

MTHFR 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 7-165 / 7-168 Σ 100 / 32 reactions

-30°C / -15°C



1. Intended Use

The MTHFR mpx RealFast™ Assay is a fast and accurate multiplex real-time PCR test for the simultaneous detection of the 677C>T and 1298A>C mutations in the *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* gene. The mutations are associated with decreased enzyme activity, which leads to hyperhomocysteinemia and to toxic side-effects of methotrexate therapy. The kit is designed to identify patients suspected to have an increased risk for cardiovascular diseases or intolerance to methotrexate. The qualitative assay discriminates the three possible genotypes for each allele in a human DNA extract.

Reference sequence: NG_013351.1 g.14783C>T and g.16685A>C; dbSNP: rs1801133 and rs1801131.

2. Introduction

Elevated levels of homocysteine, an intermediary product of the methionine metabolism, are an established risk factor for atherosclerosis and arterial thrombosis. Hyperhomocysteinemia ultimately leads to endothelial dysfunction with associated platelet activation and thrombus formation. Mild to moderate forms can be caused by homozygosity for a common 677C>T point mutation in the coding region of the *MTHFR* gene. The second common MTHFR mutation 1298A>C also contributes to reduced enzyme activity, especially when occurring simultaneously with 677C>T. Fasting homocysteine levels are significantly higher in individuals heterozygous for both substitutions compared with individuals carrying only the heterozygous 677C>T mutation. Hyperhomocysteinemia may affect methotrexate sensitivity and contribute to toxicity, as MTHFR is an important enzyme in maintaining cellular folate pools. Thus, homozygosity for 677C>T or compound heterozygosity for 677C>T/1298A>C conveys a significantly higher risk for negative side-effects of methotrexate medication.

3. Kit Contents

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 vial white cap	1000 / 320 µl	The RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The MTHFR mpx Assay Mix consists of <i>MTHFR</i> 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.
MTHFR mpx Assay Mix	1 vial purple cap	550 / 550 µl	
MTHFR mpx WT-Control	1 vial green cap	75 / 75 µl	
MTHFR mpx MUT-Control	1 vial red cap	75 / 75 µl	

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

4. Storage and Stability

The MTHFR 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 144 bp and 185 bp fragment of the *MTHFR* gene, as well as four dual-labeled, allele-specific hydrolysis probes which specifically 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.

MTHFR probe	Fluorophore	Channel
677C>T mutant	FAM	520 nm
677C>T wild type	HEX	556 nm
1298A>C mutant	ROX	605 nm
1298A>C 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 MTHFR 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)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycloer (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) or for instruments without appropriate fluorescence detection channels.

5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 69 positive 677C>T alleles and 69 positive 1298A>C alleles, both tested with a CE-marked reference kit. The MTHFR mpx RealFast™ Assay correctly determined all positive MTHFR alleles, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 113 negative 677C>T alleles and 113 negative 1298A>C alleles, both tested with a CE-marked reference kit. The MTHFR mpx RealFast™ Assay correctly determined all negative MTHFR alleles, 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 MTHFR mpx **WT-Control** and MTHFR 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 MTHFR 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	10 µl	250 µl
MTHFR 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 –	Annealing/Extension –
			Data acquisition on FAM, HEX, ROX and Cy5 channels	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 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 677C>T / 1298A>C
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NO	YES	NO	YES	normal 677C>T / normal 1298A>C
mpx HET-Control	YES	YES	YES	YES	heterozygous 677C>T / heterozygous 1298A>C
mpx MUT-Control	YES	NO	YES	NO	homozygous mutant 677C>T / homozygous mutant 1298A>C
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Sample 1	YES	YES	NO	YES	heterozygous 677C>T / normal 1298A>C
Sample 2	YES	NO	NO	YES	homozygous mutant 677C>T / normal 1298A>C
Sample 3	NO	YES	YES	YES	normal 677C>T / heterozygous 1298A>C
Sample 4	NO	YES	YES	NO	normal 677C>T / homozygous mutant 1298A>C

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.

MTHFR 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 7-165 / 7-168 Σ 100 / 32 Reaktionen

-30°C / -15°C



1. Verwendungszweck

Der MTHFR mpx RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur gleichzeitigen Detektion der 677C>T und 1298A>C Mutationen im *Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR)* Gen. Die Mutationen sind mit einer verringerten Enzymaktivität verbunden, welche zu Hyperhomocysteinämie und zu toxischen Nebeneffekten einer Methotrexat-Therapie führen können. Der Kit dient der Identifizierung von Patienten mit einer Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen, als auch der Feststellung einer Intoleranz gegenüber Methotrexat. Der qualitative Test weist in einem humanen DNA-Extrakt für jede Mutation einen der drei möglichen Genotypen nach: normal, heterozygot oder homozygot mutiert. Referenzsequenz: NG_013351.1; 677C>T: g.14783C>T, dbSNP: rs1801133 / 1298A>C: g.16685A>C, dbSNP: rs1801131.

2. Einleitung

Erhöhte Werte für Homocystein, ein intermediäres Produkt des Methionin Metabolismus, sind ein Risikofaktor für Atherosklerose und arterielle Thrombose. Hyperhomocysteinämie führt zu endothelialer Dysfunktion und ist mit der Aktivierung von Thrombozyten und Thrombusbildung assoziiert. Milde bis moderate Formen können durch die homozygote 677C>T Punktmutation in der kodierenden Region des *MTHFR* Gens verursacht werden. Die MTHFR Mutation 1298A>C ist ebenfalls mit verringerter Enzymaktivität verbunden, vor allem wenn sie gemeinsam mit 677C>T auftritt. Der Homocysteinspiegel ist bei Individuen mit beiden Mutationen signifikant höher als bei solchen die nur eine heterozygote 677C>T Mutation tragen. Hyperhomocysteinämie kann die Sensitivität gegenüber Methotrexat beeinflussen und zur Toxizität beitragen, da MTHFR ein wichtiges Enzym zur Aufrechterhaltung zellulärer Folatvorkommen ist. Eine homozygote 677C>T oder kombiniert heterozygote 677C>T/1298A>C Mutation stellt ein signifikant höheres Risiko für Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Methotrexat dar.

3. Kit Bestandteile

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx **Probe Mix** 1 Vial weisser Deckel 1000 / 320µl
MTHFR mpx **Assay Mix** 1 Vial violetter Deckel 550 / 550µl
MTHFR mpx **WT-Control** 1 Vial grüner Deckel 75 / 75µl
MTHFR 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 MTHFR mpx Assay Mix besteht aus *MTHFR* 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 MTHFR 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 144 bp und eines 185 bp Fragments im *MTHFR* Gen, sowie vier doppelt-markierte, allelspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz der amplifizierten Fragmente 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
677C>T Mutante	FAM	520 nm
677C>T Wildtyp	HEX	556 nm
1298A>C Mutante	ROX	605 nm
1298A>C 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 MTHFR 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- and 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 69 positiven 677C>T Allelen und 69 positiven 1298A>C Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der MTHFR mpx RealFast™ Assay typisierte alle positiven Allele richtig = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 113 negativen 677C>T Allelen und 113 negativen 1298A>C Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der MTHFR mpx RealFast™ Assay typisierte alle negativen Allele richtig = 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-(610 nm) and Cy5-(660nm) Filter, gerätekompatible 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 MTHFR mpX **WT-Control** und MTHFR 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 MTHFR 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
MTHFR 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 677C>T / 1298A>C
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpX WT-Control	NEIN	JA	NEIN	JA	normal 677C>T / normal 1298A>C
mpX HET-Control	JA	JA	JA	JA	heterozygot 677C>T / heterozygot 1298A>C
mpX MUT-Control	JA	NEIN	JA	NEIN	homozygot mutiert 677C>T / homozygot mutiert 1298A>C
NTC	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN	----
Probe 1	JA	JA	NEIN	JA	heterozygot 677C>T / normal 1298A>C
Probe 2	JA	NEIN	NEIN	JA	homozygot mutiert 677C>T / normal 1298A>C
Probe 3	NEIN	JA	JA	JA	normal 677C>T / heterozygot 1298A>C
Probe 4	NEIN	JA	JA	NEIN	normal 677C>T / homozygot mutiert 1298A>C

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, gerätekomppatible PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.

MTHFR 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 7-165 / 7-168 100 / 32 réactions

-30°C -15°C



1. Utilisation

Le MTHFR mpx RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter simultanément les mutations 677C>T et 1298A>C dans le gène *méthylentetrahydrofolate réductase (MTHFR)*. Ces mutations sont associées à une activité enzymatique réduite, ce qui peut mener à l'hyperhomocystéinémie et à des effets secondaires toxiques du traitement au méthotrexate. Ce kit permet de tester et d'identifier les patients qui présentent une prédisposition aux maladies cardiovasculaires et de constater une intolérance au méthotrexate. Ce test qualitatif permet de distinguer un des trois génotypes possibles dans un extrait d'ADN: normal, hétérozygote ou homozygote muté. Séquence de référence: NG_013351.1; 677C>T: g.14783C>T, dbSNP: rs1801133 / 1298A>C: g.16685A>C, dbSNP: rs1801131

2. Introduction

Des taux trop élevés d'homocystéine, un produit intermédiaire du métabolisme de la méthionine, sont un facteur de risque d'athérosclérose et de thrombose artérielle. L'hyperhomocystéinémie entraîne un dysfonctionnement endothélial et est associée à l'activation de thrombocytes et à la formation de thrombus. Le point de mutation homozygote 677C>T dans la région codante du gène *MTHFR* peut en être la cause, pour ses formes légères à modérées. La mutation MTHFR 1298A>C est également associée à une activité enzymatique réduite, surtout lorsqu'elle survient en même temps que la mutation 677C>T. Le taux d'homocystéine est significativement plus élevé chez les individus présentant les deux mutations que chez les individus présentant une seule mutation hétérozygote 677C>T. L'hyperhomocystéinémie peut affecter la sensibilité au méthotrexate et contribuer à la toxicité, car le MTHFR est une enzyme importante pour le maintien des réserves cellulaires de folate. Une mutation homozygote 677C>T ou hétérozygote combinée 677C>T/1298A>C représente un risque significativement plus élevé d'effets secondaires lors de traitement au méthotrexate.

3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle blanc	1000 / 320 µl
MTHFR mpx Assay Mix	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle violet	550 / 550 µl
MTHFR mpx WT-Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle vert	75 / 75 µl
MTHFR mpx MUT-Control	1 Vial	<input type="checkbox"/> couvercle rouge	75 / 75 µl

Le RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. MTHFR mpx Assay Mix se compose de primers génospcifiques *MTHFR* 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 MTHFR 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 génospcifiques qui amplifie un fragment 144 bp et un fragment 185 bp du gène *MTHFR*, tout comme quatre 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 MTHFR 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 Cycler (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 69 allèles positifs 677C>T et de 69 allèles positifs 1298A>C, qui ont été testés à partir d'un test de référence certifié CE. Le MTHFR 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 113 allèles négatifs 677C>T et de 113 allèles négatifs 1298A>C, qui ont été testés à partir d'un test de référence certifié CE. Le MTHFR 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 (670nm), 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 MTHFR mpx **WT-Control** et le MTHFR 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 MTHFR 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
MTHFR 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 apparait en bas à gauche.

Contrôles / Échantillons	Amplification par canal				Génotype 677C>T / 1298A>C
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NON	OUI	NON	OUI	normal 677C>T / normal 1298A>C
mpx HET-Control	OUI	OUI	OUI	OUI	hétérozygote 677C>T / hétérozygote 1298A>C
mpx MUT-Control	OUI	NON	OUI	NON	homozygote muté 677C>T / homozygote muté 1298A>C
NTC	NON	NON	NON	NON	----
Échantillon 1	OUI	OUI	NON	OUI	hétérozygote 677C>T / normal 1298A>C
Échantillon 2	OUI	NEIN	NON	OUI	homozygote muté 677C>T / normal 1298A>C
Échantillon 3	NON	OUI	OUI	OUI	normal 677C>T / hétérozygote 1298A>C
Échantillon 4	NON	OUI	OUI	NON	normal 677C>T / homozygote muté 1298A>C

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.

MTHFR 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 7-165 / 7-168 100 / 32 reazioni

-30°C -15°C



CE IVD



1. Utilizzo

L'MTHFR mpx RealFast™ Assay è un test multiplex in tempo reale, rapido e accurato basato sulla PCR per la rilevazione simultanea delle mutazioni 677C>T e 1298A>C nel gene della *metilen-tetraidrofolato (MTHFR)*. Le mutazioni sono associate a una ridotta attività enzimatica, che comporta iperomocisteinemia e tossicità della terapia a base di metotrexato. Il kit è progettato per individuare i pazienti con maggiore predisposizione a sviluppare patologie cardiovascolari o intolleranza al metotrexato. L'esame qualitativo discrimina i tre possibili genotipi per ciascun allele di un estratto di DNA umano:

Sequenza di riferimento: NG_013351.1 g.14783C>T e g.16685A>C; dbSNP: rs1801133 e rs1801131.

2. Introduzione

Livelli elevati di omocisteina, un prodotto intermedio del metabolismo della metionina, rappresentano un fattore di rischio accertato per l'aterosclerosi e la trombosi arteriosa. L'iperomocisteinemia alla fine porta a disfunzione endoteliale con associata attivazione piastrinica e formazione di trombi. Le forme da lievi e moderate possono essere causate da omozigosi per una mutazione puntiforme comune (677C>T) nella regione di codifica del gene *MTHFR*. Anche la seconda mutazione comune del gene *MTHFR* (1298A>C) contribuisce a una ridotta attività enzimatica, specialmente laddove sia simultanea alla 677C>T. I livelli di omocisteina a digiuno sono notevolmente più elevati nei soggetti eterozigoti per entrambe le sostituzioni rispetto ai soggetti portatori di un'unica mutazione (677C>T) in eterozigosi. L'iperomocisteinemia può alterare la sensibilità al metotrexato e contribuire alla tossicità, in quanto l'*MTHFR* rappresenta un enzima importante per il mantenimento di pool cellulari di folati. Pertanto, la condizione di omozigosi per la 677C>T o di eterozigosi composta per le mutazioni 677C>T / 1298A>C comporta un rischio notevolmente superiore di effetti collaterali avversi nella terapia con metotrexato.

3. Contenuto del Kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 fiala □ tappo bianco	1000 / 320 µl
MTHFR mpx Assay Mix	1 fiala ■ tappo viola	550 / 550 µl
MTHFR mpx WT-Control	1 fiala ■ tappo verde	75 / 75 µl
MTHFR 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'MTHFR mpx Assay Mix consist e di primer specifici per il gene *MTHFR* 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

L'MTHFR 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 144 bp e 185 bp del gene *MTHFR*, 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 MTHFR	Fluoroforo	Canale
677C>T mutante	FAM	520 nm
677C>T di tipo selvatico	HEX	556 nm
1298A>C mutante	ROX	605 nm
1298A>C 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

L'MTHFR mpxRealFast™ Assay è validato per l'utilizzo con lo strumento AB 7500Fast.

Il kit è compatibile con vari strumenti comuni Real-time PCR in grado di registrare la fluorescenza FAM, HEX, Cy5 e ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (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) o con strumenti privi di adeguati canali di rilevazione della fluorescenza.

5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 69 alleli positivi per la mutazione 677C>T e 69 alleli positivi per la mutazione 1298A>C, entrambi testati con un kit di riferimento marchiato CE. Il MTHFR mpx RealFast™ Assay ha determinato correttamente la positività di tutti gli alleli MTHFR, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 113 alleli risultati negativi per la mutazione 677C>T e 113 alleli risultati negativi per la mutazione 1298A>C, entrambi testati con un kit di riferimento marchiato CE. L'MTHFR mpx RealFast™ Assay ha determinato correttamente la negatività di tutti gli alleli MTHFR, 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), punte sterili con filtro barriera antiaerosol, acqua di grado molecolare, sistema per l'estrazione del DNA, congelatore, contenitore per rifiuti biologici.

7. Protocollo sperimentale

7.1. Estrazione del DNA

I reagenti per l'estrazione del DNA **non sono forniti** con il kit.

E' possibile utilizzare DNA isolato da campioni diversi (per es. sangue periferico intero, campioni di sangue secco, tamponi orali o saliva). Accertarsi che il DNA estratto sia idoneo per l'amplificazione dal punto di vista della concentrazione, della purezza e dell'integrità.

Per un'accurata determinazione dei genotipi, la quantità di DNA per reazione dev'essere compresa tra 10 e 100 ng per tutti i campioni.

7.2. Controlli della PCR

Includere **sempre** un **No Template Control (NTC)** in ciascun esperimento per confermare l'assenza di potenziali contaminazioni. E' consigliabile condurre l'NTC in duplicato (utilizzare acqua di grado PCR invece di DNA).

Includere **sempre** l'MTHFR mpx **WT-Control** e l'MTHFR 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 del MTHFR 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
MTHFR 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 nel 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 677C>T / 1298A>C
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NO	SI	NO	SI	677C>T normale / 1298A>C normale
mpx HET-Control	SI	SI	SI	SI	677C>T eterozigote / 1298A>C eterozigote
mpx MUT-Control	SI	NO	SI	NO	677C>T omozigote mutante / 1298A>C omozigote mutante
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Campione 1	SI	SI	NO	SI	677C>T eterozigote / 1298A>C normale
Campione 2	SI	NO	NO	SI	677C>T omozigote mutante / 1298A>C normale
Campione 3	NO	SI	SI	SI	677C>T normale / 1298A>C eterozigote
Campione 4	NO	SI	SI	NO	677C>T normale / 1298A>C omozigote mutante

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

MTHFR 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 7-165 / 7-168 100 / 32 reacciones
-30°C -15°C CE IVD



1. Aplicación

MTHFR mpx RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección simultánea de las mutaciones 677C>T y 1298A>C en el gen de *metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)*. Las mutaciones se asocian a una actividad enzimática reducida, que puede conducir a la hiperhomocisteinemia y a los efectos secundarios tóxicos derivados de un tratamiento con metotrexato.

El kit se utiliza para identificar a pacientes con una predisposición a enfermedades cardiovasculares, así como para identificar la intolerancia al metotrexato. El test cualitativo detecta en un extracto de ADN humano uno de los tres genotipos posibles para cada mutación: normal, heterocigoto u homocigoto mutado.

Secuencia de referencia: NG_013351.1; 677C>T: g.14783C>T, dbSNP: rs1801133 / 1298A>C: g.16685A>C, dbSNP: rs1801131.

2. Introducción

Los niveles elevados de homocisteína, un producto intermedio del metabolismo de la metionina, son un factor de riesgo para la arterosclerosis y la trombosis arterial. La hiperhomocisteinemia conduce a la disfunción endotelial y se asocia con la activación de trombocitos y la formación de trombos. Formas desde leves a moderadas pueden ser causadas por la mutación puntual homocigótica 677C>T en la región codificante del gen *MTHFR*. La mutación MTHFR 1298A>C se asocia también con una actividad enzimática disminuida, especialmente cuando aparece en conjunto con 677C>T. El nivel de homocisteína es significativamente más alto en individuos con ambas mutaciones, que en aquellos con solo una mutación 677C>T heterocigótica. La hiperhomocisteinemia puede afectar la sensibilidad al metotrexato y contribuir a la toxicidad, ya que MTHFR es una enzima importante para el mantenimiento de la aparición del folato celular. Una mutación homocigótica 677C>T o combinada 677C>T/1298A>C heterocigótica representa un riesgo significativamente mayor por sus efectos secundarios, cuando hay un tratamiento con metotrexato.

3. Componentes del

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 vial □ tapón blanco	1000 / 320 µl
MTHFR mpx Assay Mix	1 vial ■ tapón violeta	550 / 550 µl
MTHFR mpx WT-Control	1 vial ■ tapón verde	75 / 75 µl
MTHFR mpx MUT-Control	1 vial ■ tapón rojo	75 / 75 µl

RealFast™ 2x mpx Probe Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer. MTHFR mpx Assay Mix se compone de *MTHFR* cebadores (primers) de genes específicos y cuatro sondas de hidrólisis, doblemente marcadas alelo específicas. Además en el kit se incluyen las plantillas de control para el genotipo normal (WT-control) y el homocigoto mutado (MUT-control).

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

4. Almacenamiento y estabilidad

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

5. Descripción del producto

5.1. Principio de la prueba

La prueba basada en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocido como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene un par de cebadores (primers) específicos de gen para la amplificación de un fragmento de 144 pb y de 185 bp en el gen *MTHFR*, así como cuatro sondas de hidrólisis doblemente marcadas alelo específicas, que enlazan con la secuencia de objetivo del fragmento amplificado.

La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad 5' – 3' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq escinde el reporter de la sonda hibridada. La separación espacial del fluoróforo del quencher ocasiona una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR.

Sonda de hidrólisis	Fluoróforo	Canal
677C>T mutante	FAM	520 nm
677C>T tipo silvestre	HEX	556 nm
1298A>C mutante	ROX	605 nm
1298A>C tipo silvestre	Cy5	670 nm

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

5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

El uso de MTHFR mpx RealFast™ Assay está autorizado 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 determinó en base a los 69 alelos positivos 677C>T y 69 alelos positivos 1298A>C evaluados con una prueba de referencia de marcado de CE. El ensayo MTHFR mpx RealFast™ Assay tipificó correctamente todos los alelos positivos, lo equivale a una tasa de verdaderos positivos del 100%.

La **especificidad** se determinó en base a los 113 alelos negativos 677C>T y 113 alelos negativos 1298A>C evaluados con una prueba de referencia de marcado de CE. El ensayo MTHFR mpx RealFast™ Assay tipificó correctamente todos los alelos negativos, lo 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 a 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

Reactivos de extracción de ADN **no se incluyen** en el kit. Se puede utilizar ADN de diferentes muestras (por ejemplo, sangre total, tarjetas de sangre, frotis de mejilla o la saliva). El ADN purificado debe estar disponible para la amplificación de forma altamente molecular y en cantidad y pureza suficientes. Para determinar el genotipo fiable la cantidad de ADN por reacción para todas las pruebas debe ser entre 10 y 100 ng.

7.2. Controles PCR

Incluya en cada ejecución **siempre un No Template Control (NTC)** para controlar la posibilidad de una contaminación potencial. Se recomienda utilizar el NTC (agua ultra pura en lugar de ADN) como duplicado.

Realice en cada ejecución **siempre** el MTHFR mpx **WT-Control** y el MTHFR 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 MTHFR mpx RealFast™ Master Mix:

Descongele completamente todas las soluciones, mezclar suavemente y centrifugar brevemente. La preparación de la PCR debe llevarse a cabo a temperatura ambiente. Preparar suficiente **Master-Mix** (mezcla maestra) para el número total del depósito de PCR planificado (pruebas N + controles positivos + controles negativos), y calcular al menos una reacción adicional para nivelar inexactitudes del pipeteando:

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

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

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

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

7.4. Programa PCR

Programa su aparato PCR en tiempo real según lo especificado por el fabricante para experimentos "Allelic Discrimination" o "genotipado". Coloque las muestras 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 diagrama de dispersión (scatterplot). Los puntos de datos a lo largo de los ejes X e Y corresponden a genotipos normales o homocigotos mutantes, mientras que los puntos de datos en el centro de los gráficos de dispersión corresponden a genotipos heterocigotos. La NTC aparece en la parte inferior izquierda.

Controles / muestras	Amplificación por canal				Genotipo 677C>T / 1298A>C
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NO	SI	NO	SI	normal 677C>T / normal 1298A>C
mpx HET-Control	SI	SI	SI	SI	heterocigoto 677C>T / heterocigoto 1298A>C
mpx MUT-Control	SI	NO	SI	NO	homocigoto mutado 677C>T / homocigoto mutado 1298A>C
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Muestra 1	SI	SI	NO	SI	heterocigoto 677C>T / normal 1298A>C
Muestra 2	SI	NO	NO	SI	homocigoto mutado 677C>T / normal 1298A>C
Muestra 3	NO	SI	SI	SI	normal 677C>T / heterocigoto 1298A>C
Muestra 4	NO	SI	SI	NO	normal 677C>T / homocigoto mutado 1298A>C

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 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.

MTHFR 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 7-165 / 7-168 Σ 100 / 32 reações

-30°C -15°C



1. Utilização prevista

O MTHFR mpx RealFast™ Assay é um teste de PCR múltiplo para a deteção simultânea das mutações 677C>T e 1298A>C no gene *metilenotetra-hidrofolato reductase (MTHFR)* gene. As mutações estão associadas à redução da atividade da enzima, que provoca hiper-homocisteinemia e efeitos secundários tóxicos da terapêutica com metotrexato. O kit destina-se à identificação de doentes com suspeita de maior risco de sofrer doenças cardiovasculares ou intolerância ao metotrexato. O ensaio qualitativo discrimina os três genótipos possíveis de cada alelo num extrato de ADN humano: normal, heterozigótico ou mutante homozigótico.

Sequência de referência: NG_013351.1 g.14783C>T e g.16685A>C; dbSNP: rs1801133 and rs1801131.

2. Introdução

Níveis elevados de homocisteína, um produto intermediário do metabolismo da metionina, constituem um fator de risco estabelecido para aterosclerose e trombose arterial. Em última instância, a hiper-homocisteinemia causa disfunção endotelial associada a ativação plaquetária e formação de trombos. A homozigotia pode causar formas ligeiras a moderadas de mutação pontual 677C>T na região que codifica o gene da *MTHFR*. A segunda mutação comum da *MTHFR*, 1298A>C também contribui para a diminuição da atividade da enzima, sobretudo quando ocorrer em simultâneo com a mutação 677C>T. Os valores de homocisteína em jejum são significativamente superiores em indivíduos heterozigóticos relativamente a ambas as substituições do que nos portadores apenas da mutação 677C>T heterozigótica. A hiper-homocisteinemia pode afetar a sensibilidade ao metotrexato e contribuir para a sua toxicidade, pois a *MTHFR* é uma enzima importante na manutenção de reservas celulares de ácido fólico. Logo, a homozigotia de 677C>T ou a heterozigotia composta de 677C>T/1298A>C acarreta um risco significativamente elevado de efeitos secundários negativos da medicação com metotrexato.

3. Conteúdo do kit 100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 ampola	□ tampa branca	1000 / 320 µl
MTHFR mpx Assay Mix	1 ampola	■ tampa roxa	550 / 550 µl
MTHFR mpx WT-Control	1 ampola	■ tampa verde	75 / 75 µl
MTHFR 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 MTHFR mpx Assay Mix consiste em iniciadores específicos do gene *MTHFR* 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 MTHFR 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®-Assay. Cada reação contém dois pares de iniciadores específicos do gene, que amplificam um fragmento de 144 bp e de 185 bp do gene *MTHFR*, 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 MTHFR	Fluoróforo	Canal
677C>T mutante	FAM	520 nm
677C>T tipo natural	HEX	556 nm
1298A>C mutante	ROX	605 nm
1298A>C 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 amplicões e produzem sinais intermédios nos respetivos canais.

5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O MTHFR 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)
- ✓ LightCycler® 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) ou para instrumentos sem os canais de deteção de fluorescência necessários.

5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi efetuada em 69 alelos com resultado positivo para 677C>T e 69 com resultado positivo para 1298A>C, ambos testados com um kit de referência com marcação CE. O MTHFR mpx RealFast™ Assay determinou corretamente todos os alelos *MTHFR* como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 113 alelos com resultado negativo para 677C>T e 113 com resultado negativo para 1298A>C, ambos testados com um kit de referência com marcação CE. O MTHFR mpx RealFast™ Assay determinou corretamente todos os alelos *MTHFR* 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 0,5 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 MTHFR mpx **WT-Control** e o MTHFR 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 e do MUT-Control numa proporção de 1:1.

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

7.3. Preparação da MTHFR 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
MTHFR 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

Programa 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 677C>T / 1298A>C
	FAM Green	HEX Orange	ROX Yellow	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NÃO	SIM	NÃO	SIM	677C>T normal / 1298A>C normal
mpx HET-Control	SIM	SIM	SIM	SIM	677C>T heterozigótico / 1298A>C heterozigótico
mpx MUT-Control	SIM	NÃO	SIM	NÃO	677C>T mutante homozigótico / 1298A>C mutante homozigótico
NTC	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	---
Amostra 1	SIM	SIM	NÃO	SIM	677C>T heterozigótico / 1298A>C normal
Amostra 2	SIM	NÃO	NÃO	SIM	677C>T mutante homozigótico / 1298A>C normal
Amostra 3	NÃO	SIM	SIM	SIM	677C>T normal / 1298A>C heterozigótico
Amostra 4	NÃO	SIM	SIM	NÃO	677C>T normal / 1298A>C mutante 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.