructions.

9. Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostics use only.
- Always use disposable powder-free gloves and wear suitable lab coat when handling specimens and reagents.
- Perform reaction setup in an area separate from nucleic acid preparation and PCR product analysis.
- Use pipettes dedicated for PCR setup only, use aerosol-guarded pipette tips.
- Use instrument-compatible reaction vessels with optically clear caps or sealers.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use expired kits or kit components.

AAT mpx RealFast™ Assay



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

REF 7-265 / 7-268 Σ 100 / 32 Reaktionen
-30°C / -15°C CE IVD



1. Verwendungszweck

Der AAT mpx RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion der PI*S und PI*Z Varianten des *SERPINA1* Gens. Diese stellen die häufigsten Allele dar, welche mit Alpha-1-Antitrypsin-Mangel assoziiert sind. Der Kit ist als diagnostisches Hilfsmittel zur Identifizierung von Patienten, die ein PI*S und PI*Z Allel tragen, geeignet. Der qualitative Test unterscheidet in humaner DNA die möglichen PI Genotypen: normal *MM, heterozygot *MS, *MZ oder *SZ, homozygot *SS oder *ZZ.
Referenz Sequenz: NG_008290.1; HGVS: PI*S: g.14768A>T, dbSNP: rs17580 / PI*Z: g.17083G>A, dbSNP: rs28929474.

2. Einleitung

Alpha-1-Antitrypsin-Mangel ist eine der häufigsten vererbaren Erkrankungen bei Personen nordeuropäischer Abstammung. Der Proteaseinhibitor Alpha-1-Antitrypsin (AAT) wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und inaktiviert Proteasen wie die neutrophile Elastase in der Lunge gesunder Individuen. Fehlerhafte Varianten führen zu niedrigen AAT-Werten im Serum, und bei manchen Allelen, wie dem Z-Allel, kommt eine verminderte enzymatische Funktion hinzu. Ungehinderte Proteolyse in der Lunge verursacht eine Schädigung des alveolären Gewebes und die Entstehung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (Lungenemphysem, Erhöhung des Atemwegswiderstandes, chronisch-obstruktive Bronchitis). Die Anreicherung von anomalem AAT in der Leber führt zu Lebererkrankungen, vor allem zu Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom. Träger des PI*ZZ-Allels haben ein hohes Risiko ein Lungenemphysem und eine Lebererkrankung zu entwickeln, wohingegen PI*SZ Träger ein etwas geringeres Risiko haben symptomatisch zu werden. Die Situation ist weniger eindeutig für Träger des PI*MZ-Allels, aber eine beschleunigte Zerstörung der Lunge wurde insbesondere bei Rauchern beschrieben. Träger der PI*MM, *MS oder *SS Allele haben normale oder nur leicht reduzierte AAT Plasmaspiegel.

3. Kit Bestandteile

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix 1 Vial weisser Deckel 1000 / 320µl
AAT mpx Assay Mix 1 Vial violetter Deckel 550 / 550µl
AAT mpx WT-Control 1 Vial grüner Deckel 75 / 75µl
AAT mpx MUT-Control 1 Vial roter Deckel 75 / 75µl

Der RealFast™ 2x mpx Probe Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der AAT mpx Assay Mix besteht aus *SERPINA1* genspezifischen Primern und vier allelspezifischen, doppelt-markierten Hydrolysesonden. Weiters sind Kontrolltemplates für den normalen (WT-Control) und homozygot mutierten (MUT-Control) Genotyp im Kit vorhanden.

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

4. Lagerung und Stabilität

Der AAT mpx RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°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 zwei genspezifische Primerpaare zur Amplifizierung eines 145 bp und eines 153bp Fragments im *SERPINA1* Gen, sowie vier 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.

| Hydrolysesonde | Fluorophor | Kanal |
|----------------|------------|--------|
| PI*S Mutante | FAM | 520 nm |
| PI*M Wildtyp | HEX | 556 nm |
| PI*Z Mutante | ROX | 605 nm |
| PI*M Wildtyp | Cy5 | 670 nm |

In normalen Proben erzeugen die **Wildtyp-Sonden** ein starkes Fluoreszenzsignal im HEX- oder Cy5-Kanal und kein oder an der Basislinie liegendes Signal im FAM- oder ROX-Kanal. Im Fall von homozygot mutierten Proben erzeugen die **Mutanten-Sonden** ein starkes Signal im FAM- oder ROX-Kanal, und kein oder an der Basislinie liegendes Signal im HEX- oder Cy5-Kanal. Bei heterozygoten Proben binden beide Wildtyp- und Mutanten-Sonden an die Amplikons und verursachen ein intermediäres Signal in den entsprechenden Detektionskanälen.

5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der AAT mpx 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-, HEX-, Cy5- und ROX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel:

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

» **Anmerkung:** RealFast™ Genotyping QuickGuides zur Programmierung und Auswertung von Assays auf verschiedenen Geräten sind als Download verfügbar: www.viennalab.com. «

Der Kit **eignet sich nicht** für die Verwendung mit real-time PCR Geräten, die ROX zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 64 Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest positiv auf PI*S und/oder PI*Z Allele getestet wurden, bestimmt. AAT mpx RealFast™ Assay typisierte alle 64 Allele als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 62 Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest negativ auf PI*S und/oder PI*Z getestet wurden, bestimmt. Der AAT mpx RealFast™ Assay typisierte alle 62 Allele als negativ = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 ng genomische DNA (pro Reaktion).

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

6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) und Cy5 (670 nm) Filter, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), 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 AAT mpx **WT-Control** und AAT mpx **MUT-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 (HET-Control) mischen Sie ein Aliquot von WT-Control und MUT-Control im Verhältnis 1:1.

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

7.3. Vorbereitung des AAT mpx RealFast™ Master-Mixes

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

| Komponente | pro Reaktion | z.B. 24+1 Reaktionen |
|----------------------------|--------------|----------------------|
| RealFast™ 2x mpx Probe Mix | 10 µl | 250 µl |
| AAT mpx 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. Wenn nötig kurz zentrifugieren. «

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:

| Programm | | | AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, und andere Peltier-Heizblock- basierende Geräte | MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor) |
|----------|------|--------|---|--|
| Zyklen | Temp | Zeit | Schritt | Schritt |
| 1 | 95°C | 3 min | Initiale Denaturierung | Initiale Denaturierung |
| 40 | 95°C | 15 sec | Denaturierung | Denaturierung |
| | 60°C | 1 min | Annealing/Extension – Datenaufnahme im FAM-, HEX-, ROX- und Cy5-Kanal | Annealing/Extension – Datenaufnahme im Green-, Yellow-, Orange- und Red-Kanal |

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Der Genotyp einer Probe wird aufgrund des Signalverhältnisses zwischen den Aufnahmekanälen berechnet. Dabei wird das im **HEX-** oder **Cy5-Kanal (normal)** detektierte Signal mit dem im **FAM-** oder **ROX-Kanal (mutiert)** detektierten Signal verglichen. Die meisten real-time PCR Auswertprogramme stellen die Daten zweier Kanäle automatisch als Streudiagramm (Scatterplot) dar. Datenpunkte entlang der X- bzw. Y-Achsen entsprechen normalen bzw. homozygot mutierten Genotypen, während Datenpunkte in der Mitte des Scatterplots heterozygoten Genotypen entsprechen. Die NTC erscheint links unten.

| Kontrollen / Proben | Amplifikation pro Kanal | | | | Genotyp PI* Allele |
|---------------------|-------------------------|---------------|---------------|------------|--|
| | FAM Green | HEX Yellow | ROX Orange | Cy5 Red | |
| mpx WT-Control | NEIN | JA | NEIN | JA | PI*MM (normal) |
| mpx HET-Control | JA | JA | JA | JA | PI*SZ (heterozygot) |
| mpx MUT-Control | JA | NEIN | JA | NEIN | ---- (Positiv-Kontrolle für *S und *Z) |
| NTC | NEIN | NEIN | NEIN | NEIN | ---- |
| Probe 1 | JA | JA | NEIN | JA | PI*MS (heterozygot) |
| Probe 2 | JA | NEIN | NEIN | JA | PI*SS (homozygot) |
| Probe 3 | NEIN | JA | JA | JA | PI*MZ (heterozygot) |
| Probe 4 | NEIN | JA | JA | NEIN | PI*ZZ (homozygot) |

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

Empfehlungen zur Einstellung des Schwellenwertes (C_q):

Setzen Sie den Schwellenwert für den FAM- und ROX-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der WT-Control (HEX-/Cy5-positiv). Setzen Sie umgekehrt den Schwellenwert für den HEX- und Cy5-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der MUT-Control (FAM-/ROX- positiv). Proben, die den Schwellenwert nach C_q 37 übersteigen, gelten als ungültiges Resultat und müssen wiederholt werden.

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

9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

AAT mpx RealFast™ Assay

REF 7-265 / 7-268 Σ 100 / 32 réactions
-30°C / -15°C CE IVD



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

1. Utilisation

Le AAT mpx RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter les variantes PI*S et PI*Z du gène *SERPINA 1*. Ces dernières présentent les allèles les plus fréquemment associés au déficit en alpha-1-antitrypsine. Le kit sert comme outil de diagnostic à identifier les patients porteurs d'un allèle PI*S et PI*Z. Ce test qualitatif permet de distinguer les génotypes PI possibles dans un extrait d'ADN: normal *MM, hétérozygote *MS, *MZ ou *SZ ou homozygote *SS ou *ZZ.

Séquence de référence: NG_008290.1; HGVS: PI*S: g.14768A>T, dbSNP: rs17580; PI*Z: g.17083G>A, dbSNP: rs28929474

2. Introduction

La carence en alpha-1-antitrypsine est l'une des maladies héréditaires les plus fréquentes chez les personnes d'ascendance nord-européenne. L'inhibiteur de protéase alpha-1-antitrypsine (AAT) est principalement synthétisé dans le foie et inactive les protéases telles que l'élastase neutrophilique dans les poumons des individus en bonne santé. Les variantes déficientes conduisent à de faibles taux d'AAT dans le sérum et à une fonction enzymatique restreinte dans certains allèles, comme l'allèle Z. La protéolyse sans entrave dans les poumons cause des dommages au niveau des tissus alvéolaires et le développement d'une pneumopathie chronique obstructive (emphysème pulmonaire, augmentation de la résistance des voies respiratoires, bronchite obstructive chronique). L'accumulation d'un AAT anormal dans le foie entraîne des maladies hépatiques, en particulier la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Les porteurs de l'allèle PI*ZZ présentent un risque élevé d'emphysème pulmonaire et de maladie du foie, tandis que les porteurs de l'allèle PI*ZZ présentent un risque légèrement plus faible de devenir symptomatiques. La situation est moins claire pour les porteurs de l'allèle PI*MZ, mais une destruction accélérée des poumons a été signalée, surtout chez les fumeurs. Les porteurs des allèles PI*MM, *MS ou *SS ont des taux plasmatiques d'AAT normaux ou légèrement réduits.

3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

| | | | |
|----------------------------|--------|--------------------|---------------|
| RealFast™ 2x mpx Probe Mix | 1 Vial | □ couvercle blanc | 1000 / 320 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 1 Vial | ■ couvercle violet | 550 / 550 µl |
| AAT mpx WT-Control | 1 Vial | ■ couvercle vert | 75 / 75 µl |
| AAT mpx MUT-Control | 1 Vial | ■ couvercle rouge | 75 / 75 µl |

Le RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. AAT mpx Assay Mix se compose de primers gène-spécifiques *SERPINA 1* tout comme de deux sondes d'hydrolyse spécifique d'allèle. De plus vous disposez dans le kit de témoins pour le génotype normal (WT-Control) et le génotype homozygote muté (MUT-Control).

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

4. Stockage et stabilité

Le AAT mpx RealFast™-Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception de -30 à -15°C. Ou bien si vous l'utilisez à court terme en l'espace d'un mois, conservez-le de 2 à 8°C. Les réactifs perdurent sans perdre leur activité jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation. Evitez les expositions prolongées à la lumière directe. Stocké de manière correcte, le kit conserve toute sa fonctionnalité jusqu'à la date de péremption indiquée.

5. Description du produit

5.1. Principe du test

Le test repose sur un test fluorogène à la nucléase 5', connu aussi sous le nom de TaqMan®-Assay. Chaque réaction contient une paire de primers génospécifiques qui amplifie un fragment 145 bp et un fragment 153 bp du gène *SERPINA 1*, tout comme deux sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques, munies d'un marqueur double, qui s'hybride à la séquence cible des fragments amplifiés.

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 normaux, les **sondes de type sauvage** affichent un fort signal fluorescent dans le canal HEX ou Cy5 et aucun ou un signal moins fort sur la ligne de base dans le canal FAM ou ROX. Inversement, dans des échantillons mutés homozygotes, les **sondes mutantes** affichent un signal fluorescent fort dans le canal FAM ou ROX et aucun ou un signal plus faible sur la ligne de base dans le canal HEX ou Cy5. Pour les échantillons hétérozygotes, 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 AAT mpx RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast. Le kit est compatible avec différents appareils standards du commerce de la PCR en temps réel capables de détecter la fluorescence FAM, HEX, Cy5 et ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycloer (bms)
- ✓ 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 «

Le kit **ne convient pas** à une utilisation sur des appareils de la PCR en temps réel, qui nécessitent ROX pour normaliser les données (par ex. appareils Applied Biosystems: StepOne, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 64 allèles positifs PI*S et/ou PI*Z, qui ont été testés à partir d'un test de référence certifié CE. Le AAT mpx RealFast™ Assay a typé positifs tous les allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La **spécificité** a été déterminée à partir de 62 allèles négatifs PI*S et/ou PI*Z, qui ont été testés à partir d'un test de référence certifié CE. Le AAT mpx RealFast™ Assay a typé négatifs tous les 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), HEX (556 nm), ROX (605 nm) et Cy5 (670 nm), des 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 AAT mpx **WT-Control** et le AAT mpx **MUT-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 (HET-Control) mélangez une aliquote du WT-Control et du MUT-Control dans un rapport 1:1.

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

7.3. Préparation du AAT mpx 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 mpx Probe Mix | 10 µl | 250 µl |
| AAT mpx 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 20µl. 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:

| Programme | | | AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, et autres appareils reposant sur le bloc thermique Peltier | MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor) |
|-----------|------|--------|--|---|
| Cycles | Temp | Durée | Étape | Étape |
| 1 | 95°C | 3 min | Dénaturation initiale | Dénaturation initiale |
| 40 | 95°C | 15 sec | Dénaturation | Dénaturation |
| | 60°C | 1 min | Annealing/Extension – Réception des données dans le canal FAM, HEX, ROX et Cy5 | Annealing/Extension – Réception des données dans le canal respectif: Green, Yellow, Orange et Red |

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 ou Cy5 (normal)** est pour ce faire comparé au signal détecté dans le **canal FAM ou ROX (muté)**. 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 normal, à savoir homozygote muté, tandis que les points de données situés au milieu du nuage de points correspondent au génotype hétérozygote. La NTC apparaît en bas à gauche.

| Contrôles / Échantillons | Amplification par canal | | | | Génotype Allèle PI* |
|--------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|---------------------------------------|
| | FAM Green | HEX Yellow | ROX Orange | Cy5 Red | |
| mpx WT-Control | NON | OUI | NON | OUI | PI*MM normal |
| mpx HET-Control | OUI | OUI | OUI | OUI | PI*SZ hétérozygote |
| mpx MUT-Control | OUI | NON | OUI | NON | ---- (contrôle positif pour *S et *Z) |
| NTC | NON | NON | NON | NON | ---- |
| Échantillon 1 | OUI | OUI | NON | OUI | PI*MS (hétérozygote) |
| Échantillon 2 | OUI | NEIN | NON | OUI | PI*MS (homozygote) |
| Échantillon 3 | NON | OUI | OUI | OUI | PI*MZ (hétérozygote) |
| Échantillon 4 | NON | OUI | OUI | NON | PI*ZZ (homozygote) |

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

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

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM ou ROX juste au-dessus du signal fluorescent de fond généré par le contrôle WT (HEX/Cy5 positif). Fixez à l'inverse la valeur seuil pour le canal HEX et Cy5 juste au-dessus du signal fluorescent de fond du contrôle MUT (FAM/ROX 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.

AAT mpx RealFast™ Assay

REF 7-265 / 7-268 100 / 32 reazioni

-30°C -15°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

L'AAT mpx RealFast™ Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione simultanea delle varianti *S e *Z dell'inibitore delle proteasi (PI) del gene *SERPINA1*. Sono questi gli alleli più frequenti associati al deficit di alfa-1-antitripsina (AAT). Il kit è destinato a essere utilizzato come strumento diagnostico volto a identificare i pazienti con deficit di alfa-1-antitripsina portatori di un allele PI*S o PI*Z. In un estratto di DNA umano, il test qualitativo discrimina i possibili genotipi PI: *MM normale, *MS, *MZ o *SZ eterozigote, *SS o *ZZ omozigote.

Sequenza di riferimento: NG_008290.1; HGVS: PI*S: g.14768A>T, dbSNP: rs17580; PI*Z: g.17083G>A, dbSNP: rs28929474.

2. Introduzione

Il deficit di alfa-1-antitripsina rappresenta una delle più comuni patologie ereditarie in soggetti di discendenza nord europea. L'inibitore delle proteasi alfa-1-antitripsina (AAT) è principalmente sintetizzato nel fegato. Esso attiva proteasi come l'elastasi neutrofila nei polmoni di individui sani. Le varianti deficitarie sono caratterizzate da bassi livelli di AAT serica e per alcuni alleli, incluso l'allele Z, anche da una ridotta funzione enzimatica. La proteolisi incontrollata nei polmoni danneggia il tessuto alveolare e lo sviluppo di pneumopatie croniche ostruttive (ovvero enfisema, ostruzione persistente delle vie aeree e/o bronchite cronica). L'accumulo anomalo di AAT nel fegato provoca epatopatie, specialmente cirrosi e carcinoma epatocellulare. I portatori del genotipo PI*ZZ hanno un elevato rischio di sviluppare enfisema ed epatopatie, mentre il genotipo PI*SZ è associato a un rischio minore di diventare sintomatico. Per i soggetti PI*MZ la situazione è meno chiara, sebbene sia stata riferita una più rapida distruzione del tessuto polmonare nei fumatori. I portatori di PI*MM, *MS o *SS hanno livelli plasmatici di AAT normali o soltanto lievemente ridotti.

3. Contenuto del kit

100 / 32 Rxn

| | | |
|---------------------------|------------------------|---------------|
| RealFast™2x mpx Probe Mix | 1 fiala □ tappo bianco | 1000 / 320 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 1 fiala ■ tappo viola | 550 / 550 µl |
| AAT mpx WT-Control | 1 fiala ■ tappo verde | 75 / 75 µl |
| AAT mpx MUT-Control | 1 fiala ■ tappo rosso | 75 / 75 µl |

Il RealFast™ 2x mpx Probe Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTPs in un sistema tampone ottimizzato. L'AAT mpx Assay Mix consiste di primer specifici per il gene *SERPINA1* nonché quattro sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta. Insieme al kit sono forniti controlli che rappresentano i genotipi di tipo selvatico (WT-Control) e di tipo omozigote mutante (MUT-Control).

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

4. Conservazione e stabilità

AAT mpx RealFast™ Assay viene inviato su blocchi refrigeranti. Al suo arrivo, conservare il kit da -30 a -15°C. In alternativa, il kit può essere conservato a una temperatura tra i 2 e gli 8°C per un uso a breve termine entro un mese. Il kit sopporta fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza perdita di attività. Evitare un'esposizione prolungata a luce intensa. Se conservato in modo adeguato, il kit manterrà piena attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

5. Descrizione del prodotto

5.1. Principio del Test

Il test è basato sul saggio fluorogenico della 5' nucleasi, anche denominato TaqMan®-Assay. Ciascuna reazione contiene due coppie di primer gene-specifici che amplificano un frammento di 145 bp e di 153 bp del gene *SERPINA1*, e quattro sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta che ibridano con le sequenze target dei frammenti amplificati. 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.

| Sonda di idrolisi | Fluoroforo | Canale |
|------------------------|------------|--------|
| PI*S mutante | FAM | 520 nm |
| PI*M di tipo selvatico | HEX | 556 nm |
| PI*Z mutante | ROX | 605 nm |
| PI*M di tipo selvatico | Cy5 | 670 nm |

Nei campioni normali le **sonde di tipo selvatico** generano un forte segnale di fluorescenza nel canale HEX o Cy5 e nessun segnale o soltanto un segnale di base nel canale FAM o ROX. Viceversa, nei campioni mutanti omozigoti le **sonde mutanti** ibridate generano una forte segnale di fluorescenza nel canale FAM o ROX e nessun segnale o soltanto un segnale di base nel canale HEX o Cy5. Nei campioni eterozigoti le sonde sia di tipo selvatico che mutante si legano agli ampliconi, generando segnali intermedi nei rispettivi canali.

5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

The AAT mpx 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, HEX, Cy5 e ROX:

- ✓ AB 7500Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ 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. «

Il kit **non è idoneo** all'uso con strumenti Real-time PCR che richiedano il ROX per la normalizzazione dei dati (per es. strumenti Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 64 alleli risultati positivi per l'allele PI*S e / o PI*Z con kit di riferimento marchiato CE. L'AAT mpx RealFast™ Assay ha determinato la positività di tutti i 64 alleli, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 62 alleli risultati negativi per l'allele PI*S o PI*Z con kit di riferimento marchiato CE. L'AAT mpx RealFast™ Assay ha determinato la negatività di tutti i 62 alleli, con una percentuale di veri negativi pari al 100%.

Limite di rilevazione: 0.2 ng di DNA genomico (per reazione). Concentrazione di DNA raccomandata: da 2 a 20 ng/µl di DNA genomico.

6. Materiali richiesti ma non forniti

Strumento Real-time PCR con filtri FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) e Cy5 (670 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 µl), ponte 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'AAT mpx **WT-Control** e l'AAT mpx **MUT-Control** come segnali di riferimento positivi per i campioni non noti. Alcuni software Real-time PCR, per es. AB 7500Fast, richiedono segnali per tutti e tre i possibili genotipi per una corretta discriminazione allelica. Allo scopo di ottenere un controllo eterozigote (HET-Control), miscelare un'aliquota di WT-Control e di MUT-Control in un rapporto di 1:1.

» **Nota:** I WT- e MUT-Controls costituiscono potenziali fonti di contaminazione. Assicuratevi di maneggiarli con cautela. «

7.3. Preparazione di AAT mpx RealFast™ Master Mix:

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:

| Componente | per reazione | per es. 24+1 reazioni |
|----------------------------|--------------|-----------------------|
| RealFast™ 2x mpx Probe Mix | 10 µl | 250 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 5 µl | 125 µl |
| Master Mix | 15 µl | 375 µl |

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

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

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

7.4. Programma della PCR

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

| Programma | | | AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, e altri strumenti Peltier basati su blocco di riscaldamento | MIC, Rotor-Gene® 6000 (rotore a 36 e 72 pozzetti) |
|-----------|------|--------|---|---|
| Cicli | Temp | Tempo | Step | Step |
| 1 | 95°C | 3 min | Denaturazione iniziale | Denaturazione iniziale |
| 40 | 95°C | 15 sec | Denaturazione | Denaturazione |
| | 60°C | 1 min | Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nei canali FAM, HEX, ROX e Cy5 | Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nei canali Green, Yellow, Orange e Red |

8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

Il genotipo di ciascun campione si determina calcolando il rapporto tra i segnali registrati nel **canale HEX o Cy5 (normale)** e i segnali registrati nel **canale FAM o ROX (mutante)**. 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 normali e omozigoti mutanti. I punti dati raggruppati in 'cluster' al centro del grafico rappresentano i genotipi eterozigoti. L'NTC compare nell'angolo sinistro in basso.

| Controlli / Campioni | Amplificazione nel canale | | | | Genotipo Alleli PI* |
|----------------------|---------------------------|------------|------------|---------|--|
| | FAM Green | HEX Yellow | ROX Orange | Cy5 Red | |
| mpx WT-Control | NO | SI | NO | SI | PI*MM (normale) |
| mpx HET-Control | SI | SI | SI | SI | PI*SZ (eterozigote) |
| mpx MUT-Control | SI | NO | SI | NO | ---- (controllo positivo per PI*Sand PI*Z) |
| NTC | NO | NO | NO | NO | ---- |
| Campione 1 | SI | SI | NO | SI | PI*MS (eterozigote) |
| Campione 2 | SI | NO | NO | SI | PI*SS (omozigote) |
| Campione 3 | NO | SI | SI | SI | PI*MZ (eterozigote) |
| Campione 4 | NO | SI | SI | NO | PI*ZZ (omozigote) |

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

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

Impostare la soglia per i canali FAM e ROX immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal WT-Control (HEX-/Cy5-positivo). Viceversa, impostare la soglia per il canale HEX e Cy5 immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo del MUT-Control (FAM-/ROX-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.

AAT mpx RealFast™ Assay

REF 7-265 / 7-268 Σ 100 / 32 reacciones
-30°C -15°C CE IVD



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

1. Aplicación

AAT mpx RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección simultánea de las variantes del inhibidor de proteasa (PI) *S y *Z del gen *SERPINA1*. Estos son los alelos más frecuentes asociados con la deficiencia de alfa-1 antitripsina. El kit es adecuado como herramienta de diagnóstico para identificar a los pacientes portadores de un alelo PI*S o PI*Z. La prueba cualitativa diferencia en el ADN humano los posibles genotipos PI: normal *MM, heterocigoto *MS, *MZ o *SZ, homocigoto *SS o *ZZ.

Secuencia de referencia: NG_008290.1; HGVS: PI*S: g.14768A>T, dbSNP: rs17580; PI*Z: g.17083G>A, dbSNP: rs28929474.

2. Introducción

La deficiencia de alfa-1 antitripsina es una de las enfermedades hereditarias más comunes en personas de descendencia del norte de Europa. El inhibidor de la proteasa alfa-1 antitripsina (AAT) se sintetiza principalmente en el hígado e inactiva las proteasas como la elastasa de neutrófilos en los pulmones de individuos sanos. Las variantes defectuosas conducen a niveles séricos bajos de AAT, y algunos alelos como el alelo Z, se le añade una función enzimática disminuida. La proteólisis sin impedimentos en los pulmones causa daño al tejido alveolar y el desarrollo de enfermedad crónica pulmonar obstructiva (enfisema pulmonar, obstrucción persistente de las vías respiratorias, bronquitis obstructiva crónica). La acumulación de AAT anormal en el hígado conduce a una enfermedad hepática, especialmente cirrosis y carcinoma hepatocelular. Los portadores del alelo PI*ZZ tienen un alto riesgo de desarrollar un enfisema pulmonar y una enfermedad hepática, mientras que los portadores de PI*SZ tienen un riesgo ligeramente menor de sufrir esta sintomatología. La situación es menos clara para los portadores del alelo PI*MZ, sin embargo se ha detectado una destrucción acelerada del pulmón especialmente si son fumadores. Los portadores de los alelos PI*MM, *MS o *SS tienen niveles plasmáticos de AAT normales o solo ligeramente reducidos.

3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

| | | |
|-----------------------------------|---|---------------|
| RealFast™ 2x mpx Probe Mix | 1 vial <input type="checkbox"/> tapón blanco | 1000 / 320 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 1 vial <input type="checkbox"/> tapón violeta | 550 / 550 µl |
| AAT mpx WT-Control | 1 vial <input type="checkbox"/> tapón verde | 75 / 75 µl |
| AAT mpx MUT-Control | 1 vial <input type="checkbox"/> tapón rojo | 75 / 75 µl |

El RealFast™ 2x mpx Probe Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer. El AAT mpx Assay Mix consta de primers específicos del gen *SERPINA1* y cuatro sondas de hidrólisis doblemente marcadas específicas de alelo. Además hay plantillas de control para el genotipo normal (WT-Control) y homocigoto mutado (MUT-Control) en el kit.

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

4. Almacenamiento y estabilidad

AAT mpx RealFast™ Assay se suministra sobre bloques de refrigeración. Conserve el kit de -30 a -15°C después de su recepción. Alternativamente para su utilización en el espacio de un mes a 2 hasta 8°C. Los reactivos sobreviven sin pérdida de actividad hasta 20 ciclos de congelación/ descongelación. Evite la exposición prolongada a la luz directa. Cuando se conserva correctamente, el kit mantiene su funcionalidad hasta la fecha de caducidad indicada.

5. Descripción del producto

5.1. Principio de la prueba

La prueba se basa en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocida como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene un par de primers (cebadores) específicos de gen para la amplificación de un fragmento 145 bp y de 153 bp en el gen *SERPINA1*, así como cuatro sondas de hidrólisis específicas de alelo doblemente marcadas, que están unidas a la secuencia de destino de los fragmentos amplificados. 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.

| Sonda de hidrólisis | Fluoróforo | Canal |
|---------------------|------------|--------|
| PI*S mutante | FAM | 520 nm |
| PI*M tipo silvestre | HEX | 556 nm |
| PI*Z mutante | ROX | 605 nm |
| PI*M tipo silvestre | Cy5 | 670 nm |

En muestras normales, las **sondas de tipo silvestre** (normal) generan una fuerte señal de fluorescencia en el canal HEX o Cy5 y ninguna o bien la señal situada en la línea de base en el canal FAM o ROX. En el caso de muestras mutantes homocigotas, las **sondas mutantes** producen una señal fuerte en el canal FAM o ROX, y ninguna o la señal situada en la línea de base en el canal HEX o Cy5. En muestras heterocigotas, las sondas de tipo silvestre y mutante se unen a los amplicones y provocan una señal intermedia en los canales de detección correspondientes.

5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

Está autorizado el uso de AAT mpx RealFast™ Assay con el aparato AB 7500 Fast.

El kit es compatible con diferentes aparatos convencionales de PCR en tiempo real, que puedan detectar fluorescencia FAM, HEX, Cy5 y ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ 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. «

El kit **no se puede utilizar** con aparatos de PCR en tiempo real, que requieran ROX para la normalización de los datos (por ejemplo: dispositivos de Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT)

5.3. Especificaciones de la prueba

La **sensibilidad** se determina en base a los 64 alelos con un test de referencia de marcado CE, dando un resultado positivo para el alelo PI*S y / o PI*Z. El ensayo AAT mpx RealFast™ Assay determina que los 64 alelos son positivos, lo que equivale a una tasa de verdaderos positivos del 100%.

La **especificidad** se determina en base a los 62 alelos con un test de referencia de marcado CE, dando un resultado negativo para el alelo PI*S y / o PI*Z. El ensayo AAT mpx RealFast™ Assay determina que los 62 alelos son negativos, lo que equivale a una tasa de verdaderos negativos del 100%.

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

6. Materiales necesarios, pero no proporcionados

El aparato PCR en tiempo real con filtros FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) y Cy5 (670nm), recipientes PCR ópticos compatibles con los aparatos, guantes desechables sin polvo, agitador tipo 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

No se incluyen en el kit reactivos de extracción de ADN.

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 AAT mpx **WT-Control** y el FV-PTH mpx **MUT-Control** como señales de referencia para las muestras desconocidas. Algunos programas del PCR en tiempo real, tales como AB 7500 Fast, requieren para la correcta evaluación en el "Allelic Discrimination Plot" señales para los tres posibles genotipos. Para producir un control heterocigoto (HET-Control) mezcle una alícuota de WT- Control y de MUT-Control en la proporción 1: 1.

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

7.3. Preparación de AAT mpx RealFast™ Master Mix

Descongelar por completo todas las soluciones, mezclar con cuidado y centrifugar brevemente. La preparación de PCR debe llevarse a cabo a temperatura ambiente. Preparar suficiente **Master Mix** (mezcla maestra) para el número total del depósitos de PCR planificado (pruebas N + controles positivos + controles negativos) y calcular al menos una reacción adicional para nivelar inexactitudes del pipeteado:

| Componentes | por reacción | p.ej. 24+1 reacciones |
|----------------------------|--------------|-----------------------|
| RealFast™ 2x mpx Probe Mix | 10 µl | 250 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 5 µl | 125 µl |
| Master Mix | 15 µl | 375 µl |

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

Para minimizar el riesgo de contaminación utilice 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 la fluorescencia. Si es necesario centrifugar brevemente «

7.4. Programa PCR

Programe 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:

| Programa | | | AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, y otros aparatos basados en el bloque de calentamiento Peltier | MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor) |
|----------|------|--------|--|--|
| Ciclos | Temp | Tiempo | Paso | Paso |
| 1 | 95°C | 3 min | Desnaturalización inicial | Desnaturalización inicial |
| 40 | 95°C | 15 seg | Desnaturalización | Desnaturalización |
| | 60°C | 1 min | Annealing/extensión – registro de datos en el canal FAM, HEX, ROX y Cy5. | Annealing/extensión – registro de datos en el canal Green, Yellow, Orange y Red |

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** o **Cy5 (normal)** se compara con la señal detectada en el **canal FAM** o **ROX (mutado)**. La mayoría de los programas de análisis de PCR en tiempo real proporcionan los datos de ambos canales de forma automática como un gráfico de dispersión (scatterplot). Los puntos de datos a lo largo de los ejes X e Y corresponden a genotipos homocigotos mutantes o normales, mientras que los puntos de los datos en el centro de los gráficos de dispersión corresponden a genotipos heterocigotos. El NTC aparece en la parte inferior izquierda.

| Controles / muestras | Amplificación por canal | | | | Genotipo PI* alelo |
|----------------------|-------------------------|------------|------------|---------|--------------------------------------|
| | FAM Green | HEX Yellow | ROX Orange | Cy5 Red | |
| mpx WT-Control | NO | SI | NO | SI | PI*MM (normal) |
| mpx HET-Control | SI | SI | SI | SI | PI*SZ (heterocigoto) |
| mpx MUT-Control | SI | NO | SI | NO | ---- (Control positivo para *S y *Z) |
| NTC | NO | NO | NO | NO | ---- |
| Muestra 1 | SI | SI | NO | SI | PI*MS (heterocigoto) |
| Muestra 2 | SI | NO | NO | SI | PI*SS (homocigoto) |
| Muestra 3 | NO | SI | SI | SI | PI*MZ (heterocigoto) |
| Muestra 4 | NO | SI | SI | NO | PI*ZZ (homocigoto) |

En algunos programas de evaluación tiene que configurarse manualmente el valor límite (Threshold) para el genotipado correcto.

Recomendaciones para establecer el valor límite (C_q):

Fije el valor límite para el canal FAM y ROX ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del WT- Control (HEX/Cy5 positivo). Fije a la inversa el valor límite para el canal HEX y Cy5 ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del MUT-Control (FAM/ROX 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 mantenerse 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, compatibles con el aparato PCR con cierre adecuado para medir visualmente.
- No mezclar reactivos con números de lotes diferentes.
- No utilizar kits o componentes del kit caducados.

AAT mpx RealFast™ Assay

REF 7-265 / 7-268 Σ 100 / 32 reações
-30°C / -15°C CE IVD



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

1. Utilização prevista

O AAT RealFast™ Assay é um teste de PCR em tempo real, exato e rápido, utilizado na deteção simultânea das variantes *S and *Z do gene *SERPINA1* do inibidor da protease (PI). Estes são os alelos mais frequentemente associados à deficiência em alfa-1 antitripsina (AAT). O kit destina-se a ser utilizado como ferramenta de diagnóstico para identificar os doentes com deficiência em alfa-1 antitripsina portadores do alelo PI*S ou PI*Z. Num extrato de ADN humano, o ensaio qualitativo distingue os possíveis genótipos do PI: normal *MM, heterozigótico *MS, *MZ ou *SZ, homozigótico *SS ou *ZZ.

Sequência de referência: NG_008290.1; HGVS: PI*S: g.14768A>T, dbSNP: rs17580; PI*Z: g.17083G>A, dbSNP: rs28929474.

2. Introdução

A deficiência em alfa-1 antitripsina é uma das doenças hereditárias mais frequentes entre pessoas com ascendência norte-europeia. O inibidor da protease alfa-1 antitripsina (AAT) é sintetizado sobretudo no fígado, inativando proteases tais como a elastase dos neutrófilos nos pulmões de pessoas saudáveis. As variantes deficientes caracterizam-se por concentrações séricas baixas de AAT e, no caso de alguns alelos, entre os quais o alelo Z, também pela diminuição da função enzimática. A proteólise descontrolada que decorre nos pulmões danifica o tecido alveolar e provoca doença pulmonar obstrutiva crónica (ou seja, enfisema, obstrução persistente das vias respiratórias e/ou bronquite crónica). A acumulação do AAT anormal no fígado leva a doença hepática, especialmente cirrose e carcinoma hepatocelular. Os portadores do genótipo PI*ZZ correm um risco elevado de desenvolver enfisema e doença hepática, enquanto que o genótipo PI*SZ está associado a um risco um pouco mais baixo de se tornar sintomático. No caso dos portadores de PI*MZ, a situação é menos clara, mas há registo de destruição pulmonar acelerada, sobretudo em fumadores. Os portadores de PI*MM, *MS ou *SS apresentam níveis plasmáticos normais ou apenas ligeiramente menores de AAT.

3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

| | | | |
|----------------------------|----------|------------------|---------------|
| RealFast™ 2x mpx Probe Mix | 1 ampola | □ tampa branca | 1000 / 320 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 1 ampola | ■ tampa roxa | 550 / 550 µl |
| AAT mpx WT-Control | 1 ampola | ■ tampa verde | 75 / 75 µl |
| AAT mpx MUT-Control | 1 ampola | ■ tampa vermelha | 75 / 75 µl |

As RealFast™ 2x mpx Probe Mix incluem HotStart Taq DNA polymerase e dNTPs num sistema tampão otimizado. O AAT mpx Assay Mix consiste em iniciadores específicos do gene *SERPINA1* e quatro sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo. Os controlos representantes do genótipo natural (WT-Control) e do mutante homozigótico (MUT-Control) 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 AAT mpx RealFast™ Assay é enviado em blocos de arrefecimento. Após a receção, armazene o kit de -30 a -15°C. Em alternativa, armazene entre 2 e 8°C para utilização a curto prazo, dentro de um mês. O kit suporta até 20 ciclos de congelamento/descongelamento sem ocorrer perda de atividade. Evitar a exposição prolongada a luz intensa. Se for armazenado corretamente, o kit permanece totalmente ativo até à data de validade indicada no rótulo.

5. Descrição do produto

5.1. Princípio do teste

O teste utiliza o ensaio fluorogénico 5' nuclease, também conhecido como ensaio TaqMan®. Cada reação contém dois pares de iniciadores específicos do gene, que amplificam um fragmento de 145 bp e de 153 bp do gene *SERPINA1*, assim como quatro 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.

| Sonda de hidrólise | Fluoróforo | Canal |
|--------------------|------------|--------|
| PI*S mutante | FAM | 520 nm |
| PI*M tipo natural | HEX | 556 nm |
| PI*Z mutante | ROX | 605 nm |
| PI*M tipo natural | Cy5 | 670 nm |

Em amostras normais, as **sondas de tipo natural** geram um sinal de fluorescência forte no canal HEX ou Cy5, e um sinal basal ou nulo no canal FAM ou ROX. Pelo contrário, em amostras de mutantes homozigóticos, as **sondas mutantes** hibridadas geram um sinal de fluorescência forte no canal FAM ou ROX, e um sinal basal ou nulo no canal HEX ou Cy5. Em amostras heterozigóticas, as sondas do tipo natural e as mutantes ligam-se aos amplificões e produzem sinais intermédios nos respetivos canais.

5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O AAT mpx 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, HEX, Cy5 e ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ 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. «

O kit **não é apropriado** para a utilização com instrumentos de PCR em tempo real que exijam ROX para a normalização dos dados (por exemplo, instrumentos Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi efetuada em 64 alelos com resultado positivo quanto ao alelo PI*S e/ou PI*Z utilizando um kit de referência com marcação CE. O AAT mpx RealFast™ Assay determinou todos os 64 alelos como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 62 alelos com resultado negativo quanto ao alelo PI*S e/ou PI*Z utilizando um kit de referência com marcação CE. O AAT mpx RealFast™ Assay determinou todos os 62 alelos como negativos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros negativos de 100%.

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

6. Materiais necessários, mas não fornecidos

Instrumento de PCR em tempo real com filtros FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) e Cy5 (670 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 AAT mpx **WT-Control** e o AAT mpx **MUT-Control** como sinais de referência positiva para as amostras desconhecidas. Algum software 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 (HET-Control), misture uma alíquota do WT-Control-WT e do MUT-Control numa proporção de 1:1.

» **Nota:** Os **WT-Control** e **MUT-Control** são potenciais fontes de contaminação. Manuseie com cautela. «

7.3. Preparação da AAT mpx 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 mpx Probe Mix | 10 µl | 250 µl |
| AAT mpx Assay Mix | 5 µl | 125 µl |
| Master Mix | 15 µl | 375 µl |

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

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

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

7.4. Programa de PCR

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:

| Programa | | | AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, e outros instrumentos à base do bloco de calor de Peltier: | MIC, Rotor-Gene® 6000 (rotores de 36 poços e 72 poços) |
|----------|-------------|-------|---|--|
| Ciclos | Temperatura | Tempo | Passos | Passos |
| 1 | 95°C | 3 min | Desnaturação inicial | Desnaturação inicial |
| 40 | 95°C | 15 s | Desnaturação | Desnaturação |
| | 60°C | 1 min | Hibridação/Extensão– Aquisição de dados nos canais FAM, HEX, ROX e Cy5 | Hibridação/Extensão– Aquisição de dados nos canais Green, Yellow, Orange e Red |

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** ou **Cy5 (normal)** e os sinais registados no **canal FAM** ou **ROX (mutante)**. 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 normais e mutantes homozigóticos, respetivamente. Os pontos de dados agrupados no centro do gráfico de dispersão representam genótipos heterozigóticos. O NTC aparece no canto inferior esquerdo.

| Controlos / Amostras | Amplificação no canal | | | | Genótipo Alelos PI* |
|----------------------|-----------------------|------------|------------|------------|--|
| | FAM Green | HEX Yellow | ROX Orange | Cy5 Red | |
| mpx WT-Control | NÃO | SIM | NÃO | SIM | PI*MM (normal) |
| mpx HET-Control | SIM | SIM | SIM | SIM | PI*SZ (heterozigótico) |
| mpx MUT-Control | SIM | NÃO | SIM | NÃO | --- (controlo positivo para PI*S e PI*Z) |
| NTC | NÃO | NÃO | NÃO | NÃO | --- |
| Amostra 1 | SIM | SIM | NÃO | SIM | PI*MS (heterozigótico) |
| Amostra 2 | SIM | NÃO | NÃO | SIM | PI*SS (homozigótico) |
| Amostra 3 | NÃO | SIM | SIM | SIM | PI*MZ (heterozigótico) |
| Amostra 4 | NÃO | SIM | SIM | NÃO | PI*ZZ (homozigótico) |

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

Definições de limiar recomendadas (C_q):

Defina o valor do limiar para os canais FAM e ROX imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo WT-Control (HEX/Cy5 positivos). Inversamente, defina o valor do limiar para os canais HEX e Cy5 imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo MUT-Control (FAM/ROX positivos).

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.