



***LightMix[®] kit de diagnóstico in-vitro para
IL28B***

Cat.-No.: 40-0588-64

Detección de la variación de ADN T-3176C
en el gen *IL28B*

Para usar con los
instrumentos Roche Diagnostics LightCycler[®]

Formato SimpleProbe[®]

Reactivos para 64 reacciones

A la llegada:

Almacenar los reactivos pre-mezclados de la PCR y los Controles protegidos de la luz y a temperatura ambiente (No congelar)

Almacenar los reactivos FastStart DNA Master HybProbe congelados a (-20°C); (Si fueron incluidos)




Tabla de Contenidos


1. INFORMACIÓN DEL PRODUCTO	3
1.1 Contenidos: <i>LightMix® Kit IL28B</i>	3
1.2 Uso previsto	4
1.3 Especificaciones	4
1.3.1 Muestras Clínicas	4
1.3.2 Instrumentos, Software y Productividad	5
1.4 Almacenamiento y estabilidad	5
2. DISPOSITIVOS ADICIONALES Y REACTIVOS	6
2.1 Necesario	6
2.2 Opcional	6
2.3 Preparación de las muestras	6
3. ANTECEDENTES	7
3.1 Antecedentes Médicos	7
3.2 Metodología y principio del ensayo	8
3.3 Características de rendimiento	8
4. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	9
5. PROGRAMACIÓN	10
5.1 Compensación de color	10
5.2 Instrumentos <i>LightCycler®</i> de capilares	10
5.3 Instrumentos Roche 480	11
5.4 Instrumento <i>LightCycler® 96</i>	12
5.5 Instrumento <i>LightCycler® Nano</i>	13
6. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	14
6.1 Preparación de muestras	14
6.2 Preparación de reactivos	14
6.2.1 Preparación de la mezcla <i>LightCycler® FastStart DNA Master</i>	14
6.2.2 Preparación de los reactivos parámetro específicos	14
6.2.3 Preparación del control positivo	15
6.2.4 Preparación de estándares de genotipado	15
6.3 Preparación de la mezcla de reacción	15
6.3.1 Preparación de mezcla de reacción para 64 muestras	15
6.3.2 Preparación de mezcla de reacción individual	16
6.3.3 Capilar / Pocillo procedimiento de carga	16
6.4 Almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos	17
6.5 Carga de los controles y estándares de genotipado	17
6.5.1 Instrumentos de capilares	17
6.5.2 Instrumentos Roche 480	18
6.5.3 Instrumento <i>LightCycler® 96</i>	18
6.5.4 Instrumento <i>LightCycler® Nano</i>	18
7. ANÁLISIS DE LOS DATOS E INTERPRETACIÓN	19
7.1 Límites e interferencias	19
7.2 Calibración	19
7.3 Control de calidad – Criterios de Aceptación	19
7.3.1 Control negativo	19
7.3.2 Control positivo	19
7.3.3 Estándares de Genotipado	20
7.3.4 Muestras	20
7.3.5 Curvas de <i>melting</i> anómalas	20
7.4 Salvar externamente estándares de genotipado	20
7.4.1 Instrumentos de capilares	20
7.4.2 Instrumentos Roche 480	20
7.5 Lectura de los resultados	21
7.5.1 Análisis <i>Melting</i> : Instrumentos de capilares	21
7.5.2 Análisis <i>Melting</i> : Instrumentos Roche 480	21
7.5.3 Análisis <i>Melting</i> : Instrumento <i>LightCycler® 96</i>	22
7.5.4 Análisis <i>Melting</i> : Instrumento <i>LightCycler® Nano</i>	22
7.6 Temperatura de <i>melting</i> esperada	22
7.7 Interpretación de los resultados.	23
7.8 Información adicional	24
7.8.1. Datos típicos para amplificación	24
7.8.2. Variantes raras	25
8. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	26
9. REFERENCIAS	27

1. Información del producto

1.1 Contenidos: LightMix® Kit IL28B

Reactivos de PCR pre-mezclados liofilizados				
 Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad				
Color tapón	Etiqueta	Descripción contenido	Total reacciones	
1 x	Rojo	PSR	Reactivo Parámetro Específico (PSR) contiene primers y sondas pre-mezclados y liofilizado para 64 reacciones. <0,01pg oligonucleótido no marcado; <0,01pg sonda marcada con SimpleProbe 519	64 Pellet azul-verde liofilizadas

Estándares (Control ADN)				
 Almacenar a temperatura ambiente				
Color tapón	Etiqueta	Descripción contenido	Total reacciones	
1 x	Amarillo	HT	Control Positivo T-3176C Heterocigoto IL28B <0,01pg plásmido <i>target</i> (sintético) [cerca de 10E4 genoma equivalentes]	40 Pellet azul liofilizadas
1 x	Amarillo	ANC	Estándar Genotipo Ancestral Alelo T <0,01pg plásmido <i>target</i> (sintético) [cerca de 10E4 genoma equivalentes]	40 Pellet azul liofilizadas
1 x	Amarillo	VAR	Estándar Genotipo Variante Alelo C <0,01pg plásmido <i>target</i> (sintético) [cerca de 10E4 genoma equivalentes]	40 Pellet azul liofilizadas

Mezcla Polimerasa: LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe				
 Almacenar a -20°C a la llegada				
Color tapón	Etiqueta	Descripción contenido	Total reacciones	
1 x	Rojo	1a	LightCycler® FastStart Enzyme	64 congeladas
1 x	Blanco	1b	LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe	64 congeladas
1 x	Transparente	Agua	H ₂ O grado-PCR	congeladas
1 x	Azul	MgCl ₂	MgCl ₂ , 25 mM	congeladas

La FastStart DNA Master HybProbe está incluida en los kits suministrados directamente por TIB MOLBIOL exclusivamente para clientes en Europa Central ⁽¹⁾.

La FastStart DNA Master HybProbe no está incluida en kits suministrados a través de Roche Diagnostics o su distribuidor local.

- 1) La enzima FastStart es enviada por TIB MOLBIOL a temperatura ambiente.

1.2 Uso previsto

El kit permite determinar el polimorfismo del promotor de la IL28B posición -3176. El polimorfismo -3176 C/T aparece en la dbSNP bajo el número rs12979860.

Pacientes con el genotipo homocigota -3176 C/C muestran el doble de respuesta virológica sostenida (SVR), del 55-80% en comparación con el 20-40% de los individuos con el genotipo C/T ó T/T.

Tenga en cuenta de que este es un valor estadístico que no permite hacer una predicción para un único paciente.

Los resultados obtenidos usando este KIT no están destinados a ser la única base para cualquier decisión terapéutica. El estado de la mutación del paciente debe ser considerado junto con los factores de riesgo.

Nota: El rendimiento del ensayo sólo puede ser garantizado cuando se utiliza con los Instrumentos LightCycler® (Véase 1.3.2 para detalles).

1.3 Especificaciones

El *Kit LightMix® IL28B* es un test de diagnóstico in-vitro y permite la detección del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de la IL28B T-3176C como se ha demostrado con muestras de referencia.

1.3.1 Muestras clínicas

El test requiere de 2 µl de ADN genómico purificado en solución acuosa extraídos de muestras clínicas, conteniendo desde 5 a 100 ng/µl de ADN genómico (10 ng – 200 ng cantidad total), como se determina por espectrofotometría UV (1 OD = 50 µg ADN/ml).

1.3.2 Instrumentos, Software y Productividad

El kit contiene reactivos para 64 reacciones realizadas en un volumen de 10 µl.

Cada ejecución requiere incluir un estándar y un control negativo.

La siguiente tabla resume algunas de las características del kit:

Instrumento PCR Roche	Versión Software (o superior)	Tiempo Ejecución (aprox.)	Máximo de muestras por ejecución ⁽²⁾	Máxima Productividad del kit ⁽³⁾	Mínima Productividad del kit ⁽⁴⁾
LC 1.2	4.10 ⁽¹⁾	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC 1.5	4.10 ⁽¹⁾	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC 2.0	4.05	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC480 (96 wells)	1.5	100 min	94 + 2 ctrl.	60	20
LC480 (384 wells)	1.5	100 min	382 ⁽⁵⁾ + 2 ctrl.	60	20
Z480 (canal abierto)	1.5	100 min	94 + 2 ctrl.	60	20
LC96	1.6 ⁽⁶⁾	100 min	94 + 2 ctrl.	60	20
Nano	1.0 ⁽⁶⁾	60 min	30 + 2 ctrl.	60	21

1 Ejecutando el test con los instrumentos LightCycler® 1.2 o 1.5 con la versión del software 3.5 produce resultados comparables. Instrucción para la programación, análisis de datos e interpretación de resultados no están descritos en este manual. **Actualizar a la versión 4.10 o superior cuando sea posible.** El software LightCycler® 3.5.3 no contiene el módulo automático de genotipado; resultados equivalentes pueden ser obtenidos por personal capacitado que deben analizar cada muestra manualmente

2 Cada ejecución debe incluir un control heterocigoto y un Control No-Target (NTC) por un total de 2 controles de reacción.

3 La primera ejecución del kit requiere que se incluyan el total de los 4 controles para enseñar al módulo de genotipado (no aplicable para Nano y LC96). El número máximo de muestras que pueden ser procesadas se reduce en consecuencia.

Dependiendo de las regulaciones locales, los 4 controles de genotipado podrían tener que ser incluidos en cada ejecución, reduciendo el total del número de muestras de pacientes que pueden ser analizadas

4 Calculado teniendo en cuenta una muestra clínica única analizada en cada ejecución.

5 Se requiere el uso de más de un kit.

6 El software del Nano LightCycler® 1.0 y el software del LC96 1.6 no contiene el módulo de genotipado automático, por lo tanto no es necesario agregar dos estándares de genotipado; resultados equivalentes pueden ser obtenidos por personal capacitado que deben analizar cada muestra manualmente.

1.4 Almacenamiento y estabilidad

Tenga en cuenta **las diferentes condiciones de almacenamiento** para los reactivos y la mezcla de polimerasa!

Reactivos y controles:

Almacenar los reactivos liofilizados (PSR y Estándares) protegidos de la luz y a temperatura ambiente (18-25°C).

No congelar los reactivos liofilizados. La fecha de vencimiento está impresa en la etiqueta del kit.

Mezcla de la Polimerasa:

Almacenar la LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe entre -15°C a -25°C. Ver fecha de caducidad en la etiqueta del tubo de la polimerasa.

Envío:

Los productos son enviados a temperatura ambiente. La estabilidad en el transporte de los reactivos y los componentes de la enzima han sido probados en esas condiciones de envío.

2. Aparatos y reactivos adicionales

2.1 Requeridos

Instrumento LightCycler® 2.0

Instrumento LightCycler® 2.0
Software LightCycler® Versión 4.05 o
Software LightCycler® Versión 4.10 o superior
Capilares LightCycler® (20 µl)

○

Instrumentos LightCycler® 480

Instrumento LightCycler® 480 (modelo I)
Instrumento LightCycler® 480 II
Sistema Cobas® 4800 (Instrumento Z480)
Software LightCycler® Versión 1.5 o superior
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 o
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 white

○

Instrumento LightCycler® 96

Instrumento LightCycler® 96
LightCycler® Software Version 1.0 o superior
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96
LightCycler® 8 tube strips (white)

○

Instrumento LightCycler® Nano

Instrumento LightCycler® Nano
Software LightCycler® Versión 1.0 o superior
tubos LightCycler® Nano

○

Instrumentos LightCycler® 1.x

Instrumentos LightCycler® 1.2 y 1.5
Software LightCycler® Versión 4.10
Capilares LightCycler® (20 µl)

2.2 Opcional

Instrumentos:

LC Carousel Centrifuge 2.0 (230 Volt)
Capping Tool

2.3 Preparación de las muestras

Manual de preparación de las muestras:

Kit de Preparación High Pure PCR Template
Agua grado-PCR libre de Nucleasa
Etanol p.a.
Isopropanol p.a.

Preparación automática de muestras:

Instrumento MagNA Pure
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

Instrumento MagNA Pure 2.0
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

Instrumento MagNA Pure Compact
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I

Instrumento MagNA Pure 96
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit

Roche Diagnostics

Cat.-No. 12 011 468 001
Descatalogado
Cat.-No. 04 779 584 001
Cat.-No. 11 909 339 001

Roche Diagnostics

Descatalogado
Cat.-No. 05 015 278 001
Cat.-No. 05 200 881 001
Cat.-No. 04 994 884 001
Cat.-No. 04 729 692 001
Cat.-No. 04 729 749 001

Roche Diagnostics

05 815 916 001
Incluido con el instrumento
Cat.-No. 04 729 692 001
Cat.-No. 06 612 601 001

Roche Diagnostics

Cat.-No. 06 407 773 001
Incluido con el instrumento
Cat.-No. 06 327 672 001

Roche Diagnostics

Descatalogado
Cat.-No. 04 779 584 001
Cat.-No. 11 909 339 001

Roche Diagnostics

Cat.-No. 03 709 582 001
Cat.-No. 03 357 317 001

Roche Diagnostics

Cat.-No. 11 796 828 001
cualquier proveedor
cualquier proveedor
cualquier proveedor

Roche Diagnostics

Descatalogado
Cat.-No. 03 003 990 001

Cat.-No. 05 197 686 001
Cat.-No. 03 003 990 001

Cat.-No. 03 731 146 001
Cat.-No. 03 730 964 001

Cat.-No. 05 195 322 001
Cat.-No. 05 467 497 001

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes Médicos

La interleuquina 28B (IL28B, OMIM *607402) está agrupada en un solo gen con la IL28A y la IL29. Las tres citoquinas interactúan con un receptor heterodimérico que está formado por el receptor IL10 beta y el receptor ILC28 alfa. La expresión de estos genes es inducida por infecciones virales.

Se ha reportado recientemente^{1,2,3} que el polimorfismo del promotor de la IL28B en la posición -3176 C/T (rs12979860) está relacionado con una tasa significativamente mayor de eliminación espontánea del virus de la Hepatitis C (HCV) y con la perspectiva de utilizar en pacientes un tratamiento antiviral con interferón (Pegasys, Roche). En particular, los pacientes con los genotipos C/C muestran una mayor tasa de respuesta virológica sostenida (SVR) del 55-80% en comparación con el 20-40% de los individuos con el genotipo C/T ó T/T.

El polimorfismo rs12979860 está asociado en un 85% a una (transición G/C t 37 pb *upstream*) del codón de iniciación de la traducción (rs28416813) y de la variación Lys a Arg en el codón 70 (K70R, rs8103142). Un efecto similar ha sido reportado para la variante T del SNP rs8099917^{3,4}.

Otros polimorfismos humanos con una correlación con infecciones de HCV son:

IL28B	rs8099917
IL28B	rs12980275
ITPA	rs1127354
ITPA	rs7270101
PNPLA3	rs738409
CXCL1	rs4074
TNFRSF10A	rs20575
TNFRSF10A	rs20576

3.2 Metodología y Principios del ensayo

Usando la metodología de PCR, un fragmento del gen de la IL28B de 139 pb es amplificado con primers específicos. El fragmento es detectado con una sonda de detección mutación-específica.

La sonda se une a una parte del fragmento amplificado que abarca el sitio de la mutación. Cualquier *mismatch* cubierto por la sonda desestabiliza el híbrido. Durante el análisis de la curva de *melting* la temperatura se incrementa lentamente. La sonda se disocia a un valor específico, provocando una disminución de la fluorescencia.

En este producto la sonda hibridiza con la secuencia de genotipo variante y la presencia del genotipo ancestral presentará una T_m inferior.

La lectura de los resultados de genotipado se basa en comparar las temperaturas de *melting* con los estándares suministrados. Si el software del instrumento lo permite la lectura de los resultados de genotipo pueden ser realizadas por el genotipado automático (disponible según el instrumento utilizado).

En caso en que el software de genotipado automático no esté disponible o falle en la lectura de los datos, los resultados deben ser obtenidos de las temperaturas de *melting* siguiendo los criterios descritos en el capítulo 7.

Los controles estándares de ADN suministrados permiten una comparación con las muestras clínicas.

3.3 Características de rendimiento

Especificidad Analítica

La especificidad para el gen *target* y la idoneidad de la amplificación de PCR empleada en el presente ensayo se demostró para secuenciación directa de un amplicón que abarca la mutación de interés.

Sensibilidad Analítica

La detección de diluciones en series de varios ADNs genómicos heterocigotas humanos han revelado que el límite de detección del presente ensayo es de 250 copias (1.5 ng).

Especificidad y Sensibilidad del Diagnóstico

Un panel de 96 muestras ADN genómico de pacientes Caucásicos fueron analizadas con el presente kit y comparadas con la secuenciación del ABI 3730xl DNA realizada por LGC Genomics GmbH, Berlin.

Resultados del estudio: los resultados para ambos métodos analíticos presentaron 100% concordancia.

En particular, 9 (9.5%) muestras fueron homocigotos TT, 40 (41.7%) heterocigotos, y 47 (49%) homocigotas CC.

Los reactivos incluidos en el presente kit han sido usados en tres publicaciones independientes reportando un resultado combinado de 781 muestras. En particular: 9.5% TT, 41.9% CT y 48.6% CC con “una distribución de alelos (..)de acuerdo con el equilibrio de the Hardy–Weinberg” 5, 6, 7.

4. Precauciones y Advertencias

Requerimientos de manipulación

El presente producto es un dispositivo *in-vitro* para diagnóstico y por lo tanto debe ser utilizado únicamente por personal cualificado.

Son requeridas precauciones generales para el manejo de materiales genéricos de Laboratorio.

El Laboratorio de trabajo debe cumplir con los estándares requeridos. Debido al riesgo de contaminación, la preparación y amplificación de la PCR debe realizarse en zonas físicas separadas.

No mezclar reactivos de diferentes lotes.

No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.

Utilice la versión del manual que se entrega con el Kit (Ver etiqueta del Kit).

Procedimientos de laboratorio

Todos los materiales de origen humano y los residuos relacionados deben ser considerados como potencialmente infecciosos. Limpiar a fondo y tratar todas las superficies con desinfectantes aprobados por las autoridades locales.

No comer, beber o fumar en el área de trabajo del laboratorio.

No pipetear con la boca.

Usar guantes de protección desechables, batas de laboratorio y protección ocular adecuada durante la manipulación de las muestras y los componentes establecidos.

Evitar la contaminación microbiana o de nucleasas de los reactivos durante el pipeteado de las alícuotas. El uso de puntas desechables estériles es esencial.

Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los componentes del Kit.

Preparación de muestras

En cuanto a la manipulación y eliminación, consulte las instrucciones de seguridad adjuntas en el prospecto del producto empleado (véase capítulo 2.3).

Amplificación y Detección

Antes de utilizar este producto, por favor lea el manual del operador del LightCycler®.

Por favor salve un archivo de las muestras para identificar cada posición en el carrusel y permitir la identificación correcta de la muestra.

Comprobar la configuración del instrumento LightCycler® y asegúrese de que coincidan con los reportados en la siguiente sección “protocolo PCR” específico para su instrumento.

No tocar la superficie de los capilares o la cubierta de la placa sin guantes.

Por favor consulte todas las instrucciones operativas y de seguridad del instrumento LightCycler®.

Manejo de desechos

Deseche los reactivos no utilizados y los residuos de acuerdo con la legislación vigente.

5. Programación

5.1 Compensación de color

No se requiere compensación de color para el uso del *LightMix® Kit IL28B*. La lectura de los datos con la 'compensación de color' activada no va a cambiar la lectura de los resultados.

5.2 Instrumentos LightCycler® de Capilares

Para más detalles consulte el manual del operador del LightCycler®.

Programación:

El protocolo consiste en cuatro pasos (Tab.1):

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Amplificación** del ADN *target*
3. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada por PCR
4. **Enfriamiento** del instrumento

Step:	1	2			3			4
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]*	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Sec Target [°C]	0	0	0	0	0	0	0	0
Step Size [°C]	0	0	0	0	0	0	0	0
Step Delay [cycles]	0	0	0	0	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None

Tab. 1: Programación de Instrumentos de capilares

Nota:

Durante la programación mantener los valores por defecto del software: channel = 530, max. samples = 32, seek temperature = 30°C and capillary size = 20 µl. No cambiar el valor de "capillary size" a 100 µl. Guardar el programa y los valores por defecto como '**RUN Template**', que se puede cargar al iniciar cada ejecución.

Justo antes de comenzar la ejecución, modificar max. samples (default = 32) al número de muestras más controles incluidos en la ejecución para evitar la parada del instrumento debido a la falta de capilares.

Para el instrumento *LightCycler 1.x* usando la versión del software 3.5.3 leer 'Temperature Transition Rate' [°C/s] en lugar de Ramp Rate.

Para instrucciones véase el manual del operador.

5.3 Instrumentos Roche 480

Para más detalles, véase el manual del operador del LightCycler®.

Formato de detección: SimpleProbe

Nota:

Este kit puede ser ejecutado en combinación con el LightMix® kit HFE H63D S65C C282Y CE (cat. 40-0340-32), siguiendo las instrucciones para detección y programación descritas en el manual del kit de la HFE.

Volumen de reacción: 10 µl

Programación:

El protocolo consiste en cuatro pasos (Tab.2):

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Amplificación** del ADN *target*
3. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada por PCR
4. **Enfriamiento** del instrumento

Step:	1	2			3			4
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	45			1			1
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [C°/ s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.29	1.5
Ramp Rate [C°/ s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	0.29	2.0
Acquisitions [per °C]	-	-	-	-	-	-	2	-
Sec Target [°C]	0	0	0	0	-	-	-	-
Step Size [°C]	0	0	0	0	-	-	-	-
Step Delay [cycles]	0	0	0	0	-	-	-	-

Tab. 2: Programación de los instrumentos 480.

Nota:

Guardar el programa y los valores predefinidos como 'RUN Template', que se puede cargar al inicio de cada ejecución.

Asegurarse de programar **2 adquisiciones por segundo** en lugar del valor predeterminado 5; más adquisiciones reducen la pendiente la curve *melting*, aumentando el tiempo de experimentación y ocasionando fallas en el kit.

5.4 Instrumento LightCycler® 96

Para más detalles, véase el manual del operador del LightCycler®.

Medición:

Detection Format: 470/514 FAM			General
Quant Factor	Melt Factor	Integration Time (S)	Volumes (µl)
10.00	1.20	1.00	10

Perfil:

El protocolo consiste en cuatro pasos (Tab.3):

1. **Desnaturalización** de las muestras y activación de la enzima
2. **Amplificación** del ADN *target*
3. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada
4. **Enfriamiento** del Instrumento

Step:	1	2			3			4
Parameter								
Cycles	1	45			1			1
Ramp [°C/ s]	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.20	1.5
Duration [s]	600	5	10	15	30	120	1	30
Target [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Mode		Standard	Standard	Standard				
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None
Readings /°C							5	

Tab. 3: Programación del instrumento LightCycler® 96

Note: Guardar el programa y los valores por defecto como 'Experiment file' que se puede cargar al inicio de cada ejecución.

5.5 Instrumento LightCycler® Nano

Para más detalles, véase el manual del operador del LightCycler®.

Run Setting / Optical setting

Intercalating Dyes

Normal Quality

Perfil:

El protocolo consiste en cuatro pasos (Tab.4):

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Amplificación** del ADN *target*
3. **Desnaturalización** del producto de PCR amplificado.
4. **Melting** Identificación de la secuencia de ADN amplificada por PCR

Step:	1	2			3	4	
Parameter							
Name	Hold	3 Step Amplification			Hold	Melting Stage	
						Initial Stage	Final Stage
Cycles		45					
Temp [°C]	95	95	60	72	95	43	75
Ramp (°C/s)	5	5	4	5	5	4	0.2
Hold (s)	600	10	15	20	30	120	1
Acquire			√				

Tab. 4: Programación del instrumento LightCycler® Nano

Nota:

Guardar el programa y los valores predefinidos como 'Experiment file' que se puede cargar al inicio de cada ejecución.

6. Protocolo experimental

Programar el instrumento antes de preparar las soluciones (véase sección 5. Programación y lectura, para más detalles véase el manual del operador del LightCycler®).

El rendimiento del ensayo sólo puede ser garantizado cuando se utiliza con los sistemas de diagnóstico por PCR de Roche.


6.1 Preparación de muestras

Para la preparación de ADN genómico utilizar sangre periférica humana (EDTA, citrato). El uso de heparina es desaconsejado ya que este anticoagulante podría interferir con la PCR. Lleve a cabo la purificación manual de los ácidos nucleicos utilizando el *High Pure PCR Template Preparation Kit* o con el instrumento *MagNA Pure LC* eligiendo el kit de extracción apropiado al modelo utilizado (véase 2. Aparatos y reactivos adicionales) como se describe en los protocolos respectivos.

En los ensayos descritos (ver 7.8.1. Datos típicos para amplificación) el ADN fue extraído manualmente de 200 µl de sangre usando el *Kit High Pure PCR Template* siguiendo las instrucciones del fabricante; 100 µl de buffer de elución fueron usados para la elución final del ADN purificado de la columna.

6.2 Preparación de los reactivos

6.2.1 Preparación de la LightCycler® FastStart DNA Master

1	Mantener la Enzima LightCycler® FastStart 1a fría.
2	Descongelar la mezcla de reacción LightCycler® FastStart 1b calentando el tubo a 30- 35°C por 3 - 5 minutos.
3	Centrifugar rápidamente los tubos para recoger las gotas.
4	La solución debe estar libre de partículas.
5	Agregar 60 µl de 1b al tubo 1a .
6	 Mezclar la solución cuidadosamente con una pipeta. No usar el vortex! Evitar la producción de burbujas.
7	Centrifugar rápidamente los tubos para recoger las gotas.
8	Utilizar reactivo para preparar mezcla de reacción (sección 6.3).
9	Almacenar el reactivo sobrante a 4°C.

6.2.2 Preparación del Reactivo Parámetro Específico (PSR)

▶	Cada tubo de reactivo PSR es suficiente para 64 reacciones.
1	Centrifugar el tubo con la pre-mezcla PSR a 10,000 RPM por 1'
2	Comprobar que el pellet se encuentra en la parte inferior.
3	Por cada tubo de PSR agregar 66 µl de Agua grado-PCR.
4	Incubar por 20 segundos a temperatura ambiente.
5	Mezclar con el <i>Vortex</i> por 10 segundos.
6	Centrifugar los tubos para colectar las gotas.

▶ Usar 1 µl del reactivo **PSR** para una reacción de 10 µl de PCR.

6.2.3 Preparación del Control Positivo

▶	El HT Control Positivo es suficiente para 40 reacciones.
1	Centrifugar el tubo HT a 10,000 RPM por 1 minuto.
2	Controlar que el pellet azul se encuentre localizado en el fondo del tubo.
3	Disolver el pellet agregando 80 µl Agua grado-PCR.
4	Incubar por 20 segundos a temperatura ambiente.
5	Mezclar la solución con el <i>Vortex</i> por 10 segundos.
6	Centrifugar los tubos para recoger las gotas.

▶ Usar 2 µl de cada **Control Positivo** para una reacción de PCR de 10 µl.

▶ **Control positivo** se debe utilizar en cada ejecución.

A tener en cuenta: La apertura de los viales puede provocar contaminaciones del espacio de trabajo (aerosol).

6.2.4 Preparación de Estándares de Genotipado

El software LightCycler® 4.05 y posteriores (instrumentos de capilares) y el software 1.5 (instrumentos LightCycler®480) pueden ser calibrados con estándares de referencia para llevar a cabo una determinación automática de genotipado de muestras clínicas desconocidas.

	Los estándares de genotipado ANC y VAR son suficientes para 40 reacciones
▶	Si no se utiliza, mantener los Estándares de Genotipado liofilizados; desechar los reactivos cuando el kit esté agotado o después de haber alcanzado la fecha de caducidad.
1	Centrifugar los tubos de ANC y VAR a 10,000 RPM por 1 minuto.
2	Controlar que el pellet azul se encuentra localizado en el fondo del tubo.
3	Disolver el pellet agregando 80 µl Agua grado-PCR.
4	Incubar por 20 segundos a temperatura ambiente.
5	Mezclar la solución con el <i>Vortex</i> por 10 segundos.
6	Centrifugar los tubos para recoger las gotas.

▶ Usar 2 µl de Estándares de Genotipado **ANC** y **VAR** para una reacción de PCR de 10 µl.

▶ Ambos **Estándares de Genotipado** debe ser utilizado en la primera ejecución del kit para calibrar el módulo de determinación del genotipo.


A tener en cuenta: La apertura de los viales puede provocar contaminaciones del espacio de trabajo (aerosol).

6.3 Preparación de la Mezcla de Reacción

6.3.1 Preparación de la mezcla de reacción para 64 muestras

Recomendamos preparar las 64 reacciones para evitar el almacenamiento de los reactivos disueltos o activados en diferentes volúmenes (6.2). Véase el capítulo 6.4 para almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos. Para la preparación de la mezcla de reacción para menos reacciones, por favor ir al punto 6.3.2 "Mezcla de Reacción para reacción única".

Preparar la mezcla de reacción en el tubo PSR (refrigerado):

Componentes	64 reacciones
Al tubo PSR (tapa rojo) que ya contiene	66.0 µl
Agregar:	
H ₂ O, grado-PCR (tapa transparente)	343.2 µl
Solución Mg ²⁺ 25 mM (tapa azul)	52.8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (tapa rojo), véase 6.2.1	66.0 µl
 Sustituir la "tapa larga roja" del tubo PSR con la tapa roja de la enzima FastStart	
Volumen Total	528.0 µl

Tab. 5: Volúmenes de los componentes para la preparación de una mezcla para 64 reacciones

6.3.2 Preparación de la mezcla para reacción individual

Preparar la mezcla de reacción multiplicando cada volumen (Tab. 6) por el número de muestras biológicas a ser analizadas más tres reacciones (Control Negativo, **Control Positivo**, una reacción en exceso) y (opcionalmente) los dos **Estándares de Genotipado**.

Preparar la mezcla de reacción en un tubo refrigerado:

Componentes	reacción Simple
H ₂ O, grado-PCR (tapa transparente)	5.2 µl
Mg ²⁺ solución 25 mM (tapa azul)	0.8 µl
PSR (tapa roja), véase 6.2.2	1.0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (tapa roja), véase 6.2.1	1.0 µl
Volumen de la mezcla de reacción	8.0 µl

Tab. 6: Volúmenes de los componentes para preparar una mezcla de reacción única



**Pipetee arriba y abajo la mezcla de reacción.
Un alto porcentaje de fallas experimentales se debe
a una mezcla de reacción no homogénea**



6.3.3 Carga de capilares / placas

Cada ejecución debe incluir un Control Negativo (**NTC**) para demostrar la ausencia de contaminación con ADN genómico o producto de PCR de IL28B y un **Control Positivo** para identificar ejecuciones específicas de temperatura de *melting*. Organismos reguladores o normas de laboratorio locales pueden requerir que se incluyan los dos estándares de genotipado.

Carga de capilares / placas

▶	Recuerde incluir siempre los controles al configurar la ejecución.
1	Mezclar suavemente la mezcla de reacción, centrifugar brevemente y controlar que no se formaron burbujas de aire.
2	Cargar 8 µl de la mezcla de reacción por capilar/pocillo.
3	Es obligatorio: Agregar 2 µl de H ₂ O grado-PCR como Control Negativo (NTC) Agregar 2 µl de Control Positivo HT
	Opcional *: Agregar 2 µl de ANC Estándar de Genotipado Agregar 2 µl de VAR Estándar de Genotipado
4	Agregar 2 µl de Muestra en los restantes capilares / pocillos.
5	Cerrar el capilar/pocillo y centrifugar. Controlar que no haya burbujas de aire.
6	Colocar el rotor/placa en el instrumento LightCycler®.
7	Solo en los instrumentos de capilares se debe ingresar el número de muestras.
8	Iniciar la ejecución.
9	Ingresar el nombre del experimento, cuando se le indique.
10	Salvar los datos de las muestras en la ventana "samples".

* Véase sección **6.5** para la carga de las muestras y calibración de los Estándares de genotipado.

6.4 Almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos

Mezcla de Reacción

La mezcla de reacción completa contiene el **PSR**, LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe y MgCl₂; puede ser almacenada por 30 días refrigerada (4-8°C). Evitar la exposición prolongada a la luz.

Reactivos Parámetro Específicos (PSR)

Una vez disuelto, almacenar el PSR refrigerado a 4-8°C por un período máximo de 30 días. Evitar la exposición prolongada a la luz.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

La mezcla FastStart DNA Master HybProbe master mix (1a+b) puede ser almacenada en frigorífico por 30 días a 4-8°C.

Estándares de Genotipado

Conservar los **Estándares de Genotipado** en frigorífico a (4- 8°C) por un máximo de 30 días.

6.5 Carga de Controles y Estándares de Genotipado

Las muestras en posiciones 1 a 2 deben ser cargadas en cada ejecución; las muestras 3 y 4 son necesarias para la enseñanza del genotipado (solamente en la primera ejecución del kit)



Los resultados de genotipado están basados en las temperaturas de melting.

El uso del módulo automático de genotipado presente en el software del LightCycler® 2.0 y el LightCycler® 480 (cobas z 480 UFD) es opcional.

Consultar el manual del operador del LightCycler® para más detalles.

6.5.1 Instrumentos de Capilares

En la ventana “Samples data - Capillary View”, introducir el nombre de la muestra cómo se describe en la segunda columna.

Seleccionar “Analysis Type – Genotyping”. Seleccionar solo el canal 530 y deseleccionar todos los demás. Desde el menú desplegable seleccione “Sample Type” y copie la descripción “Genotype”:

Pos	Sample Name	Channel	Target Name	Sample Type	Genotype
1	NTC	530	Target 1	Negative Control	
2	HT	530	Target 1	Melting Standard	IL28B T-3176C Heterozygous
3	ANC	530	Target 1	Melting Standard	IL28B T-3176 Ancestral
4	VAR	530	Target 1	Melting Standard	IL28B -3176C Variant

6.5.2 Instrumentos Roche 480

En la ventana “Sample Editor”, en la sección “Step1: Select Workflow”, seleccionar “Melt Geno”. Seleccionar la combinación de filtros 465-510. Introducir la descripción del **Control Positivo** y los **Estándares de Genotipado** como sigue:

Pos	Sample Name	Melt Geno Sample Type	Melt Geno Genotype
1	NTC	Negative Control	
2	HT	Melting Standard	IL28B T-3176C Heterozygous
3	ANC	Melting Standard	IL28B T-3176 Ancestral
4	VAR	Melting Standard	IL28B -3176C Variant

6.5.3 Instrumento LightCycler® 96

En la ventana “Sample Editor”, agregar las descripciones **Control Positivo** y opcionalmente **Estándares de Genotipado**.

Table View

Color	Position	Sample Name	Sample Type	Dye
	A1	NTC	Unknown	FAM
	A2	HT	Unknown	FAM
	A3	ANC	Unknown	FAM
	A4	VAR	Unknown	FAM

Dejar en blanco el resto de las casillas que no se describen.

6.5.4 Instrumento LightCycler® Nano

Introducir, como se describe a continuación, la descripción de **Control Positivo** y opcionalmente **Estándares de Genotipado** en la ventana de “Samples”; introducir el nombre y seleccionar *Dye* en la ventana “Target”:

Samples:

Color	Name	Note
	NTC	
	HT	
	ANC	
	VAR	

Target:

Color	Name	Dye	Reference
	channel 530	FAM	

Well as table

Pos	#	Note	Sample	FAM	Type
A1	1		NTC	channel 530	U
A2	2		HT	channel 530	U
A3	3		ANC	channel 530	U
A4	4		VAR	channel 530	U

7. Análisis e interpretación de los datos

7.1 Límites e interferencias

El presente ensayo es específico para ADN de IL28B T-3176C.
No se conocen interferencias.

7.2 Calibración

La calibración se tiene que realizar siguiendo los procedimientos descritos en 6.5, 7.3.1, 7.3.2 and 7.3.3.

7.3 Control de calidad – Criterios de aceptación

Con el fin de realizar un análisis fiable de genotipificación, es esencial que el Control Negativo **NTC** y Control Positivo **HT** sean incluidos en cada ejecución.

NOTA: El test se lleva a cabo a una temperatura de *annealing* de 60°C; a esta temperatura la sonda sensor no se unirá al amplicón muy fuertemente y la amplificación puede parecer ineficaz o incluso inexistente. Por esta razón, los criterios de aceptación de los resultados de los análisis están basados solamente en la definición de los patrones de la curva de *melting* como se describe a continuación.

7.3.1 Control Negativo

NTC Control Negativo (Obligatorio - posición 1).

El análisis de la curva de *Melting* del NTC siempre debe proporcionar un resultado negativo: **Ningún pico de melting debe ser detectado** (véase 7.6).

En caso de que el **NTC** reportara uno o dos picos específicos (comparar la señal con los resultados de las muestras para evitar que el software amplíe el ruido de fondo a tamaño de ventana lo que sugiere la presencia de picos de *melting*), una contaminación o un error en el pipeteo ha ocurrido; la sesión no es válida y el proceso debe ser repetido. Si el problema persiste, cambiar el agua y/o los reactivos y repetir. No dude en pedir ayuda a service@tib-molbiol.de

En caso de que un pico es detectado a una temperatura inespecífica (véase párrafo 7.3.5), el software podría identificarlo incorrectamente como positivo, causando la imposibilidad del genotipado automático (en particular en software 1.5 del LightCycler® 480 reporta: “*Sample NTC in position A1 is a negative control not in the negative group*”).

En este caso, para poder usar el genotipado automático la muestra NTC debe ser colocada como “Unknown” en lugar de “Negative Control” (Véase 6.5); alternativamente, los resultados deben ser leídos de las temperaturas de *melting* (Véase 7.7.).

7.3.2 Control Positivo de ADN

HT Control Positivo (Obligatorio - posición 2).

El análisis de la curva de *Melting* debe mostrar dos picos.

HT está representando una muestra clínica **heterocigoto**.

Véase **7.7. Interpretación de los resultados** para la temperatura de *melting* esperada.

7.3.3 Estándares de Genotipado

ANC Estándar de Genotipado (Opcional – posición 3).

El análisis de la curva de *Melting* debe mostrar siempre un único pico.

ANC está representando una muestra clínica homocigoto **Salvaje**.

VAR Estándar de Genotipado (Opcional – posición 4).

El análisis de la curva de *Melting* debe mostrar siempre un único pico.

VAR está representando una muestra clínica homocigota **Mutante**.

Véase **7.7. Interpretación de los resultados** para la temperatura de *melting* esperada.

7.3.4 Muestras

Los resultados del presente ensayo siempre deben mostrar uno o dos picos de *melting*.

No se esperan más de dos picos por muestra.

Los perfiles de los picos de *melting* deben ser conformes a los criterios de aceptación descritos en el presente capítulo y en **7.7. interpretación de los resultados**.



Antes de repetir una prueba, considere los errores comunes; verifique en particular el perfil de amplificación, la mezcla maestra correcta y la concentración de MgCl₂ utilizado, y tenga en cuenta que también el almacenamiento inadecuado de reactivos puede causar una falla del dispositivo



7.3.5 Curvas de *Melting* anómalas

La curva de *melting* anormal puede deberse a una preparación incorrecta de la muestra, a un defecto en el producto o a una variante debajo de la región de unión de la sonda. El procedimiento completo debe repetirse (preparación, amplificación y detección de muestras). Si persiste una curva de *melting* anormal, se debe usar otro método para identificar la secuencia. Enviar el fragmento de PCR para la secuenciación del ADN para confirmar la secuencia o identificar cualquier mutación desconocida.

Reportar desviaciones a service@tib-molbiol.de

Siéntase libre de enviar muestras que presenten una desviación en la curva de *melting* a los laboratorios de TIB MOLBIOL en Berlín, para confirmar los resultados obtenidos y/o identificar otras mutaciones por secuenciación de ADN.

El ejemplo de variantes conocidas se describe en el párrafo **7.8.2** Variantes raras.

7.4 Salvado de Estándares de Genotipado Externos



(No aplicable para LC1.x versiones de software anteriores a 4.0, LightCycler® 96 y para el Instrumento LightCycler® Nano).

Tras el análisis de los genotipos, si las muestras 1 a 4 cumplen con los criterios de aceptación (véase **7.3**), salvar los estándares de genotipado como se explica a continuación y usar el estándar externo en todas las ejecuciones sucesivas.

7.4.1 Instrumentos de Capilares

En la ventana “Melting Curve analysis- Genotyping” abrir el menú “Standard (Int)” y seleccionar “Save standards as External”.

7.4.2 Instrumentos LightCycler®480

En la ventana de análisis “Melt Curve Genotyping” abrir el menú “Standards (In-run)” y seleccionar “Save as ext.”

7.5 Lectura de los resultados

Los picos de la curva de *melting* discriminan entre los tipos salvajes, los genotipos mutantes y heterocigotos.

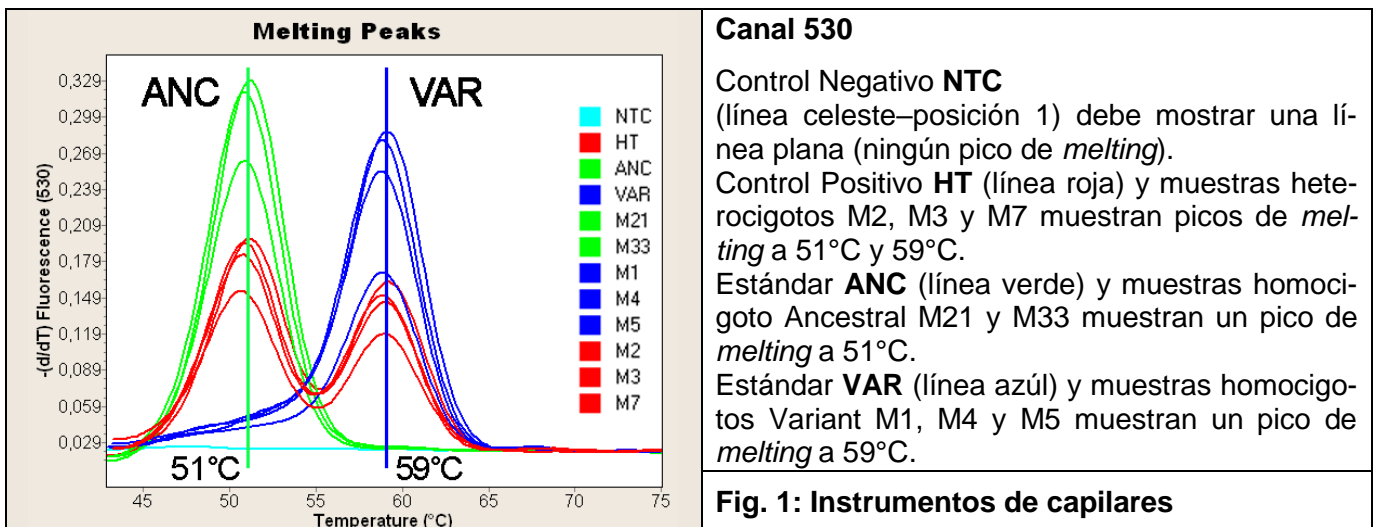
El uso del módulo de genotipado presente en el software LightCycler® 2.0 y LightCycler® 480 es opcional;

En caso de fallo del módulo automático de genotipado (score <0.6 or res<0.4), cambiar a la identificación manual de la curva de *melting* (*Tm calling*) y comparar los resultados con la tabla anterior o usar la tabla 11 del capítulo 7.7. **Interpretación de los Resultados.**



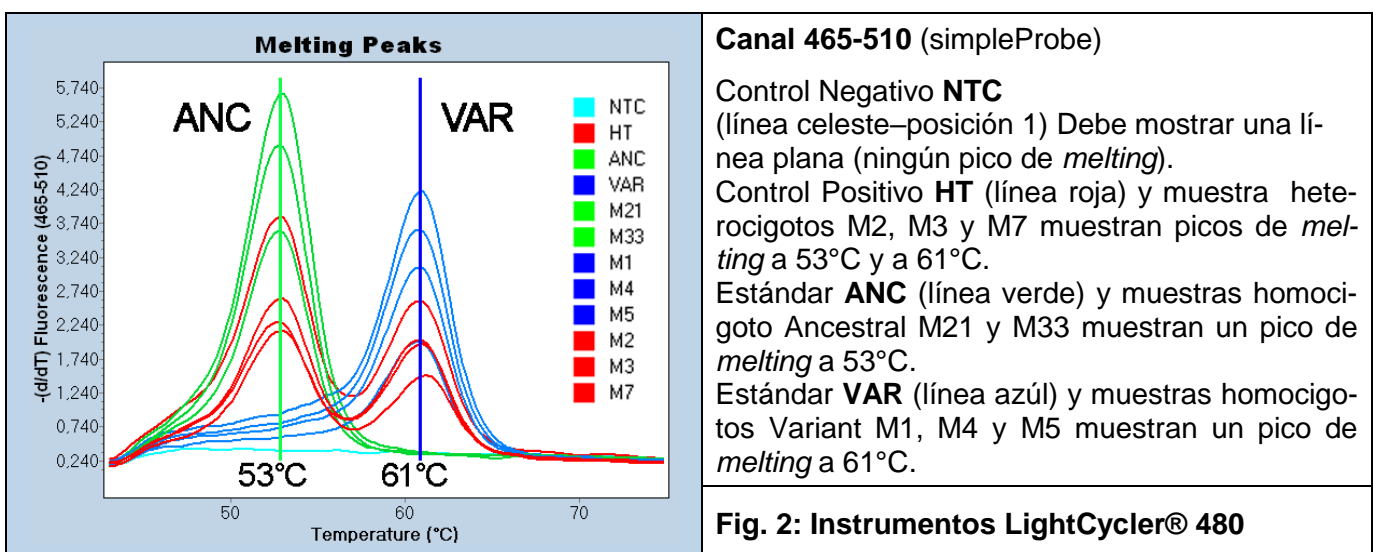
7.5.1. Análisis de *Melting*: Instrumentos de Capilares

Ver datos de *Melting* en el canal 530 (canal F1 para LC1.x, software versión 3.5.3)



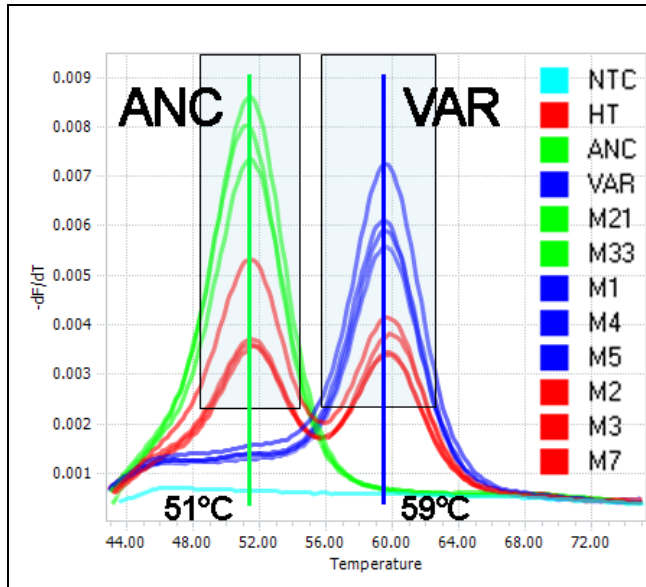
7.5.2. Análisis de *Melting*: Instrumentos LightCycler® 480

Ver los datos de *melting* en el canal SimpleProbe.



7.5.3. Análisis de Melting: Instrumento LightCycler® 96

Agregar un Análisis: **Tm Calling**
 Visualizar los datos en: **Melting peak**
 Seleccionar picos usando el: **Area marker tool**



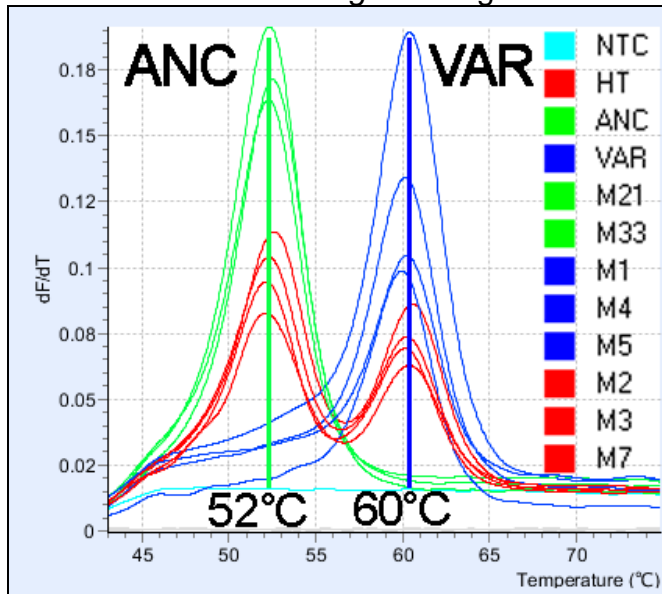
Canal FAM

Control Negativo **NTC** (línea celeste–posición 1) Debe mostrar una línea plana (ningún pico de *melting*).
 Control Positivo **HT** (línea roja) y muestras heterocigotos M2, M3 y M7 muestran picos de *melting* a 51°C y 59°C.
 Estándar Genotipado **VAR** (línea azul) muestra un pico de *melting* a 59°C como las muestras Variante (M1, M4, y M5).
 Estándar Genotipado **ANC** (línea verde) muestra un pico de *melting* a 51°C como las muestras Ancestral (M21 y M33).

Fig. 3: Instrumento LightCycler® 96

7.5.4. Análisis de Melting: Instrumento LightCycler® Nano

Ver los datos de *melting* de la siguiente manera:



Canal 530

Control Negativo **NTC** (línea celeste–posición 1) Debe mostrar una línea plana (ningún pico de *melting*).
 Control Positivo **HT** (línea roja) y muestras heterocigotos M2, M3 y M7 muestran picos de *melting* a 52°C y 60°C.
 Estándar Genotipado **ANC** (línea verde) muestra un pico de *melting* a 51°C como las muestras Ancestral (M21 y M33) 52°C.
 Estándar Genotipado **VAR** (línea azul) muestra un pico de *melting* a 59°C como las muestras Variante (M1, M4, y M5) 60°C.

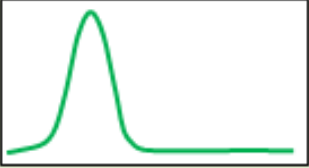
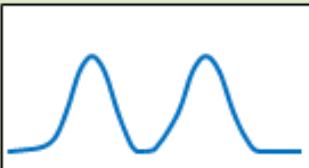
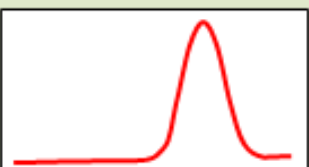
Fig. 4: Instrumento LightCycler® Nano

7.6. Temperatura de *melting* esperada

Genotipo:	Homocigoto ancestral <i>IL28B</i> T-3176	heterocigoto <i>IL28B</i> T-3176C	Homocigoto Variante <i>IL28B</i> -3176C
Número de picos de <i>melting</i>	1	2	1
Temperatura de <i>melting</i> de los picos	51-53°C	51-53°C y 59-61°C	59-61°C
Diferencia de temperatura entre los picos	---	8°C	---
Fenotipo	Sin efecto	Sin efecto	Efecto en terapia

Tab. 7. Resultados típicos de análisis

7.7 Interpretación de los Resultados

IL28B T-3176C Canal 530 Pico(s) de <i>Melting</i>		Genotipos IL28B	Metabolizadores Fenotipo
-3176C	T-3176		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Homocigoto Ancestral <i>IL28B</i> T-3176	Sin efecto
51-53	-		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Heterocigoto <i>IL28B</i> T-3176C	Sin efecto
51-53	59-61		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Variante Homocigoto <i>IL28B</i> -3176C	Mayor probabilidad de auto-supresión del virus y más probabilidades de responder a la terapia
-	59-61		
ΔTm 8°C		Tab. 8. Resultados típicos de análisis	



Variaciones permitidas de las temperaturas de *melting*

±0.5°C	entre muestras del mismo genotipo
±1.5°C	entre genotipado estándar y muestras biológicas
±1.5°C	De ΔT entre los picos de <i>melting</i> de muestras heterocigotas
±1.5°C	entre los picos de <i>melting</i> con el mismo genotipo entre ejecuciones
±5.0°C	entre las temperaturas reportadas en la tabla y los valores obtenidos por los instrumentos locales. Esta variación depende del instrumento: siempre haga referencia a la temperatura obtenida con el control positivo HT incluido en la ejecución.

7.8. Información adicional

7.8.1 Datos típicos para la amplificación

Las curvas de amplificación no contienen ninguna información analítica (véase sección **7.3 Control de Calidad – Criterio de Aceptación**), pero, sin embargo, un ejemplo del LightCycler® 2.0 se representa a continuación (Fig. 5).

Ver los datos de amplificación que se muestran a continuación:

Instrumento LC 2.0 (o LC1.x with software versión 4.1):

Ver la amplificación de la IL28B T-3176C en el canal 530, modo de análisis “Absolute Quantification”.

Instrumentos LC 480:

Ver los datos de amplificación modo análisis “Abs Quant/2nd Derivative Max”.

Para aplicar en el instrumento LightCycler® 480 seleccionar el canal 483-533.

Para aplicar en el instrumento LightCycler® 480 II seleccionar el canal 465-510.

Para aplicar en el analizador cobas z 480 seleccionar el canal 465-510.

Instrumento LC 96:

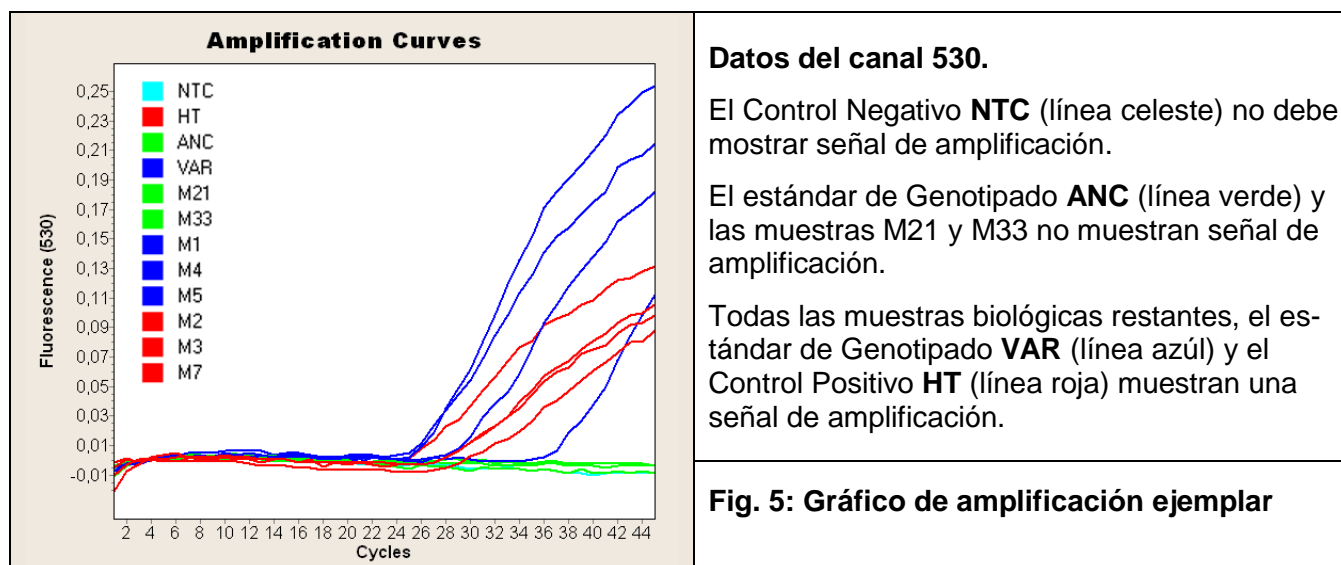
Ver la amplificación en modo “Abs Quant”.

Instrumento LC Nano:

Ver la amplificación en modo “Automatic Quantification”.

LC1.x, software versión 3.5:

Ver la amplificación en el canal de fluorescencia F1 modo “Quantification – Second Derivative Maximum”.



7.8.2. Variantes raras

Las secuencias utilizadas en este dispositivo están diseñadas para evitar interferir con otras variantes genéticas conocidas; las nuevas variantes generalmente generarán un pico de T_m diferente que ANC o VAR. Para demostrar la capacidad del ensayo para discriminar el genotipo correcto, se utilizan *targets* sintéticos para imitar todas las variantes notificadas en GeneBank (enero de 2015). Los valores absolutos de T_m obtenidos con *targets* sintéticos pueden diferir de los que resultan de muestras biológicas, mientras que **el ΔT_m relativo debe permanecer constante.**

El presente kit no está destinado a identificar variaciones distintas a las especificadas en la sección 1.2. **Uso previsto.** Se debe utilizar otro método para la identificación de secuencias que presenten picos de *melting* anormales (véanse 7.3.5 y 7.7).

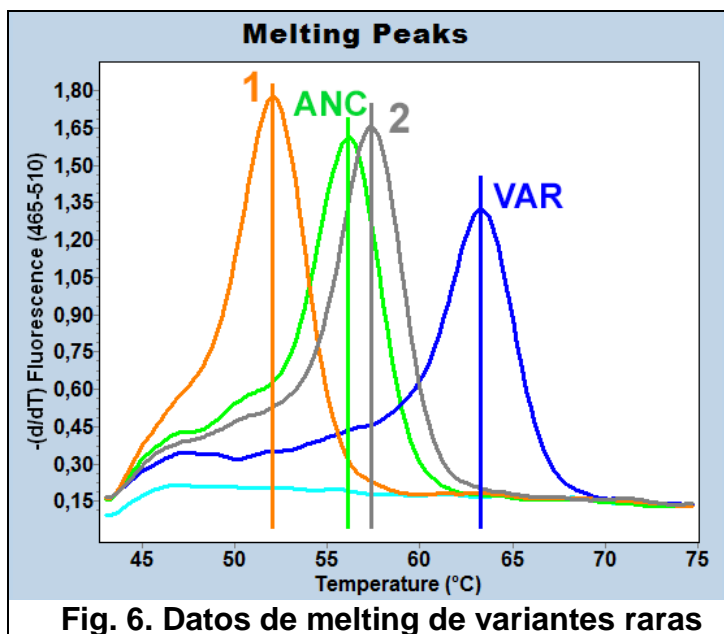


Fig. 6. Datos de melting de variantes raras

#	RS	TM	HGVS	MAF
ANC		56°C		
VAR	rs12979860	64°C	NM_001276254.2:c.151-152G>A	T=0.3558/1782
1	rs574801123	52°C	NM_001276254.2:c.151-151C>T	A=0.0006/3
2	rs370843740	57°C	NR_074079.1:n.429-159C>A	NA

MAF= Recuento de alelos menores (Frecuencia de la variante); NA= No disponible

8. Solución de problemas

Instrumentos	Instrumentos Capilares	Instrumentos LightCycler® 480
Códigos específicos:	LightCycler® Nano	Instrumento LightCycler® 96
Problema	Posible Razón	Solución
No se detectan las muestras	No se ha centrifugado	Centrifugar los capilares
Todas la PCRs negativas	Incorrecta selección del canal de detección	Seleccione el canal correcto antes de analizar
	Protocolo de amplificación Incorrecto	Controlar el programa del instrumento
Línea de base no homogénea entre varias muestras	Pipeteado incorrecto	Garantizar la homogeneidad de la cantidad de la mezcla en cada muestra
	No se realizó mezcla de reacción homogénea	Pipetear la mezcla de reacción arriba y abajo 10 veces con una punta limpia de 200µl antes de la distribución en el recipiente de reacción
	placa mal sellada	Asegurarse que la placa esté bien sellada
Línea de base "como dientes de sierra"	Burbuja en el pocillo	Centrifugar la placa antes de la ejecución
	Burbuja en el pocillo	Centrifugar la placa antes de la ejecución
	Posicionamiento incorrecto de los capilares en el carrusel	Presione firmemente los capilares en el carrusel
Sin señal en el Control Positivo	Error al configurar el instrumento	Controlar que la posición del Control Positivo sea la correcta
	Concentración incorrecta del PSR / MgCl ₂	Repetir el ensayo
	Degradación del Control Positivo o estándar	Usar una nueva alícuota del Control Positivo o estándar
Señal Positiva en el Control Negativo NTC	Error al configurar el instrumento	Controlar los ajustes de posición del control negativo
	Error de dispensación	Cumplir con la hoja de trabajo al dispensar muestras, Controles Negativos, Controles Positivos y estándares
	Error de dispensación	Siempre cambie puntas entre las muestras
	Error de dispensación	Evitar que se derrame el contenido del tubo de ensayo de la muestra
	Contaminación del agua grado-PCR.	Usar una nueva alícuota del agua grado-PCR
	Contaminación de la mezcla de reacción	Usar nuevas alícuotas de los reactivos para preparar la mezcla de reacción
	Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación	Limpier las superficies e instrumentos con detergentes acuosos, lavar batas de laboratorio, reemplazar tubos de ensayo y puntas en uso
	Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación	Agregar LightCycler® Uracil-DNA Glycosylasa (Cat.-No.03 539 806 001) a la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones
No hay señal en las muestras	Baja cantidad de ADN	Controlar la concentración de ADN
	Inhibición de las muestras	Diluir la muestra y repetir la PCR, o Repetir la extracción y la PCR, o agregar Control Positivo y repetir
Curva de <i>melting</i> fuera del rango de temperatura esperada	Picos con TM iguales al Control Positivo: Concentración de reactivo incorrecta	Asignar manualmente los resultados en consecuencia al Control Positivo
	Picos con TM distintas al Control Positivo: Posible inhibidor de extracción	Repetir el ensayo diluyendo el ADN 1:3
	Picos con TM distintas al Control Positivo: Posible mutación diferente	Repetir el ensayo por secuenciación y reportar la variante inesperada a service@tib-molbiol.de

9. Referencias

- 1) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'hUigin D, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M.
Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus.
Nature 2009; 461(7165): 798-801.
- 2) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB.
Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance.
Nature 2009; 461(7262): 399-401
- 3) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan M, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J
Hepatitis C Study. 14 IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- and ribavirin therapy.
Nat. Genetics 2009; 41: 1100-4
- 4) Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study; Swiss HIV Cohort Study.
Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study.
Gastroenterology. 2010 Apr;138(4):1338-45, 1345.e1-7.
- 5) Langhans et al.
Interferon-lambda serum levels in hepatitis C.
Journal of Hepatology 2011 vol. 54 j 859–865
- 6) Lutz, P., Wasmutz, J.-C., Nischalke, H.-D., Vidovic N., Grünhagei F., Lammert F., Oldenburg J., Rockstroh JK., Sauerbruch T. and Spengler, U.
Progression of liver fibrosis in HIV/HCV genotype 1 co-infected patients is related to the T allele of the rs12979860 polymorphism of the IL28B gene
European Journal of Medical Research 2011, 16:335-341
- 7) Nattermann J, Vogel M, Nischalke HD, Danta M, Mauss S, Stellbrink HJ, Baumgarten A, Mayr C, Bruno R, Tural C, Klausen G, Clotet B, Naumann U, Lutz T, Rausch M, Schewe K, Bienek B, Haerter G, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U.
Genetic Variation in IL28B and Treatment-induced Clearance of Hepatitis C Virus in HIV-Positive Patients With Acute and Chronic Hepatitis C.
J Infect Dis. 2011 Mar 1;203(5):595-601
- 8) Ujhelyi et al.
Interleukin 28B polymorphism as pre-treatment predictor for treatment-induced and spontaneous viral clearance in Romany and non-Romany HCV-infected Hungarian patients.
ISMD Congress 2012 Graz
- 9) Frias
Medicina personalizada en la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) – Polimorfismos de los Genes IL28B (Interferón Lambda 3) e ITPA (Inosín Trifosfatasa): Nuevos marcadores para el estudio y seguimiento del tratamiento de la infección crónica. (2012)

Clasificación / Referencia

Referencia	Clasificación
EDMA	16 01 01 90 00
CPV	33694000-1
EAN	4260159332056
Roche SAP No.	07023693001

Aviso al comprador – Patentes y Marcas

La compra del presente producto otorga el derecho a utilizarlo con el fin de llevar a cabo la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos para el diagnóstico in-vitro en muestras de origen humano. Ningún tipo de licencia se transfiere a excepción del derecho de uso del presente producto derivado de la compra.

Aparte de las licencias expresamente indicadas, TIB MOLBIOL no garantiza que este kit y/o su uso (s) no infringan los derechos de terceros.

LightCycler®, MagNA Pure® y High Pure® son marcas comerciales registradas propiedad de Roche Diagnostics.

ABI 3730xl Genetic Analyzer y Sequencing Analysis son productos registrados por Applied.

LightMix® es una marca comercial propiedad de TIB MOLBIOL. SimpleProbe®, hybridization probes y LightMix® Kits son producidos bajo licencia de Roche.

Enzima FastStart

FastStart DNA Master HybProbe es incluida en el paquete de TIB MOLBIOL solamente para clientes de Europa Central.

Cuando el presente kit se distribuye a través de Roche Diagnostics o sus distribuidores locales, La FastStart DNA Master HybProbe se suministra separadamente:

Roche Diagnostics Cat.-No. 03 003 248 001 kit para 96 reacciones

Roche Diagnostics Cat.-No. 12 239 272 001 kit para 480 reacciones

Ficha de seguridad

Según la directiva OSHA 29CFR1910.1200, Commonwealth of Australia [NOHSC:1005, 1008 (1999)] y la directivas de la Unión Europea 67/548/EC y 1999/45/EC cualquiera de los productos que no contengan más del 1% de componentes clasificados como peligrosos o carcinogénicos no requieren una ficha de seguridad).

El Producto no es peligroso, tóxico, y no presenta restricciones IATA. El producto no es de origen humano, animal o vegetal. El producto contiene oligonucleótidos sintéticos (primers) y sondas.

Versión Histórica

Notas en rojo: variaciones que requieren cambiar los procesos de laboratorio

Notas en azul: mejoras y cambios en la composición

Versión	Evento	Fecha
V120504	Primera versión (formato <i>Simple Probe</i>)	04-05-2012
V121024	Inclusión del Instrumento LightCycler® 96. Se agregó ajuste de volumen de reacción para los instrumentos LightCycler® 480 (sección 5.3) Especificaciones detalladas para el almacenamiento del PSR (sección 6.4) Instrucciones en caso de fallo del módulo automático de genotipado (7.3.1).	24-10-2012
V130704	MagNa Pure 96 y MagNa Pure Compact incluidos. Instrucciones en caso de fallo del módulo automático de genotipado (7.5.2)	04-07-2013
V141125	Modificación del formato de detección de LC96	21-11-2014
V160101	Incluida sección "7.8 Additional Information". Incluidos códigos HGVS (7.8.2).	01-01-2016

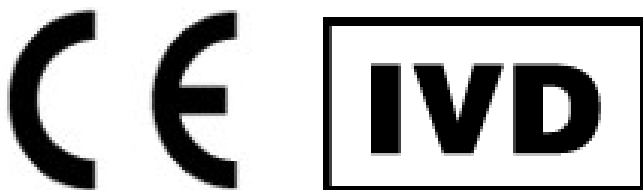
Producido por:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH

Eresburgstrasse 22-23

12103 Berlín, Alemania

www.tib-molbiol.com



4260159331653