

DiabeGen - 1° step

Per uso diagnostico in vitro

Destinazione d'uso e campo di applicazione

Kit di biologia molecolare per la predisposizione al diabete mellito di tipo I, o diabete mellito insulino-dipendente, su DNA estratto da sangue periferico, mediante amplificazione in Real Time PCR degli alleli HLA di classe II specifici per questa condizione. Il kit non deve essere utilizzato per tipizzazione tissutale.

Principio del metodo

Il diabete di tipo I è una malattia multifatoriale complessa, ed è la forma più comune di diabete fra i bambini e i giovani adulti nella popolazione Caucasica, dove la prevalenza è dello 0,4% [1]. Tale incidenza varia geograficamente e in base all'età: in Cina e Venezuela è di 0,1/100.000 casi fino ad arrivare a 36/100.000 casi in Sardegna e in Finlandia [1]. La malattia è caratterizzata dalla subtotale (>80%) alla totale distruzione delle cellule β delle isole del pancreas causata da una insulte linfocitica (auto-anticorpi) [2].

Sebbene più di 40 loci genici [3] sono stati associati al diabete mellito di tipo I, la regione HLA, con i suoi numerosi geni e con il loro estremo polimorfismo, contribuisce dal 30 fino al 50% alla suscettibilità genetica di questa patologia [4, 5].

La più alta probabilità di sviluppare il diabete mellito di tipo I è determinata dalla presenza in eterozigosi dei seguenti aplotipi: DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02 e DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02, conosciuti serologicamente come DR4-DQ8 e DR3-DQ2 [2, 4-7], seguono gli omozigoti DR4-DQ8 e infine gli omozigoti DR3-DQ2.

Il rischio stimato di sviluppare il diabete di tipo I nella popolazione generale in bambini che hanno il genotipo HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 è pressoché di 1 caso su 20, tale condizione passa a 1 caso su 5 se nella famiglia esistono altri casi di diabete di tipo I [5].

Sebbene il genotipo DR4-DQ8/DR3-DQ2 conferisca il rischio più alto nella predisposizione al diabete mellito di tipo I, esiste una stratificazione del rischio associata ai genotipi HLA DR/DQ la cui presenza determina un aumentato rischio, un rischio intermedio o un'assenza del rischio (protezione).

È noto, infatti, come nella popolazione Caucasica esista una scala gerarchica nella stratificazione del rischio per il diabete di tipo I influenzata in primo luogo dalle varianti alleliche dell'allele

DRB1*04 quando esso è associato al DQB1*03:02 (DQ8) [8, 9]. Un aumentato rischio nell'insorgere della malattia è associato alla presenza delle varianti alleliche DRB1*04:05 e DRB1*04:01, seguite da un rischio intermedio conferito dalle varianti DRB1*04:02 e DRB1*04:04 [4-6]. Al contrario, la presenza delle varianti DRB1*04:03 oppure DRB1*04:06 conferiscono protezione nei confronti della patologia [8, 10-13]. Per verificare la presenza degli alleli DRB1*04 in alta risoluzione si rimanda al kit DiabeGen - II° step.

In aggiunta alle varianti alleliche DRB1*04, la stratificazione del rischio nello sviluppo del diabete di tipo I è condizionata anche dall'assetto HLA-DQB1. Infatti, è stato dimostrato in diversi studi [4, 9, 14], come la presenza dell'allele DQB1*06:02 può influenzare negativamente la predisposizione al diabete di tipo I anche in presenza degli autoanticorpi associati al diabete di tipo I e/o agli alleli a rischio [15]. Perciò la presenza dell'allele DQB1*06:02 sembra conferire una protezione nei confronti del diabete di tipo I [14, 16], anche quando il soggetto porta sull'altro cromosoma un aplotipo a rischio (DR4-DQ8 o DR3-DQ2).

Il kit DiabeGen - I° step permette di individuare gli alleli coinvolti negli aplotipi predisponenti il diabete mellito di tipo I, ossia il DRB1*04, DRB1*03, DQB1*03:02, DQB1*02 e la presenza dell'allele protettivo DQB1*06:02.

La mix 6, STATO DR4, contiene primer e sonde per l'identificazione di tutti gli alleli DRB1* (DRB1*01, 03, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16) eccetto l'allele DRB1*04.

Questa mix serve per definire lo stato dell'allele DRB1*04 nel soggetto in esame e potrà assieme alla mix 1 dare tre combinazioni:

1. mix 1 e mix 6 positive indicano la presenza nel soggetto in esame dell'allele DRB1*04 in stato di eterozigosi (1 copia su un cromosoma);
2. mix 1 positiva e mix 6 negativa indicano la presenza nel soggetto in esame dell'allele DRB1*04 in stato di omozigosi (2 copie, una per ciascun cromosoma);
3. mix 1 negativa e mix 6 positiva si verificherà per tutti i campioni che non possiedono l'allele DRB1*04 (si veda ad esempio il caso 5 nella tabella "DiabeGen - I° step Profilo Combinazioni");

Il risultato di queste combinazioni di mix serve agli utilizzatori

del kit DiabeGen - I° step, infatti il sistema DiabeGen di Eurospital (DiabeGen - I° e II° step) è in grado di fornire una risposta univoca in termini di alta risoluzione dell'allele DRB1*04 solo se il campione possiede una sola copia di tale allele (DRB1*04 in eterozigosi); quando l'allele è presente su entrambi i cromosomi (DRB1*04 in omozigosi, mix 1 POSITIVA e mix 6 NEGATIVA), per risolvere l'alta risoluzione di entrambi i geni si rimanda ad altra metodica (ad esempio il sequenziamento di DNA).

Strategie preventive

A differenza di altre malattie genetiche legate all'HLA, come ad esempio la malattia celiaca, la conoscenza dell'assetto genico di un soggetto potenzialmente a rischio di diabete non influenza il modo in cui il soggetto viene trattato nei confronti della patologia. Infatti, nel caso della celiachia il medico può decidere o no se è il caso di porre il paziente a dieta senza glutine, per il diabete di tipo I invece non esiste una possibilità analoga, mancando a tutt'oggi le conoscenze mediche e scientifiche che indicano quale sia il fattore o i fattori scatenanti la malattia.

La comunità scientifica si divide in due fronti sull'utilizzo dei marker genetici nella diagnosi del diabete mellito di tipo I. Ad esempio nelle linee guida per l'analisi e la diagnosi del diabete mellito di tipo I pubblicate nel 2011 sulla rivista "Diabetes Care" [17], gli autori affermano che la tipizzazione HLA DR/DQ nel diabete di tipo I può essere utile solo per determinare la presenza di alotipi predisponenti, ritardanti o protettivi verso la patologia in soggetti già positivi per gli autoanticorpi tipici del diabete di tipo I, in quanto alcuni alotipi sono predisponenti, mentre altri ritardano significativamente il manifestarsi della malattia o hanno un effetto protettivo nei suoi confronti. Gli autori sono quindi dell'opinione che il test genetico non debba rientrare nella diagnosi clinica di routine per lo screening del diabete di tipo I. D'altra parte, però numerosi autori sono d'accordo nell'affermare il contrario, ossia che conoscere l'assetto HLA di un soggetto potenzialmente a rischio di diabete I permette, in primo luogo di differenziarlo da altri tipi di diabete quali il Maturity-Onset Diabetes of the Young o MODY e il diabete di tipo II [18] (America Diabetes Association, <http://www.diabetes.org>), in secondo luogo di informare sulla possibilità di come la malattia potrebbe svilupparsi con alte probabilità (1 su 5) in soggetti che hanno già una storia familiare della malattia. Studi fatti su modelli animali [19] hanno evidenziato come sia più facile prevenire l'autoimmunità tipica del diabete di tipo I prima che questa si instauri definitivamente, piuttosto che prevenire la progressione della malattia quando il contesto

autoimmunitario si è già presentato; se questo fosse vero anche nell'uomo, il test genetico qui proposto potrebbe essere un efficace mezzo clinico per individuare i soggetti maggiormente a rischio, bambini e adolescenti, prima del manifestarsi della malattia, potendo così programmare in tempo il loro follow up clinico. In accordo con questa linea di pensiero, una recente pubblicazione [20] afferma come lo screening genetico del diabete di tipo I può evitare sofferenze inutili ai bambini/adolescenti, in quanto solo il 4% dei soggetti arruolati in questo studio clinico, e quindi ad HLA noto, hanno sofferto della tipica chetoacidosi diabetica contro il 15-20% dei bambini diagnosticati nella popolazione generale [20, 21]. Questo aspetto, ossia di come una diagnosi preventiva precoce possa prevenire il ricovero in ospedale per chetoacidosi e preservare almeno in parte le cellule β dei pazienti [22], viene condiviso e riportato anche dagli autori precedentemente menzionati [17], per i quali il test genetico per il diabete I avrebbe un valore moderato.

Descrizione del kit DiabeGen - I° step

Il sistema di rilevamento di DiabeGen I° step prevede una preliminare estrazione e purificazione del DNA da ogni singolo campione. In seguito ogni campione è sottoposto a 7 diverse reazioni di Real Time PCR secondo lo schema riportato nella Tabella 1.

Materiali forniti

(quantità sufficiente per 12 test)

| | |
|---------------------------------|-------------|
| Reagente A | 2 x 0,4 ml |
| Reagente B | 2 x 1,5 ml |
| Strip da 8 provette con mix 1-7 | 2 x 1 strip |
| Tampone TE 1X | 2 x 1,5 ml |

Composizione dei materiali/reagenti forniti

1. Tampone TE 1X

2 fiale da 2 ml, ciascuna contenente 1,5 ml di buffer (Tris/EDTA) per la risospensione dei primer e delle sonde liofile. Pronto all'uso.

2. Reagente A

2 fiale con tappo blu, ciascuna contenente 0,4 ml di Taq Polimerasi per Real Time. Pronto all'uso.

3. Reagente B

2 fiale con tappo verde, ciascuna contenente 1,5 ml di tampone di reazione per la Master Mix. Pronto all'uso.

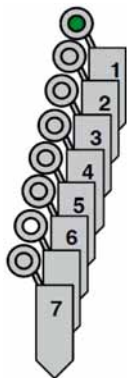
4. Strip con mix di primer e sonde (liofili) per le mix dalla 1 alla 7 (provetta 1 con mix 1 segnata da bollino verde; provetta 7 VUOTA segnata da bollino bianco, vedi Tabella 1).

Le mix dalla 1 alla 5 contengono primer e sonde di diversa specificità che consentono la contemporanea amplificazione di un allele HLA specifico per la predisposizione al diabete di tipo I e di una specifica sequenza genomica codificante per la beta globina umana che funge da controllo interno garantendo l'affidabilità del risultato ottenuto.

La mix 6, STATO DR4, contiene primer e sonde per l'identificazione di tutti gli alleli DRB1* (DRB1*01, 03, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16) eccetto il DRB1*04, e la specifica sequenza genomica codificante per la beta globina umana

ATTENZIONE: la mix 7 contiene i primer per la sola amplificazione della beta globina, e viene usata nel test come **No Template Control (NTC)** per il rilevamento di eventuali contaminazioni da DNA umano nella master mix. Vista la sensibilità del sistema Real Time, e lo schema di esecuzione suggerito nella fig 1, la mix 7 si trova nell'ultima provetta della strip da 8, quindi la settima provetta, marcata con un bollino BIANCO, è vuota.

Tutte le mix si presentano come un pellet liofilo di colore rosa sul fondo della provetta; una volta risospesa la mix si ottiene una soluzione di colore rosato. Ogni strip è sufficiente per l'esecuzione di 6 campioni.



| Tabella 1 Strip con BOLLINO VERDE | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|--|
| Mix | Allele riconosciuto (canale FAM) | Controlli interni di reazione (canale VIC/HEX) |
| 1 bollino verde | DRB1*04 | beta globina |
| 2 | DRB1*03 | beta globina |
| 3 | DQB1*03:02 | beta globina |
| 4 | DQB1*02 | beta globina |
| 5 | DQB1*06:02 | beta globina |
| 6 | STATO DR4 | beta globina |
| bollino Bianco | provetta vuota | |
| 7 | Nessun allele | beta globina |

Strumenti e materiali richiesti ma non forniti

1. Laboratori e attrezzature idonei all'esecuzione di test in Real Time PCR.
2. Provette tipo Eppendorf® sterili da 1,5 ml.

3. Pipette a regolazione variabile da 10, 20, 200, 1000 µl.
4. Pipetta multicanale a 8 puntali a regolazione variabile da 5 a 50 µl.
5. Puntali sterili monouso con filtro, per pipette da 10, 20, 200, 1000 µl.
6. Micropiastre da 96 pozzetti per PCR con tappi di grado ottico o film adesivo per Real Time PCR, o strip da 8 provette per PCR con tappi di grado ottico.
7. Strumento per applicazione film adesivo.
8. Vortex.
9. Centrifuga per provette tipo Eppendorf®.
10. Centrifuga con rotore per micropiastre a 96 pozzetti.
11. Centrifuga con rotore per strip da 8 provette.
12. Termociclatore Real Time.

Criteri di prestazione

Il metodo consente l'identificazione degli alleli riportati nella Tabella 1 che, come indicato in letteratura, sono coinvolti negli aptotipi che conferiscono la predisposizione oppure la protezione nei confronti del diabete mellito di tipo I.

Sensibilità e specificità

Sono stati testati 25 campioni di DNA provenienti da centri di riferimento per HLA. I risultati ottenuti con DiabeGen - I° step hanno evidenziato una sensibilità e specificità, per gli alleli rilevati, del 100%.

Conservazione

Tutti i componenti del kit devono essere conservati a 2 - 8°C.

Stabilità dopo la prima apertura

Le mix di primer e sonde, una volta risospese, sono stabili per 60 giorni se conservate a 2 - 8°C. Gli altri reagenti, se utilizzati con le accortezze riportate nel capitolo "Avvertenze generali", sono stabili fino alla data riportata in etichetta.

Stabilità al trasporto

In uno studio di stabilità accelerata, tutti i componenti del dispositivo sono stabili dopo conservazione a 37°C per 72 ore.

Raccolta dei campioni

Il kit DiabeGen - I° step richiede l'utilizzo di sangue intero raccolto in provette Vacutainer® (es. K3 e Biologia Molecolare) con EDTA. Per la conservazione del campione fare riferimento a quanto indicato dal fabbricante delle provette di raccolta.

Preparazione dei campioni

Il campione è costituito da DNA genomico estratto da sangue intero, anti-coagulato con EDTA. Il DNA può essere estratto usando le più comuni metodiche di estrazione del DNA genomico da sangue intero, in uso nei laboratori di biologia molecolare. Per un risultato ottimale la concentrazione del DNA in ogni campione deve rientrare nell'intervallo compreso tra 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pari a valori di Ct della beta globina umana di 22-25. Il limite di accettabilità del test consente l'utilizzo di 2-5 campioni con Ct della beta globina umana compresi nell'intervallo 21-28. Per $\text{Ct} > 28$ il risultato del test non viene garantito. Nel caso si debba procedere ad una diluizione del campione, utilizzare solo acqua sterile. Il kit DiabeGen - 1° step è stato ottimizzato utilizzando i reagenti di estrazione presenti nel kit Eu-Gen Estrazione® Eurospital (codice 9132). L'impiego di altri kit di estrazione prevede la verifica, da parte del laboratorio, delle relative procedure d'uso riguardo a concentrazione, stabilità e conservabilità del DNA estratto.

Conservazione del campione estratto

Il DNA purificato, se non immediatamente sottoposto ad amplificazione, può generalmente essere conservato a 2 - 8°C per 3 mesi, oppure a -20°C per tempi più lunghi. In questo caso è consigliabile suddividerlo in aliquote in modo da evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti che potrebbero degradarlo. Per le condizioni di stabilità e conservabilità, fare riferimento alle istruzioni contenute nei diversi kit di estrazione.

Il riutilizzo del DNA conservato a 2-8°C per 3 mesi è stato verificato da Eurospital unicamente con i reagenti presenti nel kit Eu-Gen Estrazione® e con l'utilizzo di provette idonee. Non sono disponibili dati sulle prestazioni di DiabeGen - 1° step con campioni di DNA conservati per periodi più lunghi ed estratti con sistemi diversi da quello precedentemente indicato.

Procedimento di Amplificazione del DNA

Risospensione delle mix liofile

1. Prelevare la strip da otto

provette con bollino verde e porla su un supporto per provette (non fornito), posizionando la cerniera delle provette alla vostra sinistra (figura 1); in questo modo il bollino verde si troverà sulla prima provetta in alto (mix 1 per DRB1*04 / beta globina). Ognuna delle provette delle strip contiene materiale per 6 amplificazioni, quindi per 6 campioni.

2. Aprire i tappi delle provette e prelevare da una fiala di Tampone TE 1X (buffer di risospensione) 40 μl ed aggiungerli ad ognuna delle provette contenenti le mix liofile della strip avendo cura di cambiare puntale ogni volta (figura 1); mescolare un paio di volte per risospendere i primer e le sonde liofile contenute in ogni provetta. Ricordarsi che la provetta con il bollino BIANCO è vuota, quindi non va aperta.

3. Accertarsi che tutta la soluzione di primer risospesi si trovi sul fondo della provetta, in caso contrario chiudere i tappi e centrifugare brevemente le strip.

Dispensazione delle mix per l'amplificazione

Con una pipetta multicanale prelevare per ogni campione da analizzare, 5 μl della soluzione di primer e sonde risospesi dalla strip e porli, in colonna, in una piastra da 96 pozzetti (o in strip da 8 pozzetti per Real Time PCR, se si usa tale supporto) come suggerito nella figura 1.

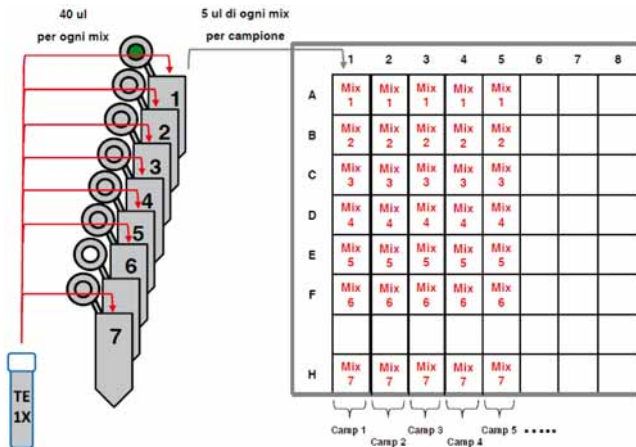


Figura 1

Preparazione della Master Mix

1. A causa dell'elevata viscosità delle soluzioni necessarie per la preparazione della Master Mix, si consiglia di agitare, prima dell'uso, le fiale contenenti i Reagenti A e B e di centrifugarle brevemente per eliminare eventuali gocce presenti sui tappi, quindi di prelevare con molta attenzione i volumi necessari all'allestimento della mix stessa.

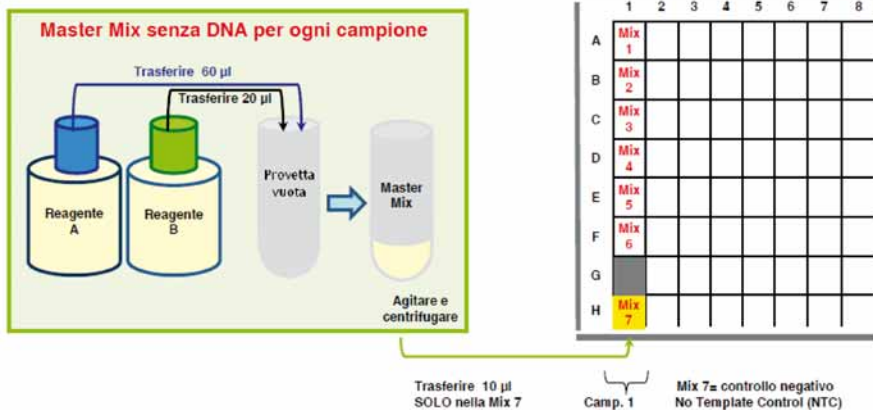
2. Per ogni campione, dispensare in una provetta sterile tipo Eppendorf® 60 μl di Reagente A prelevandoli dalla provetta con il tappo blu e 20 μl di Reagente B prelevandoli dalla provetta con il tappo verde. Agitare e centrifugare brevemente le provette contenenti la Master Mix senza DNA così preparate (figura 2).

3. La metodica permette di analizzare fino a un massimo di 12 campioni per amplificazione.

4. A questo punto, per ogni master mix preparata, prelevare 10 μl della Master Mix e dispensarli nel pozzetto contenente la mix numero 7, che corrisponde al controllo negativo di reazione o No Template Control (NTC), in quanto contiene solamente i primer e la sonda per la beta globina umana (figura 2, box evidenziato in giallo).

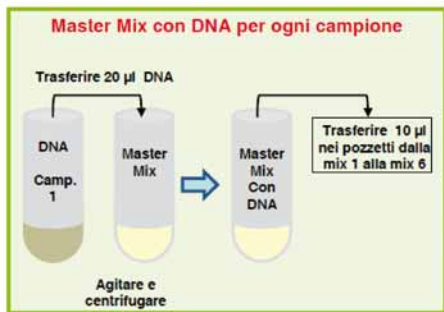
5. Si consiglia di tappare i pozzetti contenenti la mix 7, fino a completamento della dispensazione della piastra per ridurre al minimo il rischio di contaminazioni accidentali (aerosol, ambientali, etc.).

Figura 2



6. Aggiungere quindi alla Master Mix 20 μl del DNA da analizzare. Agitare e centrifugare brevemente le provette così preparate. La Master Mix con il DNA è pronta.

7. Per ogni campione da analizzare, dispensare 10 μl della Master Mix con DNA nei pozzetti contenenti la mix dalla 1 alla 6 (figura 3, box evidenziati in giallo).



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Mix 1 | | | | | | | |
| B | Mix 2 | | | | | | | |
| C | Mix 3 | | | | | | | |
| D | Mix 4 | | | | | | | |
| E | Mix 5 | | | | | | | |
| F | Mix 6 | | | | | | | |
| G | | | | | | | | |
| H | Mix 7 | | | | | | | |

}
Camp. 1

Figura 3

Per mescolare le soluzioni (primer e master con DNA) che potrebbero essere vischiose, a seconda delle possibilità procedere nel seguente modo:

- se muniti di vortex e centrifuga per piastre: chiudere la piastra con il film adesivo sigillando pozzetto per pozzetto con l'apposito strumento (non fornito), vortexare brevemente (5-10 sec), se possibile a bassa velocità, quindi centrifugare brevemente per togliere eventuali bolle e gocce.
- negli altri casi: si consiglia di pipettare ripetutamente con una pipetta multicanale i pozzetti in cui sono stati dispensati i campioni, chiudere la piastra sigillando pozzetto per pozzetto con l'apposito strumento.

Applicare tali metodiche anche quando si usano strip e/o tappi ottici.

Amplificazione mediante Real Time PCR

Con un termociclatore Real Time da 96 pozzetti si potranno analizzare 12 campioni per volta, uno per colonna della piastra; se si usano provette per Real Time PCR in strip da 8 con tappi a grado ottico, si useranno 12 strip, una per ogni campione da analizzare.

Procedura:

1. Avviare il software e seguire le specifiche di programmazione dello strumento che si utilizza. Il kit DiabeGen - 1° step è stato validato sui termociclatori: Applied Biosystem AB7300, AB7500 e 7500 Fast e Bio-Rad CFX96 Touch e

Connect. Ad esempio, su termociclatori Applied Biosystem impostare i *fluorofori* come segue:

| Detector name | Reporter | Quencher | Colour |
|--------------------|----------|----------|--------|
| DiabeGen Allele | FAM | NONE | RED |
| DiabeGen β-globina | VIC * | NONE | BLACK |

Nota: per la mix 7 selezionare solo il fluoroforo VIC*

*La sonda per la rivelazione della beta globina va letta sul canale del VIC se si utilizzano i termociclatori Applied Biosystem, sul canale HEX per le macchine Bio-Rad.

2. Qualora sia previsto, impostare *ROX* come *Passive Reference*.
3. Si ricorda che i pozzetti in cui è stata messa la mix 7 sono usati come NTC quindi evidenziarlo sulla piastra.
4. Impostare il seguente protocollo termico.

| Temperature | Tempo | Cicli |
|-------------|----------------|-------|
| 95°C | 10 min | 1 |
| 95°C | 15 sec | 37 |
| 60°C | 1 min e 30 sec | |

5. Settare la lettura ottica dello strumento sullo step a 60.0°C (box evidenziato in giallo nella tabella sopra riportata).

6. IMPORTANTE per gli utilizzatori di Bio-Rad CFX96 Touch o Connect:
impostare il protocollo termico sopradescritto settando

per ogni step una rampa termica del termociclatore pari a 1,5°C/sec.

7. Impostare il volume di reazione a **15 µl**.

8. Avviare la reazione.

Validazione dei risultati ottenuti

Terminato il protocollo di reazione impostare i seguenti parametri per la lettura dei risultati:

1. selezionare tutta la piastra/tutti i campioni;

2. impostare i seguenti parametri:

| Applied Biosystem 7300, 7500 e 7500 Fast | |
|---|------|
| <i>Baseline: Start cycle-End cycle</i> | 7-17 |
| <i>Threshold DiabeGen Allele FAM</i> | 0,2 |
| <i>Threshold DiabeGen β-globina VIC</i> | |

| Bio-Rad CFX96 Touch e Connect | |
|---|------|
| <i>Baseline: Start cycle-End cycle</i> | 7-17 |
| <i>Threshold DiabeGen Allele FAM</i> | 50 |
| <i>Threshold DiabeGen β-globina HEX</i> | 80 |

3. analizzare la seduta.

Validità del test

Affinché il test sia valido, si dovranno verificare le seguenti condizioni:

1. verificare che per ogni campione analizzato la mix 7, corrispondente al controllo negativo o NTC, sia negativa per il filtro di lettura VIC/HEX (DiabeGen beta globina). Vista la sensibilità del metodo di rilevazione (Real Time PCR) vengono tollerati segnali positivi per $Ct \geq 34$, che possono derivare da contaminazioni ambientali od altri eventi non controllabili; tali segnali non inficiano il risultato del test. Invece la presenza di un segnale di fluorescenza con $Ct < 34$ è indice di un inquinamento significativo dei reagenti e può inficiare il risultato ottenuto con quella Master Mix. In questo caso il test deve essere ripetuto;

2. verificare che per ogni campione tutte le mix dalla 1 alla 6 mostrino un segnale positivo per il filtro di lettura VIC/HEX (DiabeGen beta globina) e che i valori di Ct per ogni mix rientrino nell'intervallo di accettabilità pari a Ct 21-28. La presenza del controllo interno di reazione dato dalla beta globina umana è fondamentale nel caso di amplificazioni di campioni negativi per gli alleli specifici per una data mix. Qualora i Ct ottenuti per la beta globina umana siano superiori al limite imposto di Ct 28, alcuni alleli specifici per il diabete

potrebbero non risultare amplificati, o essere amplificati dopo il limite ritenuto accettabile di 35 cicli. In questo caso si consiglia di ripetere il test aumentando la concentrazione del DNA. Se invece i Ct ottenuti per la beta globina sono inferiori a 21, si consiglia di ripetere il test diluendo il campione di DNA. Si tenga presente che, in via puramente teorica, una diluizione di 10 volte del campione dovrebbe spostare il Ct di 3,3 unità;

3. Valori di Ct per i fluorofori FAM e VIC/HEX minori di 17 non sono possibili e non devono essere presi in considerazione (verificare la component e il profilo di amplificazione)

4. procedere quindi alla lettura, pozzetto per pozzetto, dei valori di Ct per il fluoroforo FAM (DiabeGen Allele). Un valore di Ct compreso fra 18 e 35 indica positività di quel campione per l'allele amplificato nella corrispondente mix.

Interpretazione dei risultati

1. Una volta validato il test secondo le specifiche riportate nel paragrafo "Validità del test", segnare sull'apposito foglio fornito nel kit "DiabeGen - I° step - Tabella Risultati" le positività degli alleli individuate come positività del canale FAM.

2. Confrontare quindi il profilo ottenuto per ciascun campione avvalendosi della tabella "DiabeGen - I° step Profilo Combinazioni" e riportare la combinazione ottenuta nell'ultima colonna del foglio "DiabeGen - I° step - Tabella Risultati".

3. Infine con il foglio "DiabeGen - I° step - Analisi dei risultati per la presenza di alleli predisponenti al diabete mellito di tipo I" associare ad ogni combinazione il risultato corrispondente in termini di presenza di aplotipi predisponenti e/o dell'allele protettivo DQB1*06:02. Nello stesso foglio la colonna "Approfondimenti e Note" segnala gli eventuali test a cui il campione può essere ancora sottoposto nell'ambito della predisposizione al diabete di tipo I (come ad esempio la ricerca dell'alta risoluzione dell'allele DRB1*04 con il kit DiabeGen - II° step).

4. Ad esempio un campione che rientri nella combinazione 1 (Comb. 1), è positivo per gli alleli DRB1*04, DRB1*03, DQB1*03:02, DQB1*02, i quali determinano il genotipo DR4-DQ8/DR3-DQ2 con il più alto rischio di predisposizione al diabete di tipo I. La tabella per questa combinazione indica come risultato la presenza degli alleli predisponenti al diabete di tipo I e l'assenza dell'allele protettivo DQB1*06:02; si consiglia quindi come approfondimento di sottoporre il campione ad analisi con il kit DiabeGen - II° step per verificare la natura dell'allele DRB1*04 in alta risoluzione. Se il soggetto dovesse portare un allele DRB1*04:03 o 04:06 risulterebbe comunque protetto nei confronti della patologia [8, 10, 11], se invece risultasse un DRB1*04:05 mostrerebbe un aumentato rischio nella predisposizione al diabete [6, 8].

Precauzioni

1. Attendere sempre che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima di iniziare il test.
2. Attenersi scrupolosamente alla procedura. In caso di incidente o malessere, chiamare immediatamente un medico e mostrargli il contenitore, l'etichetta e, se possibile, la scheda dati di sicurezza del reagente.
3. Attenzione: a causa della viscosità delle soluzioni è consigliabile per la corretta esecuzione del test mescolare 2-3 volte la Mix di reazione con la pipetta multicanale a 8 puntali, cambiando i puntali per ogni fila.
4. Usare il vortex e la centrifuga per piastre/strip se disponibili.
5. Attenzione: è molto importante non scambiare i componenti di lotti diversi.
6. Utilizzare sempre i doppi guanti nella fase di esecuzione del test. Al primo dubbio di contaminazione con reagenti o campioni, cambiare subito il paio di guanti.
7. Nel caso non si operi sotto cappa, usare sempre la mascherina per evitare la contaminazione delle provette.
8. È consigliabile operare in ambienti distinti e ben delimitati per le fasi di preparazione del campione, dei reagenti e di esecuzione del test, al fine di minimizzare le possibilità di contaminazioni.
9. È inoltre consigliabile analizzare, con il presente sistema, ogni operatore addetto alle analisi di routine per permettere la facile identificazione di un'eventuale fonte di inquinamento.
10. Dopo l'avvenuta amplificazione, eliminare le provette o le piastre contenenti il materiale amplificato senza mai aprirle.
11. Le mix contengono sequenze specifiche di DNA, sostanze la cui pericolosità non è completamente testata.
12. I materiali di scarto generati dall'uso del kit devono essere smaltiti e trattati secondo le norme nazionali e le leggi riguardanti il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. Particolare attenzione deve essere prestata ai rifiuti di laboratorio liquidi generati durante le procedure di estrazione, e altri materiali di scarto (es. puntali usati per i campioni) utilizzati con il kit, che devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti e inattivati prima dello smaltimento. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.

Limiti del test

1. Il kit DiabeGen - 1° step richiede l'utilizzo di sangue intero raccolto in provette Vacutainer® idonee (es. K3 e Biologia

Molecolare) con EDTA. Per la conservazione del campione fare riferimento a quanto indicato dal fabbricante della provetta.

2. Il DiabeGen - 1° step è stato ottimizzato utilizzando i reagenti di estrazione presenti nel kit Eu-Gen Estrazione® Eurospiral® (codice 9132). L'impiego di altri kit di estrazione prevede la verifica, da parte del laboratorio, delle relative procedure d'uso riguardo a stabilità e conservabilità del DNA estratto.
3. È consigliabile utilizzare il DNA immediatamente dopo l'estrazione.
4. Il DNA purificato, se non immediatamente sottoposto ad amplificazione, può essere conservato a 2 - 8°C per tre mesi, oppure a -20°C per tempi più lunghi. In questo caso è consigliabile suddividerlo in aliquote in modo da evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti che potrebbero degradarlo.
5. La concentrazione del DNA in ogni campione deve rientrare nell'intervallo compreso tra 10 e 100 µg/ml.
6. Il kit DiabeGen - 1° step è stato validato sui seguenti termociclatori: AB 7300, AB7500 e 7500 Fast, Bio-Rad CFX96 Touch e Connect.

Avvertenze generali

1. Utilizzare sempre puntali sterili con filtro.
2. Adottare tutte le precauzioni per evitare la contaminazione dei reagenti.
3. Esporre alla luce le mix liofile o risospese solo per il tempo necessario all'allestimento del test.
4. Riporre immediatamente le strip non utilizzate all'interno del sacchetto minigrup di alluminio ed accertarsi della presenza al suo interno del desiccante.
5. Evitare di toccare i puntali con le mani.
6. Indossare sempre guanti di protezione per evitare la contaminazione dei reagenti.
7. Utilizzare solo provette, tappi o fogli adesivi di grado ottico.
8. Evitare di mescolare tra loro componenti di lotti diversi.
9. Il kit DiabeGen - 1° step non deve essere utilizzato per fini diversi da quanto riportato nella "Destinazione d'uso e campo di applicazione" e ribadito nei "Criteri di prestazione".

Troubleshooting

Assenza di segnale

1. Errata impostazione dei filtri di lettura.
2. Errori di dispensazione od omissione di reagenti.
3. Effetti inibitori del campione: processi di estrazione e purificazione del DNA insufficienti.

4. Errata conservazione del kit.
5. Controllare le performance dell'amplificatore.

Falsi positivi

Campioni di DNA estratti, per la maggiore parte mediante metodica con biglie magnetiche, possono in rari casi interferire con i reagenti del kit (Reagente A, master mix). Tali interferenze creano dei segnali di positività sul canale del FAM in pozzetti che dovrebbero risultare negativi, dando un grafico dall'aspetto lineare (anziché un tipico profilo esponenziale atteso per una Real Time PCR positiva); questo grafico intersecando i valori di Threshold dà dei valori di Ct. Nel caso si verifichi questo problema controllare il segnale di fluorescenza grezzo registrato dallo strumento (detto *component* sulle macchine Applied Biosystem), del pozzetto/campione che risulterà alterato per il FAM e per l'eventuale *passive reference* (ROX) utilizzato. Se si verifica questo scenario il risultato è da considerarsi un falso positivo.

Intensità di segnale troppo bassa

1. Deterioramento del sistema di rilevamento dovuto ad errato trattamento e/o conservazione dei reagenti.
2. Concentrazioni molto basse di DNA nel campione da analizzare.
3. Inappropriata risospensione delle mix.
4. Bolle d'aria intrappolate all'interno delle provette di amplificazione.

Bibliografia

1. Karvonen, M., et al., *Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide*. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(10): p. 1516-26.
2. R. Arcari, N.G., A. Lezo, D. Boscolo, P.Cavallo Perin, *Eziopatogenesi del Diabete Mellito di Tipo 1*. Caledoscopio Italiano, 1998.
3. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 2009. **41**(6): p. 703-7.
4. Noble, J.A. and H.A. Erlich, *Genetics of type 1 diabetes*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(1): p. a007732.
5. Steck, A.K. and M.J. Rewers, *Genetics of type 1 diabetes*. *Clin Chem*, 2011. **57**(2): p. 176-85.
6. Pociot, F. and M.F. McDermott, *Genetics of type 1 diabetes mellitus*. *Genes Immun*, 2002. **3**(5): p. 235-49.
7. Rani, R., A. Sood, and R. Goswami, *Molecular basis of predisposition to develop type 1 diabetes mellitus in North Indians*. *Tissue Antigens*, 2004. **64**(2): p. 145-55.
8. Erlich, H., et al., *HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes*

- genetics consortium families*. *Diabetes*, 2008. **57**(4): p. 1084-92.
9. Noble, J.A. and A.M. Valdes, *Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes*. *Curr Diab Rep*, 2011. **11**(6): p. 533-42.
10. Van der Auwera, B., et al., *DRB1*0403 protects against IDDM in Caucasians with the high-risk heterozygous DQA1*0301-DQB1*0302/DQA1*0501-DQB1*0201 genotype*. *Belgian Diabetes Registry*. *Diabetes*, 1995. **44**(5): p. 527-30.
11. Awata, T., et al., *Genetic analysis of HLA class II alleles and susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects*. *Diabetologia*, 1992. **35**(5): p. 419-24.
12. Rewers, A., et al., *Ethnic differences in the associations between the HLA-DRB1*04 subtypes and type 1 diabetes*. *Ann NY Acad Sci*, 2003. **1005**: p. 301-9.
13. Thomson, G., et al., *Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis*. *Tissue Antigens*, 2007. **70**(2): p. 110-27.
14. Nepom, G.T., *A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM*. *Diabetes*, 1990. **39**(10): p. 1153-7.
15. Pugliese, A., et al., *HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM*. *Diabetes*, 1995. **44**(6): p. 608-13.
16. Baisch, J.M., et al., *Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(26): p. 1836-41.
17. Sacks, D.B., et al., *Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(6): p. e61-99.
18. Hitman, G.A., *The message for MODY*. *Diabet Med*, 2011. **28**(9): p. 1009.
19. Atkinson, M.A. and E.H. Leiter, *The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?* *Nat Med*, 1999. **5**(6): p. 601-4.
20. Nanto-Salonen, K., et al., *Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial*. *Lancet*, 2008. **372**(9651): p. 1746-55.
21. Todd, J.A., M. Knip, and C. Mathieu, *Strategies for the prevention of autoimmune type 1 diabetes*. *Diabet Med*, 2011. **28**(10): p. 1141-3.

-
22. Barker, J.M., *Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1210-7.

DiabeGen - 1° step

Cod 9192, 12 pazienti



Data di preparazione: 2014.09.15

Rev. 0

Eurospital 



Eurospital SpA

Via Flavia 122 - 34147 Trieste - Italia

Tel. +39 040 89971 - Fax +39 040 280944

www.eurospital.com - info@eurospital.com

DiabeGen – 1^o step

For in vitro diagnostic use only.

Intended use

Molecular biology kit for the detection of Class II HLA alleles predisposing to Type I Diabetes Mellitus (or Insulin Dependent Diabetes Mellitus T1D) in human DNA from peripheral blood by means of RT-PCR.

DiabeGen 1^o step MUST NOT be used for tissue typing

Principle of the method

Type I Diabetes is a complex and multifactorial disease, is the most common form of diabetes among children and young adults in the Caucasian population with prevalence of 0.4% [1]. This incidence varies geographically and by age: prevalence in China and Venezuela is 0.1 / 100,000 cases, while it reaches 36/100.000 in Sardinia and Finland [1]. The disease is characterized by the subtotal (> 80%) or total destruction of the β -cells in the pancreas islets caused by a lymphocytic insulinitis (autoantibodies) [2].

Although more than 40 gene loci [3] have been associated with Type I diabetes (T1D), the HLA region, due to the number of genes and their polymorphisms, contributes from 30 up to 50% to the genetic susceptibility to this disease [4, 5]. The highest probability to develop T1D is associated with the presence of the DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02 and DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 haplotypes in heterozygosis (serologically known as DR4-DQ8 and DR3-DQ2 [2,4-7]), followed by homozygote DR4-DQ8 and homozygote DR3-DQ2. The estimated risk of developing T1D in children in the general population having the HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 genotype is approx. 1/20 cases. This condition becomes 1/5 cases if other cases of T1D are present in the family [5]. Although the DR4-DQ8/DR3-DQ2 genotype is associated with the highest risk in the predisposition to T1D, it is possible to differentiate the risk associated with HLA DR/DQ genotypes, which presence leads to either high, medium or absence of risk (protection).

It is well known that in the Caucasian population there is a hierarchy in the risk stratification for T1D which is primarily influenced by the allelic variants of DRB1*04 when it is associated with DQB1*03:02 (DQ8) [8, 9]. A high risk in the onset of the disease is associated with the presence of DRB1*04:05 and DRB1*04:01, followed by an medium risk associated with DRB1*04:02 and DRB1*04:04 [4-6].

Conversely, the presence of DRB1*04:03 or DRB1*04:06 confers protection against the disease [8, 10-13]. For the detection of DRB1*04 allele variants (high resolution), please refer to the DiabeGen II^o step kit package insert.

In addition to DRB1*04 allelic variants, the risk stratification in the onset of T1D is also influenced by HLA-DQB1 profile. Several studies [4, 9, 14] have demonstrated that the presence of DQB1*06:02 may negatively influence the predisposition to Type I diabetes, even if autoantibodies associated with diabetes Type I and / or risk alleles are present [15]. Therefore, the presence of DQB1*06:02 allele seems to confer protection against T1D [14, 16], even when the subject carries a at-risk haplotype (DR4-DQ8 or DR3-DQ2) on the other chromosome.

DiabeGen 1^o step allows to identify the alleles predisposing T1D, namely DR4B1*04, DRB1*03, DQB1*03:02, DQB1*02 and the presence of the protective allele DQB1*06:02.

Mix 6 (status DR4) contains primers and probes for the identification of all DRB1* alleles (DRB1*01, 03, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15 and 16) with the only exception of DRB1*04.

Mix 6 in association with Mix 1 is used to define the status of DRB1*04, and in association with may give three combinations:

1. Mix 1 and 6 are positive: the subject is heterozygote for DRB1*04 (1 copy on one chromosome)
2. Mix 1 is positive, Mix 6 is negative: the subject carries homozygote DRB1*04 (2 copies, one for both chromosomes).
3. Mix 1 is negative, Mix 6 is positive: this will occur in all subjects not carrying DRB1*04 (e.g. Case 5 reported in the table "DiabeGen - 1^o step Combination Profile").

The information above is useful for the users of the DiabeGen Step II kit, since the Eurospital DiabeGen 1^o step and II^o step system is able to provide a unambiguous information about the status of the DRB1*04 allele only if the sample has one copy of such allele (heterozygote DRB1*04). If DRB1*04 is present on both chromosomes (homozygosis, Mix 1 positive and Mix 6 negative), high resolution identification of this allele should be done by another technique, e.g. sequencing.

Preventive Strategies

Differently than other genetic HLA-linked diseases, e.g. celiac

disease, the knowledge of the genetic pattern of a subject potentially at risk of developing T1D does not influence the physician's approach to the disorder. As matter of facts, while in case of Celiac Disease the physician may decide whether the patient should or should not be undergo a gluten free diet, a similar approach is not possible in case of T1D because trigger or triggers of the disease are still unknown.

The scientific community has different opinions about the use of genetic markers in the diagnosis of T1D. As an example, the authors of "Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes (Diabetes Care, 2011. 34(6): 61-99) [17] state that HLA-DR/DQ typing in T1D might be useful only in patients already positive to T1D auto-antibodies to define the presence or absence of specific haplotypes, because some haplotypes predispose to the disease, others provide significant delay or even protection.

The authors, therefore, recommend that genetic testing should not be recommended for routine clinical diagnosis of Type I diabetes. On the other hand, some authors just affirm the opposite, namely that knowing the HLA pattern of a subject potentially at risk of T1D allows, firstly, to differentiate it from other types of diabetes such as Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) and Type II diabetes [18] (American Diabetes Association, <http://www.diabetes.org>), secondly, to inform patients about the very high probability to develop the disease (1/5 cases) if other people in their family had been affected by diabetes.

Studies on animal models [19] have also shown how to prevent T1D autoimmunity is easier before the onset of the disease, rather than trying to prevent it when the autoimmune pattern is already known. If this were true for human beings too, the proposed DiabeGen Step II genetic test could represent an effective clinical tool to identify the patients at risk, mainly children and adolescents, before the onset of the disease this allowing the physicians to plan their clinical follow-up properly.

In agreement with this approach, a recent publication [20] states that genetic screening of T1D can avoid unnecessary suffering to children/adolescents, as only 4% of the subjects enrolled in this clinical trial, with known HLA pattern, were affected by typical diabetic ketoacidosis against 15-20% of children diagnosed in the general population [20, 21]. This aspect, namely how an early preventive diagnosis can prevent from hospitalization due to ketoacidosis and at least partially preserve patient β cells [22], is shared and also reported by the authors reported above [17], for whom, the genetic test for T1D has a moderate value.

Description of the DiabeGen I^o step kit

The DiabeGen I^o step kit detection system requires extracted and purified DNA samples. Each sample is then amplified by Real Time PCR reactions, according to the scheme shown in Table 1.

Supplied Materials

(quantity sufficient for 12 tests)

| | |
|------------------------------|-------------|
| Reagent A | 2 x 0,4 ml |
| Reagent B | 2 x 1,5 ml |
| 8 tube strips with Mix 1 - 7 | 2 x 1 strip |
| TE 1X Buffer | 2 x 1.5 ml |

Composition of supplied materials/reagents

1. Buffer TE 1X

2 vials of 2 ml, each containing 1,5 ml buffer (Tris/EDTA) for resuspension of primers and lyophilized probes. Ready-to-use

2. Reagent A

2 vials (blue cap) each containing 0,4 ml RT PCR Taq Polymerase. Ready-to-use

3. Reagent B

2 vials (green cap) each containing 1,5 ml reaction buffer for Master Mix. Ready-to-use

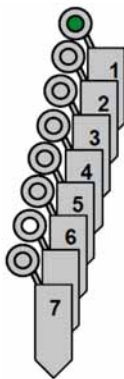
4. Strip with mix of primers and probes (lyophilised) for mixes 1-7

- **Tube 1** (Mix 1), marked with a GREEN dot.
- **Tube 7**, EMPTY and marked with a White dot (see Table 1).
- **Mix 1 to 5** contain primer and probes with different specificities allowing simultaneous amplification of aspecific HLA allele to the predisposition to T1D and human β -Globin, which acts as an internal control and guarantees the reliability of the obtained results.
- **Mix 6** (status DR4), contains primers and probes for identification of all DRB1* alleles (DRB1*01, 03, 7, 08, 09, 10, 11, 12, 13 14, 15 and 16) with the only exception of DRB1*04.

Notice: Mix 7 contains primers and probes for the amplification only of human β -Globin, which is used as No Template Control (NTC) to detect possible contaminations by human genomic DNA in the Master Mix. Due to the sensitivity of the RT system and according to the scheme shown in Table 1, Mix 7 is located in the last tube of the 8 well strip: this means that the seventh well marked with a white dot, is EMPTY.

The mixes appear as a lyophilised pink pellet (primers and probes) laying on the bottom of the tubes. Once dissolved, the

solution has a light pink colour. Each strip allows testing 6 samples.



| Table 1 Strip with GREEN DOT | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Mix | HLA class II Allele (FAM channel) | Internal Control (VIC/HEX channel) |
| 1 green dot | DRB1*04 | β globin |
| 2 | DRB1*03 | β globin |
| 3 | DQB1*03:02 | β globin |
| 4 | DQB1*02 | β globin |
| 5 | DQB1*06:02 | β globin |
| 6 | STATUS DR4 | β globin |
| White dot | EMPTY | |
| 7 | NO TARGET | β globin |

Required but not supplied instruments and materials.

1. Laboratory and equipments to run Real Time PCR.
2. Eppendorf[®] like sterile 1,5 ml tubes.
3. Adjustment-volume pipettes (10, 20, 200 and 1000 μ l).
4. Multi-channel (8 tips) adjustment-volume (5 to 50 μ l) pipettes.
5. Disposable sterile tips with filter for 10,20,200,1000 μ l pipettes.
6. 96 well microplates for Real Time PCR with optical grade caps and adhesive film or 8 tube strips with optical grade caps.
7. Sealing device
8. Vortex
9. Centrifuge for Eppendorf[®]-like-tubes
10. Centrifuge for 96 well microplate.
11. Centrifuge for 8 tube strips.
12. Thermal Cycler Real Time.

Performance criteria

The method allows defining the presence/absence of alleles listed in Table 1, which, as reported in the literature, are involved in the genetic predisposition or protection to T1D.

Sensitivity and specificity

25 DNA samples coming from HLA Reference Centres have been tested. Results obtained by using DiabeGen I[®] step kit have shown 100% sensitivity and specificity for the detected alleles.

Storage

All reagents must be stored at -2-8° C.

Stability after first opening

The mixes with primers and probes, once dissolved, are stable for 60 days if stored at -2-8° C. Other reagents, if used according to the advices reported in "General Warnings", are stable until the expiry date reported on the label.

Stability during transportation

An accelerate stability study showed that all reagents were stable after storage at 37°C for 72 hours.

Sampling

The DiabeGen I[®] step requires EDTA whole blood collected in adequate Vacutainer[®] tubes (eg.K3 and Molecular Biology). For sample storage, refer to the indication provided by the collection tube manufacturer.

Sample preparation

The sample is genomic DNA extracted from EDTA whole blood. DNA can be extracted by means of the most common DNA extraction techniques normally used by molecular biology laboratories. For optimal results, DNA concentration must be between 10 and 100 μ g/ml, which corresponds to Ct values of 22-25 for human β -Globin. The acceptability limit of the test allows the use of samples with Ct values in the range of 21-28 for human β -Globin falling. For Ct > 28 the test result is not guaranteed. If a sample dilution is required, use sterile water only.

DiabeGen I[®]Step has been optimised by using reagents included in the Eurospital Eu-Gen Estrazione[®] kit (code 9132).The use of other extraction kits requires that each laboratory should check its own procedures in terms of DNA concentration, stability and storage features.

Sample storage

Purified DNA, if not immediately submitted to amplification, can be stored at 2-8° C for 3 (three) months, or at -20°C for longer times. In this case, DNA should be stored in aliquots in order to avoid repeated freezing and thawing procedures which might damage the sample. For stability and storage conditions of the sample, refer to instructions included in the relevant extraction kits.

Re-use of DNA stored at 2-8° C for three months has been tested only by using reagents included in the Eurospital Eu-Gen Estrazione[®] Kit and appropriate tubes. Data on DiabeGen I[®] step performances when using DNA samples either stored

for longer periods and/or extracted by different methods than those reported above are not available.

DNA Amplification Procedure

Lyophilised Mix Resuspension

1. Place the 8 tube strip marked with GREEN dot in a support (not supplied) having the hinge at the far left (Figure 1); doing so the GREEN dot will be located on the first tube at the top (Mix 1, DRB1*04 allele). Each tube strip contains material for 6 amplifications, therefore for 6 samples.

2. Open all tube caps. Transfer 40 μ l from the TE 1X vial (resuspension buffer) in all tubes containing the lyophilised mix making sure to use a new pipette tip every time (Figure 1). Mix a couple of time in order to resuspend the lyophilised primers and probes contained in each tube.

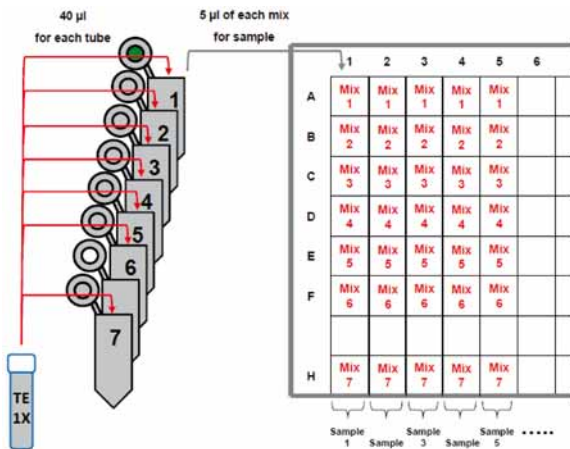
NOTE: the tube marked with a WHITE dot MUST not be open as it is empty.

3. Make sure that resuspended primer solution lays on the bottom of each tube. On the contrary, close the tube caps and shortly centrifuge the strips.

Dispensing Mixes for Amplification

For each samples to be tested, take 5 μ l of resuspended primers and probes solution from the strip and put them column wise in a 96 wells plate (or into a 8 well strip for Real Time PCR, if such a support is used) as shown in **Figure 1**.

Figure 1



Preparation of Master Mix

1. Due to the high viscosity of the solutions involved in the preparation of Master Mix, before using Reagents A and B vials it is advisable to shake and then shortly centrifuge them to eliminate possible drops inside the caps. Carefully transfer the required volumes to prepare the mix.

2. For each sample, transfer 60 μ l of Reagent A (blue cap vial) and 20 μ l of Reagent B (green cap vial) in an Eppendorf-like sterile tube. Shake and shortly spin the tubes containing the Master Mix. (**Fig.2**)

3. The method allows to assay up to a maximum of 12 samples if a 96 well RT thermal cycler is used.

4. Take 10 μ l of each Master Mix and transfer it into the well containing Mix 7 (corresponding to No Template Control NTC) as it contains primers and probes for human β -Globin only (**Figure 2**, Mix 7, yellow highlighted).

5. **Note:** It is advisable to close wells containing Mix 7, until the plate is fully dispensed in order to minimise possible contaminations (aerosol and environmental contaminations, etc.).

6. For each sample to be tested, transfer 20 μ l of DNA in each Master Mix tube. Shake and shortly centrifuge all the tubes. The Master Mix with DNA is ready.

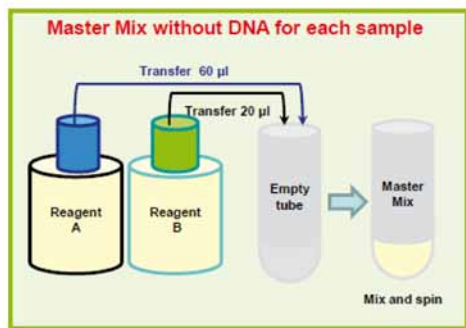
7. For each sample to be tested, transfer 10 μ l of Master Mix with DNA in each well containing the primers and probes (**Figure 3**, Mix 1 to 6, yellow highlighted).

To properly mix the solutions (primer and master with DNA), proceed as indicated below:

- If Vortex and microplate centrifuges are available: close the plate by means of the adhesive film and seal it by using the sealing device (not provided), shortly Vortex (5-10 sec), low speed if possible, then shortly centrifuge for removing possible bubbles and drops.
- Other cases: it is advisable to repeatedly pipette the content of each well of the plate by means of an 8 tip multichannel pipette, then close the plate by means of the adhesive film and seal each well by using the sealing device (not provided).

The same procedure must be used also

Figure 2



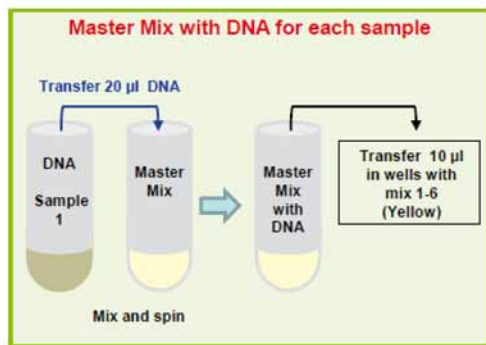
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Mix 1 | | | | | | | |
| B | Mix 2 | | | | | | | |
| C | Mix 3 | | | | | | | |
| D | Mix 4 | | | | | | | |
| E | Mix 5 | | | | | | | |
| F | Mix 6 | | | | | | | |
| G | | | | | | | | |
| H | Mix 7 | | | | | | | |

Transfer 10 µl
in Mix 7
ONLY

Sample 1

Mix 7 = Negative Control
No Template Control (NTC)

Figure 3



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|-------|---|---|---|---|
| A | Mix 1 | | | | |
| B | Mix 2 | | | | |
| C | Mix 3 | | | | |
| D | Mix 4 | | | | |
| E | Mix 5 | | | | |
| F | Mix 6 | | | | |
| G | | | | | |
| H | Mix 7 | | | | |

Sample 1

when optical strip and/or caps are used.

Real Time PCR Amplification

A 96 wells RT thermal cycler allows to run 12 samples each time, one per each column of the plate. If RT PCR 8 tube strips with optical grade caps are used, 12 strips, one for each sample, will be used.

Procedure

1. Start the software and follow the program specifications of the relevant thermal cycler. DiabeGen I^ostep kit has been validated with the following thermal cyclers: AB 7300, 7500 and 7500 FAST, Bio-Rad CFX96 Touch and Connect. As an example, when using Applied Biosystems thermal cyclers, set

the *fluorophors* as described below:

| Detector name | Reporter | Quencher | Colour |
|---------------------------|----------|----------|--------|
| DiabeGen Allele | FAM | NONE | RED |
| DiabeGen β -globina | VIC * | NONE | BLACK |

(*) NOTE for MIX 7: select VIC channel on Applied Biosystems thermal cyclers and HEX channel on Bio-Rad thermal cyclers

- If requested, set *ROX* as *Passive Reference*.
- NOTE: wells containing Mix 7 are used as NTC: please mark them on the plate accordingly.
- Set the following thermal protocol

| Temperature | Time | Cycles |
|-------------|--------|--------|
| 95°C | 10 min | 1 |
| 95°C | 15 sec | 37 |
| 60°C | 90 sec | |

- Set optical reading of the instrument on Step at 60°C (box highlighted in yellow in the table above).
- IMPORTANT NOTE for Bio-RadCFX96 Touch and Connect users only**

The ramp of the thermal protocol described in table above must be set on 1.5°C/sec for each step.

- Set the reaction volume at 15 μ l.
- Start up the reaction.

Validation of the expected results.

Once the reaction protocol has been completed, set the following parameters for reading results:

- Select plate/ all samples.
- Set the following values:

| Applied Biosystem 7300, 7500 and 7500 Fast | |
|--|------|
| Baseline: Start cycle-End cycle | 7-17 |
| Threshold DiabeGen Allele (FAM) | 0,2 |
| Threshold DiabeGen β -Globin (VIC) | |

| Bio-Rad CFX96 Touch and Connect | |
|--|------|
| Baseline: Start cycle-End cycle | 7-17 |
| Threshold DiabeGen Allele (FAM) | 50 |
| Threshold DiabeGen β -Globin (HEX) | 80 |

- Analyse the run.

Test validation

A test is valid, if the following conditions are satisfied:

- For each sample, check that mix 7 (negative control or NTC) is negative to DiabeGen β -Globin reading filter (VIC or HEX channel). Due to the sensitivity of the detection method (Real Time PCR), positive signals showing Ct values higher than 34 (Ct \geq 34) might be tolerated, as they might result from environmental contaminations or out-of-control events. These signals do not affect the final result. Conversely, the presence of a fluorescent signal showing a Ct value lower than 34 (Ct < 34) indicates a reagent contamination which might affect the result obtained with that Master Mix. In this case, the test must be repeated.

- For each sample, check that all Mix from 1 to 6 show a positive values for VIC or HEX channel with Ct values in the 21 ÷ 28 range. The presence of the reaction internal control (human β -Globin) is very important in case of negative sample amplification in a given mix. If the Ct values obtained for the human β -Globin are higher than the upper reference value (Ct=28), some diabetes specific alleles could have not been amplified, or amplified beyond the deemed acceptable limit of 35 cycles. In this case, it is recommended to repeat the test by increasing the DNA concentration. If the Ct value obtained for human β -Globin is lower than 21, it is recommended to repeat the test by diluting the DNA sample. Please note that, theoretically, a 1:10 dilution of the DNA sample should provide an increased Ct value (approx. 3,3 units).

- Read Ct values for each well (FAM channel, DiabeGen Allele). Values lower than 17 (Ct < 17) for FAM and VIC/HEX channels are not possible (check components and the amplification profile) and should not be considered.

- Read Ct values for each well (FAM channel, DiabeGen Allele). Ct values between 18-35 indicate a positive result for a given allele in that specific mix.

Results interpretation

- If the acceptability limits reported in the previous section "Test validation" of the test are met, report the positive results for the FAM channel in the provided form "DiabeGen I^o step-Results".

- The combination profile obtained for each sample must be crosschecked with those present in the table "DiabeGen I^o step- Combination profile". Report the relevant combination in the last column of the form "DiabeGen I^o step- Results".

- Finally, by using the form "DiabeGen I^o step - analysis of results" each reported combination is associated with the presence/absence of predisposing alleles and/or DQB1*06:02 allele. In the same form, the column "Possible additional steps

and comments" indicate possible further steps to better characterize the sample (e.g. high resolution typing of DRB1*04 by means of the DiabeGen II^o Step kit)

4. As an example, if a sample belongs to Combination 1, the sample will be positive for DRB1*04, DRB1*03, DQB1*03:02 and DQB1*02 alleles. These allele define the DR4-DQ8/DR3-DQ2 genotype showing the highest predisposing risk to T1D. The result indicates that predisposing alleles to T1D are present, while the protective allele DQB1*06:02 is not present. As an additional step, it is advised to test the sample by means of the DiabeGen II^o Step kit to check the status of the DRB1*04 allele at high resolution. If the subject should carry either DRB1*04:03 or 04:06 allele, the patient would be anyhow protected against T1D [8, 10, 11]. If, on the contrary, if the sample were DRB1*04:05 positive, the patient would have an increased predisposing risk to the disease [8].

Precautions

- 1.** Wait for the reagent to reach room temperature before starting the test.
- 2.** Strictly follow the procedure. In case of accident or disease, seek immediately for medical help and show the physician the container, the label and, if available, the Material Safety Data Sheet.
- 3.** Warning: due to the viscosity of solutions, in order to obtain the most appropriate test performance it is mandatory to mix 2-3 times the reaction mixes by the 8 tip multi-channel pipette. New pipette tips must be used for each new well line.
- 4.** Use Vortex and plate/strip centrifuges if available.
- 5.** Warning: it is very important not to use reagents belonging to different batches.
- 6.** Always wear double gloves when running the test. If any doubt of possible contamination with reagents and/or sample arises, immediately change gloves.
- 7.** If not working under a hood, always wear a mask to avoid test tube contamination.
- 8.** It is recommended to perform each step of the test (sample and reagent preparation, test procedure and reading) in separate and defined rooms in order to minimise test tube contamination.
- 9.** Before running the test for the first time, it is also recommended to HLA type any user who might be working with the system to be able to identify any possible contamination during the test.
- 10.** Once the amplification is completed, please dispose of any tube and/or plate containing the amplified materials without ever opening them.
- 11.** The Mixes contain DNA specific sequences, which

possible hazard has never been fully tested.

12. The waste materials generated by the use of the kit should be disposed of according to National Directives and Laws regulating the treatment of wastes coming from chemicals biological. In particular, liquid wastes generated by sample extraction procedures and other waste materials (e.g. pipette tips) should also be treated as potentially infectious material and inactivated before their disposal. Avoid contact between waste sample extraction materials and bleach.

Limitations of the test.

- 1.** DiabeGen I^o step kit requires the use of EDTA whole blood collected in adequate Vacutainer[®] tubes (eg. K3 and Molecular Biology). For sample storage refer to the indication provided by the tubes manufacturer.
- 2.** DiabeGen I^o step has been optimised by using the extraction reagents included in the Eurospital[®] Eu-Gen Estrazione[®] kit (code 9132). The usage of other extraction kits requires that the laboratory should check out its own procedures in terms of DNA concentration, stability and storage features.
- 3.** DNA should be tested as soon as possible after the extraction.
- 4.** Purified DNA, if not use immediately tested, can be stored at 2-8°C for three (3) months, or frozen at -20°C for longer times. In this case, it is recommended to aliquot the DNA sample in order to avoid possible problems due to continuous thawing and freezing steps which might lead to degradation.
- 5.** DNA concentration of each sample must be in the range between 10 and 100 µg/ml.
- 6.** DiabeGen I^o step I kit has been validated on the following RT thermal cyclers: AB 7300, 7500 and 7500 FAST, Bio-Rad CFX96 Touch and Connect.

General advices

- 1.** Always use sterile tips with filter.
- 2.** Take any precaution to avoid reagents contamination.
- 3.** Expose lyophilised and resuspended mixes to light just for the time needed to perform the test.
- 4.** Place unused strips straight back in the provided aluminium minigrip sachet and make sure a desiccant inside is inside.
- 5.** Do not touch pipette tips by hands.
- 6.** Always wear protection gloves to avoid reagent contamination.
- 7.** Use optical grade tubes, caps and/or adhesive films only.
- 8.** Avoid mixing reagents from different batches.
- 9.** DiabeGen I^o step should be used ONLY according to the

purposes reported in the paragraph "Intended Use" and stated in the paragraph "Performance Criteria".

Troubleshooting

No signal

1. Wrong setting of the reading filters.
2. Dispensing mistakes or lack of reagents.
3. Sample Inhibitory effects: insufficient DNA extraction and purification processes.
4. Wrong storage of the kit.
5. Check thermal cycler performance.

False positive results.

DNA samples, mostly extracted by means of magnetic beads, might rarely interfere with the kit reagents (Reagent A master mix). This kind of interference creates positive signals (FAM channel) in wells that should be negative, giving a liner graph (rather than the typical exponential profile expected for Real Time PCR positive results). The graph, when crossing the threshold, gives Ct values. If this problem occurs, check the raw fluorescence signal recorded by the instrument (in the Applied Biosystems thermal cyclers it is named "component" in) for the well/sample which FAM and possible *passive reference* (ROX) are altered. If this scenario occurs, the result is to be considered as false positive.

Signal strength too low

1. Deterioration of the detection system due to incorrect handling and/or storage of the reagents.
2. Very low DNA concentration of DNA in the tested sample.
3. Incorrect mix/mixes resuspension.
4. Air bubbles trapped inside the amplification tubes.

Literature

1. Karvonen, M., et al., *Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide*. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(10): p. 1516-26.
2. R. Arcari, N.G., A. Lezo, D. Boscolo, P.Cavallo Perin, *Eziopatogenesi del Diabete Mellito di Tipo 1*. *Caleidoscopio Italiano*, 1998.
3. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 2009. **41**(6): p. 703-7.
4. Noble, J.A. and H.A. Erlich, *Genetics of type 1 diabetes*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(1): p. a007732.
5. Steck, A.K. and M.J. Rewers, *Genetics of type 1 diabetes*. *Clin Chem*, 2011. **57**(2): p. 176-85.
6. Pociot, F. and M.F. McDermott, *Genetics of type 1 diabetes mellitus*. *Genes Immun*, 2002. **3**(5): p. 235-49.
7. Rani, R., A. Sood, and R. Goswami, *Molecular basis of*

predisposition to develop type 1 diabetes mellitus in North Indians. *Tissue Antigens*, 2004. **64**(2): p. 145-55.

8. Erlich, H., et al., *HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families*. *Diabetes*, 2008. **57**(4): p. 1084-92.
9. Noble, J.A. and A.M. Valdes, *Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes*. *Curr Diab Rep*, 2011. **11**(6): p. 533-42.
10. Van der Auwera, B., et al., *DRB1*0403 protects against IDDM in Caucasians with the high-risk heterozygous DQA1*0301-DQB1*0302/DQA1*0501-DQB1*0201 genotype*. *Belgian Diabetes Registry*. *Diabetes*, 1995. **44**(5): p. 527-30.
11. Awata, T., et al., *Genetic analysis of HLA class II alleles and susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects*. *Diabetologia*, 1992. **35**(5): p. 419-24.
12. Rewers, A., et al., *Ethnic differences in the associations between the HLA-DRB1*04 subtypes and type 1 diabetes*. *Ann NY Acad Sci*, 2003. **1005**: p. 301-9.
13. Thomson, G., et al., *Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis*. *Tissue Antigens*, 2007. **70**(2): p. 110-27.
14. Nepom, G.T., *A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM*. *Diabetes*, 1990. **39**(10): p. 1153-7.
15. Pugliese, A., et al., *HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM*. *Diabetes*, 1995. **44**(6): p. 608-13.
16. Baisch, J.M., et al., *Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(26): p. 1836-41.
17. Sacks, D.B., et al., *Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(6): p. e61-99.
18. Hitman, G.A., *The message for MODY*. *Diabet Med*, 2011. **28**(9): p. 1009.
19. Atkinson, M.A. and E.H. Leiter, *The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?* *Nat Med*, 1999. **5**(6): p. 601-4.
20. Nanto-Salonen, K., et al., *Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial*. *Lancet*, 2008. **372**(9651): p. 1746-55.

-
21. Todd, J.A., M. Knip, and C. Mathieu, *Strategies for the prevention of autoimmune type 1 diabetes*. Diabet Med, 2011. **28**(10): p. 1141-3.
 22. Barker, J.M., *Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1210-7.

DiabeGen - 1° step

Code 9192, 12 patients



Date of preparation: 2014.09.15

Rev. 0

Eurospital 



Eurospital SpA

Via Flavia 122 - 34147 Trieste - Italy

Tel. +39 040 89971 - Fax +39 040 280944

www.eurospital.com - info@eurospital.com

