



## 1. Utilisation

Le CAH RealFast™ CNV Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter les variabilités du nombre de copies du gène *CYP21A2* (anglais: copy number variation, CNV). Les délétions partielles ou complètes du gène *CYP21A2* sont une cause connue d'un métabolisme perturbé des stéroïdes. Ce kit permet d'identifier les patients atteints d'une hyperplasie surrénale congénitale (HSC; anglais: congenital adrenal hyperplasia, CAH) et devrait être utilisé conjointement avec le CAH StripAssay® ou un séquençage ADN. Ce test semi-quantitatif permet de différencier entre délétions, duplications, un nombre normal de copies dans l'extrait d'ADN génomique humain. Séquence de référence: HGVS: NG\_007941.2

## 2. Introduction

Le HSC est un trouble autosomique récessif des surrénales (incidence 1:10,000-15,000), causé dans 95% des cas par une déficience génétique dans le gène hydroxylase *CYP21A2* stéroïde 21. Le manque résultant de cortisol et d'aldostérone mène finalement à un excès d'androgènes. Le large spectre des manifestations cliniques inclut des formes classiques et non-classiques de HSC (perte de sel, virilisation). Les anomalies sous-jacentes au sein du gène *CYP21A2* sont les (1) mutations de points, (2) les petites délétions/conversions de gènes, (3) les réarrangements chromosomiques comme des délétions complètes du gène *CYP21A2*, des duplications ou des gènes chimériques *CYP21A1P/CYP21A2*. En Europe de 27% à 39% des allèles mutés sont de grandes délétions incluant les chimères *CYP21A1P/CYP21A2* et sont liées la plupart du temps à des formes des plus sévères de la maladie.

## 3. Composants du kit

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial	<input type="checkbox"/>	couvercle blanc	1000 µl
CAH CNV Assay Mix	1 vial	<input type="checkbox"/>	couvercle violet	550 µl
CAH CNV Calibrator	1 vial	<input type="checkbox"/>	couvercle vert	75 µl

Le RealFast™ 2x Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymérase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le CAH CNV Assay Mix se compose de primers géno-spécifiques *CYP21A2* tout comme de deux sondes d'hydrolyse spécifique d'allèle munie d'un double marqueur et d'un gène témoin endogène (EC). Le kit renferme en plus un CAH CNV Calibrator représentant l'état normal de deux copies intactes du *CYP21A2*.

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

## 4. Stockage et stabilité

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

## 5. Description du produit

### 5.1. Principe du test

Le test repose sur un test fluorogène à la nucléase 5', connu aussi sous le nom de TaqMan® assay. Chaque réaction contient une paire de primers géno-spécifiques pour amplifier un fragment de *CYP21A2* de chacun 141 bp et un fragment du gène témoin endogène (EC) de 141 bp, ainsi que deux sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques (la sonde **marquée FAM CYP21A2** et la sonde de **contrôle EC marquée HEX**), qui s'hybrident à la séquence cible du fragment amplifié. La proximité directe entre les indicateurs fluorescents 5' et les colorants 3' inhibe la fluorescence sur la sonde intacte. 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. Le CAH RealFast™ CNV Assay est un test de quantification relative et compare le nombre de séquences cibles d'acide nucléique (*CYP21A2* and EC) par rapport au CAH CNV Calibrator. Le gène témoin EC est utilisé pour normaliser la fluorescence entre les différents échantillons et sert de contrôle positif à la PCR.

### 5.2. Compatibilité avec les appareils de la PCR en temps réel

Le CAH RealFast™ CNV Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast.

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

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

» **Remarque:** RealFast™ CNV QuickGuides pour la programmation et l'exploitation des RealFast™ Assays sur différents types d'appareils peuvent être téléchargées à partir de: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

Si vous utilisez le AB 7500 Fast, le StepOne™ ou le Mx3005P, il faut mettre le colorant de référence passif sur "ROX" ! «

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

### 5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 107 allèles qui ont été testées positives à la délétion / duplication *CYP21A2* à partir d'un test de référence. Le test CAH RealFast™ CNV a typé positives 107 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La **spécificité** a été déterminée à partir de 435 allèles, qui ont été testées négatives à la délétion / duplication *CYP21A2* à partir d'un test de référence. Le test CAH RealFast™ CNV a typé négatives 435 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 to 20 ng/µl ADN génomique.

## 6. Matériel nécessaire, mais non fourni

Appareil de la PCR en temps réel avec des filtres FAM (520 nm) et HEX (556 nm), tubes PCR optiques compatibles avec l'appareil, gants non-poudrés à usage unique, vortexer, minicentrifugeuse pour des tubes de 2.0 ml, racks pour tubes, set de micropipettes calibrées (0.5 – 1000 µl), des pointes de pipettes stériles avec des filtres aérosol, eau ultrapure, système d'extraction d'ADN, réfrigérateur et congélateur, contenant pour déchets biomédicaux.

## 7. Procédure

### 7.1. Extraction de l'ADN

Les réactifs d'extraction d'ADN ne sont **pas inclus** dans le kit. L'ADN isolé à partir de différents échantillons (par ex. sang total, gouttes de sang séché) 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. No Template Control

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.

## 7.3 CAH CNV Calibrator

Incluez **toujours** le CAH CNV **Calibrator**. Le calibre (aussi « échantillon de référence » ou de « contrôle ») doit être défini dans le logiciel de la PCR en temps réel.

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

## 7.4. Repliques

Afin d'obtenir la précision souhaitée, il est nécessaire d'effectuer le NTC, tous les échantillons et le calibre en **trois exemplaires**.

## 7.5. Préparation du Master Mix:

Centrifugez toutes les solutions après les avoir mélangées avec précaution. La réalisation de la PCR s'effectue à température ambiante. Préparez suffisamment de **Master Mix** pour l'ensemble des amorces PCR prévues (3 x N échantillons + 3 x calibre + 3 x NTC), comptez quatre à six réactions supplémentaires pour compenser une imprécision de pipetage:

Composant	par réaction	Par ex. 36 réactions
2x RealFast™ Probe Mix	10 µl	360 µl
CAH CNV Assay Mix	5 µl	180 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>540 µl</b>

## 7.6. Préparation des réactions en triple exemplaire:

Préparez les réactions pour le NTC, tous les échantillons et le CAH CNV Calibrator. Pipetez les volumes indiqués ci-dessous de Master Mix et d'échantillons dans des godets de taille appropriée:

Tube	Volume du Master Mix	Nom de l'échantillon	Volume de l'échantillon
1	49.5 µl	NTC	16.5 µl
2	49.5 µl	Sample	16.5 µl
3	49.5 µl	Calibrator	16.5 µl

Mélanguez et centrifugez les tubes brièvement. Effectuez vos réactions en **triple exemplaire** et ajoutez **20 µl** dans les récipients appropriés de la plaque de réaction. Pour minimiser les risques de contamination, pipetez les échantillons dans cet ordre: premièrement NTC, ensuite vos échantillons, et finalement le CAH CNV Calibrator. 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 brièvement si nécessaire. »

## 7.7. Programme de la PCR

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

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

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	10 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> dans le canal FAM et HEX

**Rotor-Gene 6000®:**

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	10 min	Dénaturation initiale
	95°C	15 sec	Dénaturation
40	36-well rotor: 56°C	1 min	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> dans le canal Green et Yellow
	72-well rotor: 60°C		

## 8. Analyse des données / interprétation des résultats

La **variabilité du nombre de copies (CNV)** de chaque échantillon est déterminée en calculant la quantité relative de **CYP21A2 (canal-FAM)** au moyen de la normalisation par le contrôle endogène **EC (canal-HEX)** et en comparant ensuite au CAH CNV **Calibrator**. La plupart des programmes d'évaluation PCR en temps réel représentent automatiquement les données issues des deux canaux sous forme de graphique servant normalement à la quantification relative lors d'expériences sur l'expression génétique. Le calibre est mis sur un et les échantillons normaux auront des quantités relatives proches de un, tandis que les duplications apparaissent dans des valeurs bien plus élevées et les délétions (tout comme la plupart des gènes chimériques CYP21A1P/CYP21A2) dans des valeurs bien plus basses. En raison d'éventuelles erreurs de mesure il est recommandé de répéter les réactions qui ont des quantités relatives proches du minimum et du maximum ( $\pm 0.05$ ) pour les échantillons normaux. Vous trouverez ci-dessous une liste avec la terminologie spécifique à chaque appareil, le réglage du seuil (Cq) et la plage de mesure par rapport au statut CNV.

« **Remarque:** La délétion 8bp en exon 3 (c.329\_336del GAGACTAC) mène au même résultat qu'une délétion complète CYP21A2 ou la plupart des gènes chimérique CYP21A1P/CYP21A2. Seules les chimères CYP21A1P/CYP21A2 qui n'incluent pas la délétion 8bp, apparaîtront normales.

Les délétions homozygotes tout comme les gènes chimériques homozygotes et les délétions 8bp provoquent une défaillance du signal pour CYP21A2. On peut seulement détecter un signal pour le contrôle endogène (EC). »

Machines PCR en temps réel	Seuil	Quantités relatives			Terminologie
		Délétion	Normal	Duplication	
AB 7500 Fast, StepOne™	0.1	< 0.61	0.61 – 1.24	> 1.24	Relative Quantities (RQ)
CFX96™ (Bio-Rad)	automatique	< 0.69	0.69 – 1.19	> 1.19	Relative Normalized Expression
LightCycler® 480 (Roche)	---	< 0.66	0.66 – 1.09	> 1.09	Normalized Ratio (Advanced Rel Quant)
Mx3005P (Agilent Technol.)	0.2	< 0.74	0.74 – 1.27	> 1.27	Rel. Quant. to Cal. (dRn)
Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)	0.05	< 0.63	0.63 – 1.20	> 1.20	Relative Concentration

## 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 ou de composants de kit périmés.