

## DiabeGen - 1<sup>o</sup> step

Per uso diagnostico in vitro

### Destinazione d'uso e campo di applicazione

Kit di biologia molecolare per la determinazione in alta risoluzione degli alleli HLA di classe II DRB1\*04 e DQB1\*06:02 nell'ambito della predisposizione al diabete mellito di tipo I, o diabete mellito insulino-dipendente. Il kit si utilizza su DNA estratto da sangue periferico mediante amplificazione in Real Time PCR.

Il kit va usato in successione al kit DiabeGen - I<sup>o</sup> step (cod 9192) sui soggetti potenzialmente a rischio di diabete di tipo I che risultano positivi per la presenza dell'allele DRB1\*04 in associazione con l'allele DQB1\*03:02 (DR4-DQ8).

Il kit non deve essere utilizzato per tipizzazione tissutale.

### Principio del metodo

Il diabete di tipo I è una malattia complessa, multifattoriale, ed è la forma più comune di diabete fra i bambini e i giovani adulti nella popolazione Caucasicca, 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 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 sierologicamente 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 Caucasicca 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].

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 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 - II<sup>o</sup> step permette di individuare nella popolazione Caucasicca, in soggetti potenzialmente a rischio per il diabete mellito di tipo I (DR4-DQ8 positivi), la natura dell'allele DRB1\*04 fino alla quarta cifra decimale (es: DRB1\*04:01), permettendo di attribuire al soggetto un livello del rischio nei confronti della malattia; tale rischio sarà aumentato se il soggetto è in possesso della variante allelica DRB1\*04:01 oppure DRB1\*04:05, mentre sarà diminuito o pressoché nullo se la variante allelica sarà la DRB1\*04:03 oppure DRB1\*04:06 [6, 8, 13]. Tutte le altre varianti alleliche del DRB1\*04 conferiscono una predisposizione considerata a rischio intermedio nei confronti della patologia [5, 6, 8].

Il kit DiabeGen - II<sup>o</sup> step permette inoltre di identificare in alta risoluzione la presenza dell'allele protettivo DQB1\*06:02 [9, 15].

### Descrizione del kit DiabeGen II<sup>o</sup> step

Il sistema di rilevamento di DiabeGen - II<sup>o</sup> step prevede una preliminare estrazione e purificazione del DNA da ogni singolo

campione. In seguito ogni campione è sottoposto a 8 diverse reazioni di Real-Time PCR secondo lo schema riportato nella Tabella 1.

### Limiti del Test

Il test possiede le seguenti limitazioni d'uso:

1. i soggetti DR4-DQ8 da testare devono portare l'allele DRB1\*04 in singola copia (eterozigoti DRB1\*04);
2. la risoluzione alla quarta cifra decimale degli alleli DRB1\*04 è possibile in soggetti Caucasici con alleli DRB1\*04 che vanno dal DRB1\*04:01 al DRB1\*04:19.
3. l'analisi dei rari alleli DRB1\*04:01:09, DRB1\*04:01:10, e DRB1\*04:16 porta allo stesso risultato (vedi tabella dei risultati) e non sono distinguibili fra loro, si rimanda quindi ad altra metodica nel caso dovessero presentarsi per definire la loro natura (ad esempio il sequenziamento del DNA).
4. l'analisi dei rari alleli DRB1\*04:04:02, DRB1\*04:04:06, DRB1\*04:04:07 e DRB1\*04:15 porta allo stesso risultato (vedi tabella dei risultati) e non sono distinguibili fra loro, si rimanda quindi ad altra metodica nel caso dovessero presentarsi per definire la loro natura (ad esempio il sequenziamento del DNA).

### 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 1-8	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 8 (provetta 1 con mix 1 segnata da bollino giallo)

Le mix dalla 1 alla 6 contengono primer e sonde per determinare la natura dell'allele DRB1\*04 fino alla quarta cifra decimale. In dettaglio, le mix contengono nel loro insieme 10 sonde, numerate da 1 a 10; tali sonde in presenza dell'opportuno target daranno un segnale di fluorescenza su un

determinato canale del termociclatore Real-Time (FAM o VIC/HEX) come illustrato nella tabella 1.

La mix 7 contiene primer e sonde di diversa specificità che consentono la contemporanea amplificazione dell'allele HLA DOB1\*06:02, considerato protettivo nei confronti della predisposizione al diabete mellito di tipo I e di una specifica sequenza genomica codificante per la beta globina umana (beta globina) che funge da controllo interno, garantendo l'affidabilità del risultato ottenuto.

La mix 8 contiene sonda e primer per la sola beta globina umana e viene utilizzata come No Template Control (NTC) per controllare l'eventuale presenza di contaminazione da DNA genomico umano nella Master Mix usata per l'analisi di ogni campione.

Tutte le mix si presentano come un pellet liofilo di primer e sonde 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.

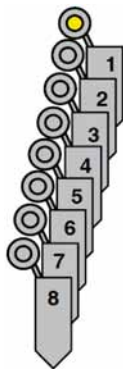


Tabella 1 Strip con BOLLINO GIALLO		
Mix	Canale FAM	Canale VIC/HEX
1 bollino giallo	Sonda 1	Sonda 2
2	Sonda 3	Sonda 4
3	Sonda 5	
4	Sonda 6	Sonda 7
5	Sonda 8	Sonda 9
6	Sonda 10	
7	DOB1*06:02	beta globina
8	Nessun target	beta globina

### 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 di determinare la presenza/assenza dell'allele DQB1\*06:02 considerato protettivo nella predisposizione al diabete mellito di tipo I e di stabilire la natura dell'allele DRB1\*04 in alta risoluzione nei limiti dichiarati (vedi paragrafo Limiti del Test).

### **Sensibilità e specificità**

Sono stati testati 31 campioni di DNA provenienti da centri di riferimento per HLA. I risultati ottenuti con DiabeGen - II<sup>o</sup> 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 - II<sup>o</sup> 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 µg/ml, pari a valori di Ct della beta globina umana di 22-25. Il limite di accettabilità del test consente l'utilizzo di campioni con Ct della beta globina umana compresi

nell'intervallo 21-28. Per 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 - II<sup>o</sup> 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 evitarne 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 - II<sup>o</sup> step con campioni di DNA conservati per periodi più lunghi ed estratti con sistemi diversi da quello precedentemente indicato.

### **Procedimento di Amplificazione del DNA**

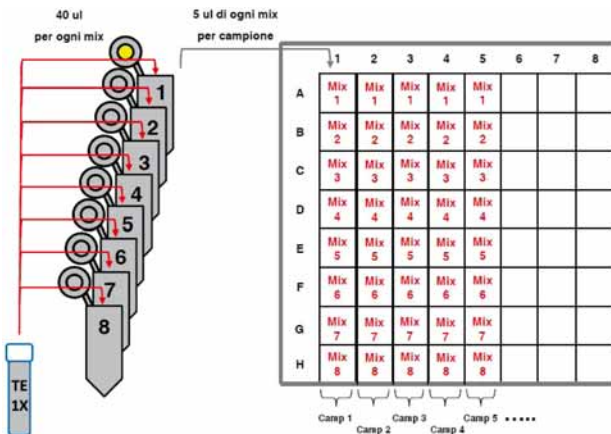
#### **Risospensione delle mix liofile**

1. Prelevare la strip da otto provette con bollino giallo e porla su un supporto per provette (non fornito), posizionando la cerniera delle provette alla vostra sinistra (figura 1); in questo modo il bollino giallo si troverà sulla prima provetta in alto (mix 1 per sonda 1/sonda 2). Ognuna delle provette della 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.
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, su un termociclatore Real Time da 96 pozzetti, fino a un massimo di 12 campioni per amplificazione.

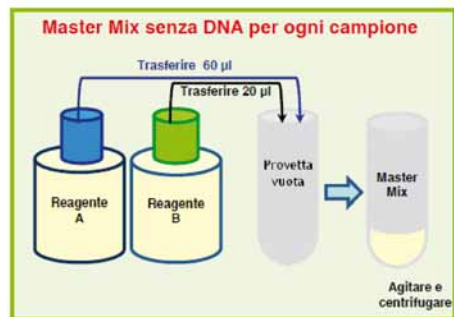


Figura 2

Trasferire 10 µl SOLO nella Mix 8

Camp. 1

Mix 8= controllo negativo No Template Control (NTC)

	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	Mix 7							
H	Mix 8							

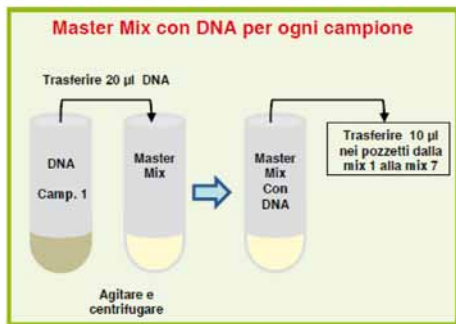
4. A questo punto, per ogni master mix preparata, prelevare 10  $\mu$ l della Master Mix e dispensarli nel pozzetto contenente la mix numero 8, che corrisponde al controllo negativo di reazione o No Template Control (NTC), in quanto contiene solamente i primer e la sonda per la beta globina umana (figura 2, box evidenziato in giallo).
5. Si consiglia, se possibile, diappare i pozzetti contenenti la mix 8, fino a completamento della dispensazione della piastra

per ridurre al minimo il rischio di contaminazioni accidentali (aerosol, ambientali, etc.).

6. Aggiungere quindi alla Master Mix 20  $\mu$ l 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  $\mu$ l della Master Mix con DNA nei pozzetti contenenti la mix dalla 1 alla 7 (figura 3, box evidenziati in giallo).

Figura 3



	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	Mix 7							
H	Mix 8							

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) per chiudere le piastre, 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 - II° 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:

Mix	Detector name	Reporter	Quencher	Colour
1, 2, 3, 4, 5, 6	DiabeGen Sonda FAM	FAM	NONE	RED
1, 2, 4, 5	DiabeGen Sonda HEX	VIC *	NONE	BLUE
7	DiabeGen DQB1*06:02	FAM	NONE	GREEN
7, 8	DiabeGen $\beta$ -globina	VIC *	NONE	BLACK

\*Le sonde DiabeGen HEX e la sonda DiabeGen beta globina vanno lette 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.

- Si ricorda che i pozzetti in cui è stata messa la mix 8 sono usati come NTC quindi evidenziarli sulla piastra.
- 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	

- Settare la lettura ottica dello strumento sullo step a 60,0°C (box evidenziato in giallo nella tabella sopra riportata).
- IMPORTANTE per gli utilizzatori di CFX96 Touch o Connect Bio-Rad:**  
**impostare il protocollo termico sopradescritto settando per ogni step una rampa termica del termociclatore pari a 1,5°C/sec.**
- Impostare il volume di reazione a 15 µl.
- Avviare la reazione.

#### Validazione dei risultati ottenuti

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

- Selezionare tutta la piastra/tutti i campioni.
- Impostare i seguenti parametri:

Applied Biosystem 7300, 7500 e 7500 Fast	
Baseline: Start cycle-End cycle	7-17
Threshold Sonda FAM e Sonda HEX	0,1
Threshold DQB1*06:02 β-globina	0,2

Bio-Rad CFX96 Touch e Connect	
Baseline: Start cycle-End cycle	7-17
Threshold Sonda FAM e Sonda HEX	50
Threshold DQB1*06:02	50
Threshold β-globina	80

- Analizzare la seduta.

#### Validità del test

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

- verificare che per ogni campione analizzato la mix 8, corrispondente al controllo negativo o NTC, sia negativa per il filtro di lettura per DiabeGen beta globina (canale VIC oppure

HEX). Vista la sensibilità del metodo di rilevazione (Real Time PCR) vengono tollerati segnali positivi per Ct ≥ 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 significativo con Ct < 34 è indice di un inquinamento dei reagenti e può inficiare il risultato ottenuto con quella Master Mix. In questo caso il test deve essere ripetuto;

- la mix 7 usata come controllo del DNA deve risultare positiva per la beta globina (DiabeGen beta globina, canale VIC oppure HEX) con Ct compresi fra 21-28. La presenza del controllo interno di reazione data 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;

- 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)

- la mix 7, usata per l'identificazione dell'allele protettivo DQB1\*06:02, se positiva deve dare un risultato positivo per il canale FAM con Ct compresi tra 18-35;

- Le mix dalla 1 alla 6 possono essere

- negative per entrambi i fluorofori**
- oppure positive **SOLAMENTE** per il canale FAM;
- oppure positive **SOLAMENTE** per il canale VIC/HEX
- se positive** i loro Ct, per entrambi i fluorofori (FAM e VIC/HEX), devono essere compresi nell'intervallo 18-35 Ct.

Per l'interpretazione di questi segnali vedere il paragrafo Interpretazione dei risultati e la tabella "DiabeGen - II" step - Tabella risultati per l'interpretazione dell'allele DRB1\*04 in alta risoluzione" allegata.

#### Interpretazione dei risultati

##### Presenza dell'allele protettivo DQB1\*06:02

Soddisfatti i limiti di accettabilità del test, se i campioni analizzati mostrano una positività per la mix 7 sul canale del FAM con Ct compresi fra 18 e 35, significa che il soggetto possiede l'allele DQB1\*06:02. Riportare questa positività nell'apposita colonna "Allele DQB1\*06:02" sul foglio "DiabeGen

- II° step - Foglio dei Risultati" e nella colonna "presenza dell'allele protettivo DQB1\*06:02" nel foglio "DiabeGen - II° step - Interpretazione dei Risultati". Questo allele viene considerato protettivo nei confronti della suscettibilità genetica al diabete mellito di tipo I anche in presenza degli autoanticorpi associati al TD1 e/o agli alleli a rischio [15], ossia anche quando il soggetto porta sull'altro cromosoma un aptotipo considerato a rischio (DR4-DQ8 o DR3-DQ2).

### Alta risoluzione dell'allele DRB1\*04

Soddisfatti i limiti di accettabilità del test, analizzare la positività dei campioni per le mix dalla 1 alla 6 per il canale del FAM e il canale del VIC/HEX e identificare la natura dell'allele DRB1\*04 facendo riferimento alla tabella allegata "DiabeGen - II° step - Tabella risultati per l'interpretazione dell'allele DRB1\*04 in alta risoluzione". Per ogni campione segnare, per ciascuna delle sei mix, la presenza/assenza del segnale letto contrassegnando la casella corrispondente nel foglio "DiabeGen - II° step - Foglio dei Risultati" contenuto nel kit. Seguire il principio illustrato nella tabella dei risultati dove, la positività per il canale FAM è contrassegnata con un bollino rosso, la positività per il canale VIC/HEX con un bollino blu, l'assenza di segnale per entrambe le sonde corrisponde a nessun bollino.

Una volta segnate le positività, identificare il profilo

corrispondente sulla tabella "DiabeGen - II° step - Tabella risultati per l'interpretazione dell'allele DRB1\*04 in alta risoluzione". La natura dell'allele DRB1\*04 corrisponderà a quella riportata nella colonna DRB1\* e determinerà un predisposizione alta, intermedia o protezione verso il diabete mellito di tipo I come indicato nella colonna "Predisposizione al diabete mellito di tipo I". Una volta individuata la natura dell'allele DRB1\*04 riportarlo nel foglio riassuntivo "DiabeGen - II° step - Interpretazione dei Risultati" nella colonna DRB1\* e segnare a quale predisposizione essa corrisponde (alta, intermedia, protezione).

Ad esempio se un ipotetico campione "PROVA" risultasse

- negativo per l'allele DQB1\*06:02, nel foglio "DiabeGen - II° step - Foglio dei Risultati" nella colonna Allele DQB1\*06:02 non segnare alcun pallino e nel foglio "DiabeGen - II° step - Interpretazione dei Risultati" segnare NO nella colonna Presenza dell'allele protettivo DQB1\*06:02
- positivo per la mix 1 sul canale FAM (sonda 1);
- positivo per la mix 2 sul canale VIC/HEX (sonda 4);
- negativo per la mix 3 per entrambi i canali;
- positivo per la mix 4 sul canale VIC/HEX (sonda 7);
- positivo per la mix 5 sul canale VIC/HEX (sonda 9);
- e negativo per la mix 10 per entrambi i canali,

DiabeGen - II° step · Foglio dei Risultati											
Allele DRB1*04										Allele DQB1*06:02	
Campione	Mix 1		Mix 2		Mix 3	Mix 4		Mix 5		Mix 6	Mix 7
	Sonda FAM	Sonda VIC/HEX	Sonda FAM	Sonda VIC/HEX	Sonda FAM	Sonda FAM	Sonda VIC/HEX	Sonda FAM	Sonda VIC/HEX	Sonda FAM	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Allele DQB1*06:02
1	●			●			●		●		
2											
3											

dalla tabella "DiabeGen - II° step - Tabella risultati per l'interpretazione dell'allele DRB1\*04 in alta risoluzione" risulterebbe che il campione possiede il profilo corrispondente

all'allele DRB1\*04:03 che dà protezione nei confronti della patologia. Quindi il foglio "DiabeGen - II° step - Interpretazione dei Risultati" risulterebbe:

DiabeGen - II° step · Interpretazione dei Risultati						
Campione	Identificazione dell'allele DRB1*04	Predisposizione al diabete mellito di tipo I data dal DRB1*04			Presenza dell'allele protettivo DQB1*06:02	
	DRB1*	ALTA	INTERMEDIA	PROTEZIONE	SI	NO
1 Prova	04:03	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dalla tabella dei risultati si può vedere come il kit DiabeGen - II<sup>o</sup> step non è in grado di dare una risposta univoca se il risultato delle mix corrisponde a due combinazioni, ossia a quella per cui l'allele DRB1\*04 potrebbe essere un DRB1\*04:01:09 oppure un DRB1\*04:01:10 oppure un DRB1\*04:16, e quella in cui l'allele potrebbe essere un DRB1\*04:04:02 oppure un DRB1\*04:04:06 oppure un DRB1\*04:04:07 oppure un DRB1\*04:15.

Questi alleli sono stati individuati e sequenziati, e sono presenti in alcuni database per gli HLA presenti in rete (<http://www.ebi.ac.uk>; <http://allelefrequencies.net>), ma restano comunque degli alleli molto rari nella popolazione Caucasica. Infatti in questi database la frequenza di questi alleli nella popolazione generale e in quella caucasica non viene nemmeno riportata, eccetto che per gli alleli DRB1\*04:15 e DRB1\*04:16, i quali presentano una frequenza massima riportata rispettivamente dello 0,003%, e dello 0,1% (<http://allelefrequencies.net> [17]).

Se il risultato ottenuto dovesse coincidere con una di queste combinazioni si rimanda ad altra metodica per risolvere l'alta risoluzione dell'allele DRB1\*04, come ad esempio il sequenziamento del DNA.

### **Strategie preventive**

A differenza di altre malattie genetiche legate all'HLA, come ad esempio la malattia celiaca, la conoscenza dell'assetto genetico 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 aplotipi predisponenti, ritardanti o protettivi verso la patologia in soggetti già positivi per gli autoanticorpi tipici del diabete di tipo I, in quanto alcuni aplotipi 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  $\beta$  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.

### **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 contenute 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.

### Caratteristiche del campione biologico da testare

**1.** Il kit DiabeGen - II° 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 - II° 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 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 - II° step è stato validato sui seguenti termociclatori: Applied Biosystem 7300, 7500 e 7500 Fast, Bio-Rad CFX 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 minigrip 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 - II° step non deve essere utilizzato per fini diversi da quanto riportato nella "Destinazione d'uso e campo di applicazione" e ribadito nei "Criteri di prestantazione".

### 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 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 alterata 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.* 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. Fernandez-Suarez, X.M. and M.Y. Galperin. *The 2013 Nucleic Acids Research Database Issue and the online Nucleic Acids Research Database Collection.* Nucleic Acids Res 2013 Jan 1 [cited 41 D1]; 2012/12/04:[D1-7]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23203983>.
18. 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.
19. Hitman, G.A., *The message for MODY.* Diabet Med, 2011. **28**(9): p. 1009.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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 - 11° step



Cod 9193, 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](http://www.eurospital.com) - [info@eurospital.com](mailto:info@eurospital.com)



## DiabeGen – II° step

For in vitro diagnostic use only.

### Intended Use

Molecular biology kit for the high resolution detection of class II HLA DRB1\*04 and DQB1\*06:02 alleles to investigate the possible predisposition to Type I Diabetes Mellitus (or IDDM-Insulin Dependent Diabetes Mellitus T1D). The kit is based on Real Time PCR amplification of human DNA from peripheral blood.

DiabeGen II° step is intended to be used subsequently to DiabeGen I° step (code 9192) on those subjects potentially at risk of Type I Diabetes Mellitus (T1D) which were tested positive for both DRB1\*04 and DQB1\*03:02 (DR4-DQ8) alleles.

DiabeGen II° 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  $\beta$ -cells in the pancreas islets caused by a lymphocytic insulinitis (autoantibodies) [2].

Although more than 40 gene loci [3] have been associated to type I diabetes mellitus, 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 to 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 1 out of 20 cases. This condition becomes 1 out of 5 cases if other cases of diabetes type I are present in the family [5]. Although the DR4-DQ8/DR3-DQ2 genotype is associated with

the highest risk in the predisposition to type I diabetes mellitus, it is possible to differentiate the risk associated to HLA DR/DQ genotypes, which presence leads to an increased risk, an intermediate risk or absence of risk (protection).

It is well known that in the Caucasian population there is a hierarchy in the risk stratification for type I diabetes which is primarily influenced by the allelic variants of the DRB1\*04 allele when it is associated to DQB1\*03:02 (DQ8) [8, 9]. An increased risk in the onset of the disease is associated with the presence of DRB1\*04:05 and DRB1\*04:01 variant alleles, followed by an intermediate risk associated to the DRB1\*04:02 and DRB1\*04:04 variants [4-6]. Conversely, the presence of DRB1\*04:03 or DRB1\*04:06 variants confers protection against the disease [8, 10-13].

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

In the Caucasian population, DiabeGen II° step allows to identify subjects potentially at risk of developing T1D (DR4-DQ8 positive), the status of DRB1\*04 up to the fourth digit (e.g. DRB1\*04:01), thus allowing to define in a given subject a risk level. The risk will be higher if the subject has either DRB1\*04:01 or DRB1\*04:05 alleles, while it will be lower or null whether either DRB1\*04:03 or DRB1\*04:06 alleles [6,8,13] are present. All the remaining DRB1\*04 alleles confer a medium risk to the disease [5,6, 8].

Moreover, DiabeGen II° step allows to identify at high resolution level the presence of DQB1\*06:02, protective allele [9,15].

### Description of the DiabeGen II° step kit

The DiabeGen II° step kit detection system requires extracted

and purified DNA samples. Each sample is then amplified by eight (8) Real Time PCR reactions, according to the scheme shown in Table 1.

### Limitations of the test

1. DR4-DQ8 subjects to be tested must carry the DRB1\*04 allele as a single copy (DRB1\*04 in heterozygosis);
2. The kit allow the high resolution of the DRB1\*04 allele, at the fourth digit, in Caucasian subjects carrying the DRB1\*04 variants from DRB1\*04:01 to DRB1\*04:19.
3. The analysis of the rare alleles DRB1\*04:01:09, DRB1\*04:01:10, and DRB1\*04:16 leads to the same results (see Table of Results) and cannot be differentiated one from the other. If present, it is advised to refer to another method to define their nature (e.g. DNA sequencing).
4. The analysis of the rare alleles DRB1\*04:04:02, DRB1\*04:04:06, and DRB1\*04:04:07 and DRB1\*04:15 leads to the same results (see Table of Results) and they cannot be differentiated one from the other. If present, it is advised to refer to another method to define their nature (e.g. DNA sequencing).

### 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 - 8	2 x 1 strip
TE 1X Buffer	2 x 1 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 Taq Polymerase for Real Time. 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 1-8

- Mix 1 (tube) marked with a yellow dot
- Mix 1 to 6 contain primer and probes to detect the status of DRB1\*04 allele up to the fourth digit. Namely, the mixes contain altogether 10 probes, labelled from 1 to 10. The probes, if the proper target is present, will

develop a fluorescent signal on a specific channel of the Thermal Cycler (FAM or VIC/HEX) as shown in Table 1.

- Mix 7 contains primers and probes with different specificity allowing the contemporary amplification of the HLA DQB1\*06:02 allele, which is considered to be protective against T1D predisposition, and human  $\beta$ -Globin which acts as an internal control and guarantees the reliability of the obtained result.
- Mix 8 contains primers and probes for human  $\beta$ -Globin only, which is used as No Template Control (NTC) to detect possible contaminations by human genomic DNA in the Master Mix.

The mixes appear as a pink lyophilised pellet (primers and probes) on the bottom of the tubes. Once dissolved, the solution has a light pink colour. Each strip allows to test 6 samples.

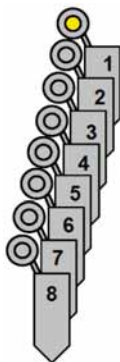


Table 1 Strip with YELLOW DOT		
Tube	FAM channel	VIC/HEX Channel
1 Yellow dot	Probe 1	Probe 2
2	Probe 3	Probe 4
3	Probe 5	
4	Probe 6	Probe 7
5	Probe 8	Probe 9
6	Probe 10	
7	DQB1*06:02	$\beta$ -GLOBIN
8	NO TARGET	$\beta$ -GLOBIN

### Required but not supplied instruments and materials.

1. Laboratory and equipments appropriated to implement tests in Real Time PCR.
2. Eppendorf® like sterile 1,5 ml tubes.
3. Adjustment-volume pipettes (10, 20, 200 and 1000  $\mu$ l).
4. Multi-channel (8 tips) adjustment-volume (5 to 50  $\mu$ l) pipettes.
5. Disposable sterile tips with filter for 10,20,200,1000  $\mu$ l pipettes.
6. 96 well microplates for Real Time PCR with 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 to define the presence/absence of DQB1\*06:02, which is considered to be protective against predisposition to T1D, and to define DRB1\*04 by high resolution within the declared limits (see § Limitations of the test).

### Sensitivity and specificity

31 DNA samples **coming from HLA Reference Centres have been tested**. Results obtained by using DiabeGen II® 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 II® step kit 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 µg/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 II® 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 II® 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

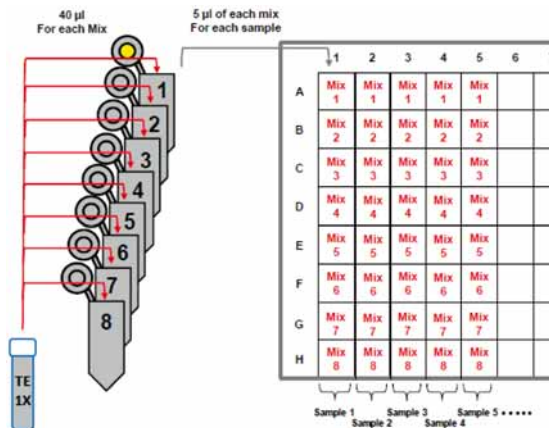
#### Lyophilised Mix Resuspension

1. Remove the 8 tube strip marked with YELLOW dot and place it in a support (not supplied) having the hinge at the far left (Figure 1); doing so the YELLOW 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 40µl 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.
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 µl 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.

Fig. 1



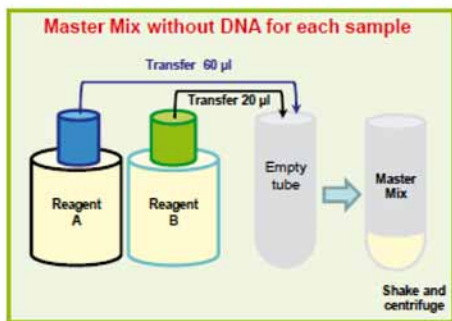
### Preparation of Master Mix

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 µl of Reagent A (blue cap vial) and 20 µl 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.

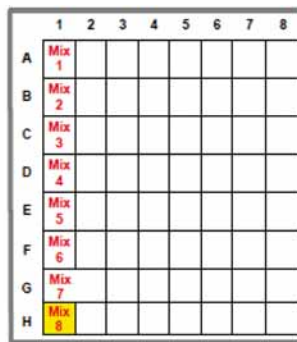
Fig. 2



Transfer 10 µl ONLY in Mix 8

Sample 1

Mix 8= negative control No Template Control (NTC)



4. Take 10  $\mu\text{l}$  of each Master Mix and transfer it into the well containing Mix 8 (corresponding to No Template Control NTC) as it contains primers and probes for human  $\beta$ -Globin only (Figure 3, Mix 8, yellow highlighted).

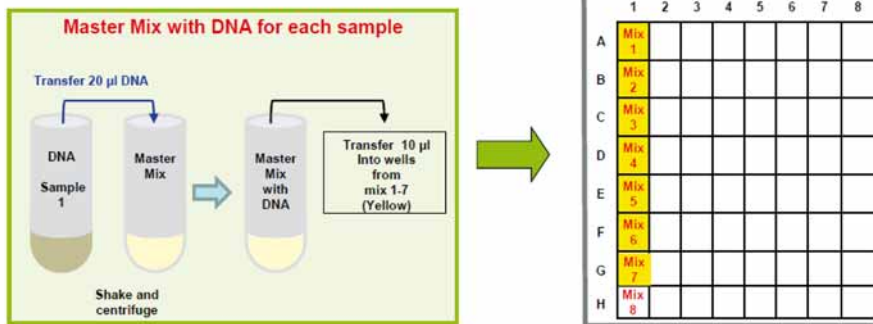
5. **Note:** It is advisable to close wells containing Mix 8, until the plate is fully dispensed in order to minimise possible contaminations (aerosol and environmental contaminations,

etc.).

6. For each sample to be tested, transfer 20  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  of Master Mix with DNA in each well containing the primers and probes (Figure 4, Mix 1 to 7, yellow highlighted).

Fig. 3



8. 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).

9. **The same procedure must be used also 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 II<sup>o</sup>step 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:

Mix	Detector name	Reporter	Quencher	Colour
1, 2, 3, 4, 5, 6	DiabeGen FAM Probe	FAM	NONE	RED
1, 2, 4, 5	DiabeGen HEX Probe	VIC *	NONE	BLUE
7	DiabeGen DQB1*06:02	FAM	NONE	GREEN
7, 8	DiabeGen $\beta$ -globin	VIC *	NONE	BLACK

(\* **NOTE:** for DiabeGen HEX and DiabeGen  $\beta$ -Globin probes, select VIC channel on Applied Biosystems thermal cyclers, and HEX channel on Bio-Rad thermal cyclers.

2. If requested, set *ROX* as *Passive Reference*.

3. **NOTE:** wells containing Mix 8 are used as NTC: please mark them on the plate accordingly.

4. Set the thermal protocol as indicated below:

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

5. Set optical reading of the instrument on Step at 60°C (box highlighted in yellow in the table above).

**6. Important note for Bio-RadCFX96 Touch ad Connect users only:**

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

7. Set the reaction volume at **15 µl**.

8. Start up the reaction.

**Validation of the expected results.**

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

1. Select plate/all samples.
2. Set the following values:

<i>Applied Biosystem 7300, 7500 and 7500 Fast</i>	
<i>Baseline: Start cycle-End cycle</i>	7-17
<i>Threshold FAM and VIC Probes</i>	0,1
<i>Threshold DQB1*06:02 and β-Globin</i>	0,2

<i>Bio-Rad CFX96 Touch and Connect</i>	
<i>Baseline: Start cycle-End cycle</i>	7-17
<i>Threshold FAM and HEX Probes</i>	50
<i>Threshold DQB1*06:02</i>	50
<i>Threshold β-Globin</i>	80

3. Analyse the run.

**Test validation**

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

1. For each sample, check that mix 8 (negative control or NTC) is negative to DiabeGen β-Globin reading filter (VIC or HEX channels). Due to the sensitivity of the detection method (Real Time PCR), positive signals showing Ct values higher than 34 (Ct ≥ 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 significant 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.

2. Check that Mix 8, used as DNA control, is positive to DiabeGen β-Globin (VIC or HEX channel) and shows Ct value falling 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).

3. Values lower than 17 (Ct<17) for FAM and VIC/HEX channels are not possible (check components and the amplification profile) and should be considered.

4. Mix 7 is used for identification of protective allele DQB1\*06:02. If positive for the FAM channel, the Ct value must fall within 18÷35.

5. Mix 1 to 6 could be as follows:

- **Negative for both fluorophors;**
- Positive for FAM channel **ONLY;**
- Positive for VIC/HEX channel **ONLY;**
- **If Positive**, their Ct values must fall within 18-35 range value for both FAM and VIC/HEX channels.

For the interpretation of the results, refer to section "Interpretation of results" and the enclosed table "DiabeGen II" step - Table of results for High Resolution DRB1\*04".

**Results interpretation**

**Presence of the protective allele DQB1\*06:02.**

If the acceptability limits of the test are met and the tested sample shows a positive result for Mix 7 in the FAM channel (Ct values in the 18-35 range), it means that the subject owns the DQB1\*06:02 allele.

Report the positive result in the column "DQB1\*06:02 allele" in the form "DiabeGen II" step - Table of results" and in the column "Presence of protective allele DQB1\*06:02" in the form "DiabeGen II" step - Interpretation of results".

This allele is considered to be protective against genetic predisposition to T1D even if auto-antibodies associated to



TD1 and/or risk alleles are present [15], even when the subject carries an at-risk haplotype on the other chromosome (DR4-DQ8 or DR3-DQ2).

### High resolution of DRB1\*04 allele

1. If the acceptability limits reported in the previous section "Test validation" of the test are met, analyse the positive results for Mix 1-6 for both FAM and VIC/HEX channels and identify the status of the DRB1\*04 allele using as a reference the enclosed table "DiabeGen II" step - High Resolution Table of results for DRB1\*04".

2. For each sample and for each mix (1-6) report the presence/absence of the specific allele by marking the appropriate box in the enclosed "DiabeGen II" Table of results" form included in the kit.

**According to the scheme in the Table of Results, a positive result for the FAM channel is indicated by a red dot, a positive result for VIC/HEX channel is indicated by a blue dot while no dot means absence of any signal.**

3. Once the positive results are marked, identify the corresponding profile in the table "DiabeGen II" Step - Interpretation of high resolution DRB1\*04 results". The status

of DRB1\*04 will correspond to that reported in "DRB1\*" and will indicate whether high or medium predisposition or protection to T1D (see column "Predisposition to type 1 diabetes mellitus") are present.

4. Report the status of DRB1\*04 in the column DRB1\* of the "DiabeGen II" step - Interpretation of results" form, making sure to annotate the proper situation (high, medium or protection).

5. As an example, if a sample would provide the following results:

- **Negative for DQB1\*06:02:**

- do not mark any results under "DQB1\*06:02" column
- mark "No" under "Presence of protective allele DQB1\*06:02" column in the "DiabeGen II" step - Interpretation of results"

- **Positive** for Mix 1 on FAM channel (probe 1);

- **Positive** for Mix 2 on VIC/HEX channel (probe 4);

- **Negative** for Mix 3 on both channels

- **Positive** for Mix 4 on VIC/HEX channel (probe 7);

- **Positive** for Mix 5 on VIC/HEX channel (probe 9);

- and **Negative** for Mix 10 for both channels.

DiabeGen - II <sup>o</sup> step · Result sheet											
Allele DRB1*04										Allele DQB1*06:02	
Sample	Mix 1		Mix 2		Mix 3	Mix 4		Mix 5		Mix 6	Allele DQB1*06:02
	Probe FAM 1	Probe VIC/HEX 2	Probe FAM 3	Probe VIC/HEX 4	Probe FAM 5	Probe FAM 6	Probe VIC/HEX 7	Probe FAM 8	Probe VIC/HEX 9	Probe FAM 10	
1	●			●			●		●		Allele DQB1*06:02
2											
3											

Looking at the form "DiabeGen II" Step - Interpretation of high resolution DRB1\*04 results", the profile of the sample could

correspond to the DRB1\*04:03 allele, which provides with protection against diabetes.

DiabeGen - II <sup>o</sup> step · Interpretation of Results						
Sample	Identification of DRB1*04	Predisposition to Type 1 Diabetes Mellitus due to presence of DRB1*04			Presence of DQB1*06:02, protective allele	
	DRB1*	HIGH	MEDIUM	PROTECTION	YES	NO
1	04:03	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Therefore, the results reported in the form "DiabeGen II" step - Interpretation of results" would appear as follows:

Looking at the "DiabeGen II" step - Table of Results", it appears that the DiabeGen II" step kit is not able to provide with a unambiguous answer when the result could be associated to two combinations. The first combination might see DRB1\*04 identified as DRB1\*04:01:09 or DRB1\*04:01:10 or DRB1\*04:16 and the second as DRB1\*04:04:02 or DRB1\*04:04:06 or DRB1\*04:04:07 or DRB1\*04:15.

These alleles have been found and sequenced and are present in some free on line databases for HLA (<http://www.ebi.ac.uk>; <http://www.allelefrequencies.net>). Nevertheless, these alleles still are very rare in the Caucasian population. As matter of fact, for most of these alleles no data on their frequency in both general and Caucasian populations are reported, with the only exception of DRB1\*04:15 (max reported frequency 0.003%) and DRB1\*04:16 (max. reported frequency 0.1%) (<http://www.allelefrequencies.net> [17]).

If the result of the test should be in agreement with one of the combinations above, it is advised to refer to another technique to for high resolution of the DRB1\*04 allele ( e.g. DNA 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) [18] 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 [19] (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 [21] 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 [21, 22]. This aspect, namely how an early preventive diagnosis can prevent from hospitalization due to ketoacidosis and at least partially preserve patient cells [23], is shared and also reported by the authors reported above [18], for whom, the genetic test for T1D has a moderate value.

### **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 never 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.

#### Features of the biological sample to be tested

1. DiabeGen II<sup>®</sup> Step kit requires the use of EDTA whole blood collected in adequate Vacutainer<sup>®</sup> tubes (eg.K3 and Molecular Biology). For sample storage refer to the indication provided by the tubes manufacturer.
2. DiabeGen II<sup>®</sup> Step has been optimised by using the extraction reagents included in the Eurospital<sup>®</sup> Eu-Gen Estrazione<sup>®</sup> 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 II<sup>®</sup> 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 optional grade tubes, caps and/or adhesive films only.
8. Avoid mixing reagents from different batches.
9. DiabeGen II<sup>®</sup> 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 extraction and purification of DNA.
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 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 in the test sample.
3. Incorrect mix/mixes resuspension of the mix.
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 N Y 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. Fernandez-Suarez, X.M. and M.Y. Galperin. *The 2013 Nucleic Acids Research Database Issue and the online*

*Molecular Biology Database Collection*. Nucleic Acids Res 2013 Jan 1 [cited 41 D1]; 2012/12/04:[D1-7]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23203983>.

18. 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.
19. Hitman, G.A., *The message for MODY*. Diabet Med, 2011. **28**(9): p. 1009.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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 – 11° step



Code 9193, 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](http://www.eurospital.com) - [info@eurospital.com](mailto:info@eurospital.com)

