


RIDA[®] PRECISION ABCB1
real-time PCR

Art. Nr.: Y5500
50 Reaktionen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 -20 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Verwendungszweck

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®PRECISION ABCB1 ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis der ABCB1-Genvarianten (SNPs: rs2032583, rs2235015) in humanen EDTA-Vollblutproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Depressionen gehören zu den schwerwiegendsten und verbreitetsten psychischen Störungen. Weltweit sind schätzungsweise 350 Millionen Menschen an schweren Depressionen erkrankt.¹ Zur Behandlung von mittelgradigen und schweren depressiven Episoden wird der Einsatz von Antidepressiva in Kombination mit Psychotherapie indiziert.² Weniger als ein Drittel aller Patienten erreichen eine volle Remission nach Erstbehandlung mit Antidepressiva.³ Mit dem ausbleibenden Behandlungserfolg vergehen mehrere Monate, bis das richtige Medikament gefunden wird und unnötige Nebenwirkungen gehen einher. Erst nach mehreren Behandlungsversuchen remittieren etwa zwei Drittel aller schwer depressiven Patienten.⁴

Die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, die durch das in den Blutgefäßen lokalisierte P-Glykoprotein bestimmt wird, ist ein wesentlicher Einflussfaktor für die Wirksamkeit von Antidepressiva.⁵ Das P-Glykoprotein ist das Genprodukt des ABCB1-Gens (auch als *multidrug-resistance gene 1 (MDR1)* bezeichnet), das an der Blut-Hirn-Schranke auf der dem Gefäßlumen zugewandten Seite der Endothelzellen der kleinen Hirngefäße exprimiert wird.⁶ Mit dem ABCB1-Genest, der am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München entwickelt wurde, lassen sich spezifische DNA-Sequenzvarianten im ABCB1-Gen detektieren welches für das P-Glykoprotein kodiert.⁷ Aufgrund der Polymorphismen können Patienten identifiziert werden, bei denen viele der gängigen Antidepressiva die Blut-Hirn-Schranke weniger leicht passieren können und die deshalb ungenügend auf die Therapie ansprechen. In Studien von Breitenstein et al., 2014 und Sarginson et al., 2010 wurde gezeigt, dass sich eine durch das ABCB1-Testergebnis geleitete Depressionsbehandlung positiv auf Remissionsraten depressiver Patienten auswirkt.^{6,8}

3. Testprinzip

RIDA®PRECISION ABCB1 ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis der ABCB1-Genvarianten (SNPs: rs2032583, rs2235015) in humanen EDTA-Vollblutproben.

Nach der DNA-Isolierung werden die DNA-Abschnitte, welche die zu analysierenden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, engl. *single nucleotide polymorphisms*) enthalten, mittels real-time PCR amplifiziert. Die Genotypisierung der verschiedenen Allele erfolgt über spezifische Fluoreszenz-markierte Sonden (s. Tab. 7).

4. Packungsinhalt

Tab.1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 50 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	1x 1100 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x 40 µl	dunkelrot
A	Control A	1x 100 µl	dunkelblau
B	Control B	1x 100 µl	dunkelgrün

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquotes nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

- Der RIDA®PRECISION ABCB1 real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:
- Extraktionsplattform:
 - Maxwell® RSC Instrument (Promega)
- Real-time PCR-Geräte:

Roche:	LightCycler® 480II
Roche:	cobas z 480 Analyzer
Agilent Technologies:	Mx3005P
Bio-Rad:	CFX96™

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter ridaprecision@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und cobas z 480 Analyzer
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße und Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Das Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften

Weitere Details siehe Material Safety Data Sheets (MSDS) unter www.r-biopharm.com

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 Probenlagerung

Der Test ist für die Untersuchung humaner EDTA-Vollblutproben entwickelt worden. Bis zur DNA-Extraktion sind die Proben bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden und bei 2 – 8 °C bis zu 72 Stunden zu lagern.⁹ Eine mikrobielle Kontamination der Proben ist unbedingt zu vermeiden. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut

Für die DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC Instrument (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Kontrolle A und eine Kontrolle B mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 2). Vor der Benutzung den Reaction Mix, die Taq-Polymerase, die Control A und die Control B auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 2: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

Bei jedem Testlauf muss eine Kontrolle A und B mitgeführt werden.

Kontrolle A: Je 5 µl Control A zum vorgelegten Master-Mix als Kontrolle A pipettieren.

Kontrolle B: Je 5 µl Control B zum vorgelegten Master-Mix als Kontrolle B pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen.

9.3 Geräteeinstellungen

Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung (s. Tab. 3 für LightCycler® 480II und cobas z 480 Analyzer; s. Tab. 5 für Mx3005P und CFX96™) starten. Der RIDA®PRECISION ABCB1 Test kann mit weiteren R-Biopharm Assays unter der Verwendung des Universalprofils kombiniert werden (s. Tab. 4 bzw. Tab. 6).

Tab. 3: Real-time PCR DNA-Profil für LightCycler® 480II und cobas z 480 Analyzer

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing / Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Bemerkung: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 4: Real-time PCR Universalprofil für LightCycler® 480II und cobas z 480 Analyzer

Reverse Transkription	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing / Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Bemerkung: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 5: Real-time PCR DNA-Profil für Mx3005P und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing / Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Bemerkung: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Real-time PCR Universalprofil für Mx3005P und CFX96™

Reverse Transkription	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing / Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Bemerkung: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bezeichnung Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	rs2032583 T-Allel	465/510	83T	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	rs2032583 C-Allel	533/580	83C	
	rs2235015 G-Allel	533/610	15G	
	rs2235015 T-Allel	618/660	15T	
Roche cobas z 480 Analyzer	rs2032583 T-Allel	465/510	83T	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	rs2032583 C-Allel	540/580	83C	
	rs2235015 G-Allel	540/610	15G	
	rs2235015 T-Allel	610/670	15T	
Agilent Techn. Mx3005P	rs2032583 T-Allel	FAM	83T	-
	rs2032583 C-Allel	HEX	83C	
	rs2235015 G-Allel	ROX	15G	
	rs2235015 T-Allel	Cy5	15T	
Bio-Rad CFX96™	rs2032583 T-Allel	FAM	83T	-
	rs2032583 C-Allel	VIC	83C	
	rs2235015 G-Allel	ROX	15G	
	rs2235015 T-Allel	Cy5	15T	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Kontrolle A und B müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8).

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

	Genpolymorphismen			
	rs2032583 T-Allel	rs2032583 C-Allel	rs2235015 G-Allel	rs2235015 T-Allel
Detektionskanal Bezeichnung	83T	83C	15G	15T
Kontrolle A	positiv	negativ	positiv	negativ
Kontrolle B	negativ	positiv	negativ	positiv

Die Zielgen Ct-Werte der Kontrolle A und B sind dem Quality Assurance Certificate (QAC) zu entnehmen.

Wenn eine der beiden Kontrollen, Kontrolle A oder B, nicht spezifikationsgerecht ist, ist der gesamte PCR-Lauf zu wiederholen.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

	Genpolymorphismen				Ergebnis
	rs2032583 T-Allel	rs2032583 C-Allel	rs2235015 G-Allel	rs2235015 T-Allel	
Detektionskanal Bezeichnung	83T	83C	15G	15T	
Kontrolle A	positiv	negativ	positiv	negativ	
Kontrolle B	negativ	positiv	negativ	positiv	
Bsp. Probe 1	positiv	negativ	positiv	negativ	rs2032583 TT rs2235015 GG
Bsp. Probe 2	positiv	negativ	negativ	positiv	rs2032583 TT rs2235015 TT
Bsp. Probe 3	positiv	negativ	positiv	positiv	rs2032583 TT rs2235015 GT
Bsp. Probe 4	negativ	positiv	positiv	negativ	rs2032583 CC rs2235015 GG
Bsp. Probe 5	positiv	positiv	positiv	negativ	rs2032583 TC rs2235015 GG
Bsp. Probe 6	negativ	positiv	negativ	positiv	rs2032583 CC rs2235015 TT
Bsp. Probe 7	negativ	positiv	positiv	positiv	rs2032583 CC rs2235015 GT
Bsp. Probe 8	positiv	positiv	negativ	positiv	rs2032583 TC rs2235015 TT
Bsp. Probe 9	positiv	positiv	positiv	positiv	rs2032583 TC rs2235015 GT
Bsp. Probe 10	negativ	negativ	negativ	negativ	Invalide (Zielgene sind nicht nachweisbar)

Ein Signal wird als negativ bewertet, wenn die Kontrollen A und B spezifikationsgerecht sind und die Fluoreszenz der Probe $\leq 10\%$ der Fluoreszenz der Kontrollen A und B liegt.

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn entweder beide Kontrollen oder nur Kontrolle A oder B im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen. Der gesamte PCR-Lauf ist zu wiederholen.

Wenn die Probe und beide Kontrollen, Kontrolle A und B, im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen (s. Tab. 9, Bsp. Probe 10), wurde eine Komponente entweder vergessen zu pipettieren oder ist nicht mehr funktional.

Wenn beide Kontrollen, Kontrolle A und B, im Nachweissystem die spezifikationsgerechte Amplifikationen zeigen, die Probe allerdings keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt (s. Tab. 9, Bsp. Probe 10), wurde entweder die DNA nicht zugegeben oder ungeeignete Template-DNA (Qualität, PCR-Inhibitoren) verwendet.

12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für humane EDTA-Vollblutproben validiert.
2. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
3. Mit dem Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchung kann eine Aussage zur Passage eines Antidepressivums über die Blut-Hirn-Schranke getroffen werden, jedoch nicht über dessen klinische Wirkung.
4. Der exakte Kausalzusammenhang zwischen genetischen Varianten und dem Ansprechen auf Pharmakotherapie ist nicht abschließend geklärt.
5. Das Gendiagnostikgesetz (GenDG) setzt für alle genetischen Analysen gemäß GenDG eine ausführliche Aufklärung und eine schriftliche Einwilligung der Patienten voraus.

13. Leistungsmerkmale










13.1 Interferierende Substanzen

Die RIDA®PRECISION ABCB1 real-time PCR wurde für humane EDTA-Vollblutproben validiert. Es wurde keine Interferenz zu den folgenden Substanzen festgestellt (s. Tab. 10):

Tab. 10: Liste der Substanzen mit den im Test eingesetzten Konzentrationen

Substanzen	Konzentrationen
Heparin	15 U/ml
Cholesterin	3,0 mg/ml
Bilirubin	0,1 mg/ml
Hämoglobin	0,2 mg/ml
K ₂ EDTA	1,8 mg/ml

Symbolerklärungen

	Für die <i>in-vitro</i> Diagnostik
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lotnummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl der Präparationen
	Herstellungsdatum
	Hersteller

Literatur

1. World Health Organization, Depression Reviewed April 2016, Verfügbar von: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>, [Zugriff am: 19.09.2016].
2. DGPPN, BÄK, KBV, AWMF, AkdÄ, BPtK, BApK, DAGSHG, DEGAM, DGPM, DGPs, DGRW (Hrsg.) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression*. S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression – Langfassung, 2. Auflage. 2015. Version 3. Verfügbar von: www.depression.versorgungsleitlinien.de; [Zugriff am: 19.09.2016; 3.5.6 Kombination von Antidepressiva und Psychotherapie]; DOI: 10.6101/AZQ/000277.
3. Hall-Flavin DK, Winner JG, Allen JD, Jordan JJ, Nesheim RS, Drews MS, Eisterhold LL, Biernacka JM, Mrazek DA (2012) Using a pharmacogenomic algorithm to guide the treatment of depression. *Transl Psychiatry*, 2, e172.
4. Rush AJ, Kraemer HC, Sackeim HA, Fava M, Trivedi MH, Frank E, Ninan PT, Thase ME, Gelenberg AJ, Kupfer DJ, Regier DA, Rosenbaum JF, Ray O, Schatzberg AF (2006) Report by the ACNP Task Force on response and remission in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 31:1841-53.

5. Holsboer-Trachsler E, Hättenschwiler J, Beck J, Brand S, Hemmeter UM, Keck ME, Rennhard S, Hatzinger M, Merlo M, Bondolfi G, Preisig M, Gehret A, Bielinski D, Seifritz E (2016): Die Akutbehandlung depressiver Episoden; Die Somatischen Behandlungen der unipolaren depressiven Störung: Update 2016, Schweizerisches Medizin-Forum, 16(35):716-724.
6. Sarginson JE, Lazzeroni LC, Ryan HS, Ershoff BD, Schatzberg AF, Murphy Jr GM (2010) ABCB1 (MDR1) polymorphisms and antidepressant response in geriatric depression. Pharmacogenetics and Genomics, Vol 00 No 00, 1744-6872.
7. Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M, Dose T, Ebinger M, Rosenhagen M, Kohli M, Kloiber S, Salyakina D, Bettecken T, Specht M, Pütz B, Binder EB, Müller-Myhsok B, Holsboer F (2008) Polymorphisms in the Drug Transporter Gene ABCB1 Predict Antidepressant Treatment Response in Depression. Neuron, 57, 203-209.
8. Breitenstein B, Scheuer S, Pfister H, Uhr M, Lucae S, Holsboer F, Ising M, Brückl TM (2014) The clinical application of ABCB1 genotyping in antidepressant treatment: a pilot study. CNS Spectr., 19(2);165-75.
9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.

RIDA[®]PRECISION ABCB1

real-time PCR

1. Intended use

For *in-vitro* diagnostic use. RIDA[®]PRECISION ABCB1 is a multiplex real-time PCR for the direct qualitative detection of ABCB1 gene variants (SNPs: rs2032583, rs2235015) in human EDTA whole blood samples.

2. Summary and explanation of the test

Depression is one of the most serious mental disorders being estimated to affect about 350 million people worldwide.¹ Current treatment of moderate and severe depression includes antidepressants in combination with psychotherapy.² Less than one third of patients suffering from depression experience complete remission of their illness when initially treated with antidepressant agents.³ Often it may take several months to achieve a successful treatment which can cause unnecessary side effects. Approximately only two third of patients suffering from severe depression experience remission after several treatment trials.⁴

A key factor for the effectiveness of antidepressants is the ability to pass the blood-brain barrier, which is regulated by transporter molecules such as P-glycoproteins.⁵ The P-glycoprotein, encoded by the ABCB1 gene (also known as multidrug-resistance gene 1 (MDR1)), is a transmembrane protein located within the luminal membrane of endothelial cells which form the blood-brain barrier.⁶ The ABCB1 genotyping assay, developed at Max Planck Institute of Psychiatry in Munich, allows detection of specific sequence variations of the ABCB1 gene encoding the P-glycoprotein.⁷ Due to the gene polymorphisms patients can be identified which have a blood-brain barrier that is less permeable for many of the common antidepressants and which respond insufficient to therapy therefore. Previous studies from Breitenstein et al., 2014 and Sarginson et al., 2010 showed that use of the ABCB1 genotyping assay led to a positive remission outcome and enables the effective treatment for patients suffering from depression.^{6,8}

3. Test principle

RIDA®PRECISION ABCB1 is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection of ABCB1 gene variants (SNPs: rs2032583, rs2235015) in human EDTA whole blood samples.

After DNA isolation, amplification of the DNA fragments, which include the target SNPs, occur. Genotyping of the different alleles occur with specific fluorescence-marked probes (see Tab. 7).

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 50 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	1x 1100 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x 40 µl	dark red
A	Control A	1x 100 µl	dark blue
B	Control B	1x 100 µl	dark green

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw and fully defrost reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 – 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 – 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

- The RIDA®PRECISION ABCB1 real-time PCR Assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:
- Extraction platform:
 - Maxwell® RSC Instrument (Promega)
- Real-time PCR instruments:

Roche:	LightCycler® 480II
Roche:	cobas z 480 Analyzer
Agilent Technologies:	Mx3005P
Bio-Rad:	CFX96™

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at ridaprecision@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler® 480II and cobas z 480 Analyzer
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

This test must be carried out only by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Material Safety Data Sheets (MSDS) at www.r-biopharm.com

8. Sample collection and storage

8.1 Sample storage

The test can be carried out with human EDTA whole blood samples. Prior to DNA extraction blood samples can be stored at room temperature for up to 24 hours or at 2 – 8 °C for up to 72 hours.⁹ Microbial contamination of the samples must be avoided. Using heat-inactivated, lipaemic, haemolytic, icteric or turbid samples can lead to false results.

8.2 Sample preparation

8.2.1 DNA Isolation from EDTA whole blood

To isolate DNA from human EDTA whole blood, we recommend using a commercially available DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC Instrument (Promega)). Extract DNA according to manufacturer's instructions.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One control A and control B must be included in each assay run.

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 2). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Control A** and **Control B** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 – 8 °C).

Tab. 2: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20.0 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Sample: Add 5 µl DNA-Extract to the pre-pipetted Master-Mix.

One control A and B must be included in each assay run.

Control A: Add 5 µl Control A as control A to the pre-pipetted Master-Mix.

Control B: Add 5 µl Control B as control B to the pre-pipetted Master-Mix.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument.

9.3 PCR Instrument Set-up

The PCR reaction should be started according to the PCR instrument Set-up (see Tab. 3 for LightCycler® 480II and cobas z 480 Analyzer; see Tab. 5 for Mx3005P and CFX96™). The RIDA®PRECISION ABCB1 and other R-Biopharm assays can be combined on one PCR instrument by using the Set-up universal profile (see Tab. 4 or see Tab. 6).

Tab. 3: Real-time PCR DNA profile for LightCycler® 480II and cobas z 480 Analyzer

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Cycles</u>	45 Cycles
PCR Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing / Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 4: Real-time PCR universal profile for LightCycler® 480II and cobas z 480 Analyzer

Reverse Transcription	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Cycles</u>	45 Cycles
PCR Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing / Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 5: Real-time PCR DNA profile for Mx3005P and CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Cycles</u>	45 Cycles
PCR Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing / Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 6: Real-time PCR universal profile for Mx3005P and CFX96™

Reverse Transcription	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
<u>Cycles</u>	45 Cycles
PCR Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing / Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.4 Detection Channel Set-up

Tab. 7: Selection of detection channels

Real-time PCR Instrument	Detection	Detection Channel	Designation Detection Channel	Note
Roche LightCycler® 480II	rs2032583 T-allele	465/510	83T	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	rs2032583 C-allele	533/580	83C	
	rs2235015 G-allele	533/610	15G	
	rs2235015 T-allele	618/660	15T	
Roche cobas z 480 Analyzer	rs2032583 T-allele	465/510	83T	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	rs2032583 C-allele	540/580	83C	
	rs2235015 G-allele	540/610	15G	
	rs2235015 T-allele	610/670	15T	
Agilent Techn. Mx3005P	rs2032583 T-allele	FAM	83T	-
	rs2032583 C-allele	HEX	83C	
	rs2235015 G-allele	ROX	15G	
	rs2235015 T-allele	Cy5	15T	
Bio-Rad CFX96™	rs2032583 T-allele	FAM	83T	-
	rs2032583 C-allele	VIC	83C	
	rs2235015 G-allele	ROX	15G	
	rs2235015 T-allele	Cy5	15T	

10. Quality control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to manufacturer`s instructions. Positive and negative controls have to show correct results (see Tab. 8) in order to determine a VALID run.

Tab. 8: For a VALID run, the following conditions must be met:

	Gene polymorphisms			
	rs2032583 T-allele	rs2032583 C-allele	rs2235015 G-allele	rs2235015 T-allele
Designation Detection Channel	83T	83C	15G	15T
Control A	positive	negative	positive	negative
Control B	negative	positive	negative	positive

See Quality Assurance Certificate (QAC) for target Ct values of control A and B.

The PCR run must be rerun, if one of the controls, control A or B, show no amplification signal in the detection system according to specifications.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to table 9.

Tab. 9: Sample interpretation

	Gene polymorphisms				Result
	rs2032583 T-allele	rs2032583 C-allele	rs2235015 G-allele	rs2235015 T-allele	
Designation Detection Channel	83T	83C	15G	15T	
Control A	positive	negative	positive	negative	
Control B	negative	positive	negative	positive	
E.g. sample 1	positive	negative	positive	negative	rs2032583 TT rs2235015 GG
E.g. sample 2	positive	negative	negative	positive	rs2032583 TT rs2235015 TT
E.g. sample 3	positive	negative	positive	positive	rs2032583 TT rs2235015 GT
E.g. sample 4	negative	positive	positive	negative	rs2032583 CC rs2235015 GG
E.g. sample 5	positive	positive	positive	negative	rs2032583 TC rs2235015 GG
E.g. sample 6	negative	positive	negative	positive	rs2032583 CC rs2235015 TT
E.g. sample 7	negative	positive	positive	positive	rs2032583 CC rs2235015 GT
E.g. sample 8	positive	positive	negative	positive	rs2032583 TC rs2235015 TT
E.g. sample 9	positive	positive	positive	positive	rs2032583 TC rs2235015 GT
E.g. sample 10	negative	negative	negative	negative	Invalid (Target genes are not detectable)

A signal is evaluated negative, if the controls A and B show an amplification signal in the detection system according to specifications and the fluorescence of the sample is $\leq 10\%$ of the fluorescence of the controls A and B.

The PCR run is not evaluable, if either controls A and B or control A or B show no amplification signal in the detection system. The rerun of the PCR run is recommended.

If the sample and controls A and B show no amplification signal in the detection system (see Tab. 9, E.g. sample 10) either a component was not added to the PCR-Mix or a component was non-functional.

If controls A and B show an amplification signal in the detection system according to specifications but the sample show no amplification signal in the detection system according to specifications (see Tab. 9, E.g. sample 10) either the sample was not added to the PCR-Mix or unsuitable template DNA (Quality, PCR inhibitors) was used.

12. Limitations of the method

1. This assay is validated for human EDTA whole blood samples only.
2. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
3. The result of this molecular genetic analysis gives information about the permeability of antidepressants through the blood-brain barrier only and not about its clinical effect.
4. The exact causal relation between genetic variants and the response to pharmacotherapy is not fully clarified.
6. According to Gendiagnostikgesetz (Genetic Diagnostic Act) patients get a comprehensive genetic counselling before the genetic analysis. Also genetic testing will not be conducted without the patient's active written agreement to the test.

13. Performance characteristics










13.1 Interfering substances

The RIDA®PRECISION ABCB1 real-time PCR is validated for human EDTA whole blood samples only. No interference could be detected with the following substances (see Tab. 10):

Tab. 10: List of substances and the concentration of the substances used for testing

Substances	Concentration
Heparin	15 U/ml
Cholesterol	3.0 mg/ml
Bilirubin	0.1 mg/ml
Haemoglobin	0.2 mg/ml
K ₂ EDTA	1.8 mg/ml

Explanation of Symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of test
	Date of manufacture
	Manufacturer

Literature

1. World Health Organization, Depression Reviewed April 2016, Verfügbar von: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>, [Zugriff am: 19.09.2016].
2. DGPPN, BÄK, KBV, AWMF, AkdÄ, BPtK, BApK, DAGSHG, DEGAM, DGPM, DGPs, DGRW (Hrsg.) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression*. S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression – Langfassung, 2. Auflage. 2015. Version 3. Verfügbar von: www.depression.versorgungsleitlinien.de; [Zugriff am: 19.09.2016; 3.5.6 Kombination von Antidepressiva und Psychotherapie]; DOI: 10.6101/AZQ/000277.
3. Hall-Flavin DK, Winner JG, Allen JD, Jordan JJ, Nesheim RS, Drews MS, Eisterhold LL, Biernacka JM, Mrazek DA (2012) Using a pharmacogenomic algorithm to guide the treatment of depression. *Transl Psychiatry*, 2, e172.
4. Rush AJ, Kraemer HC, Sackeim HA, Fava M, Trivedi MH, Frank E, Ninan PT, Thase ME, Gelenberg AJ, Kupfer DJ, Regier DA, Rosenbaum JF, Ray O, Schatzberg AF (2006) Report by the ACNP Task Force on response and remission in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 31:1841-53.

5. Holsboer-Trachsler E, Hättenschwiler J, Beck J, Brand S, Hemmeter UM, Keck ME, Rennhard S, Hatzinger M, Merlo M, Bondolfi G, Preisig M, Gehret A, Bielinski D, Seifritz E (2016): Die Akutbehandlung depressiver Episoden; Die Somatischen Behandlungen der unipolaren depressiven Störung: Update 2016, Schweizerisches Medizin-Forum, 16(35):716-724.
6. Sarginson JE, Lazzeroni LC, Ryan HS, Ershoff BD, Schatzberg AF, Murphy Jr GM (2010) ABCB1 (MDR1) polymorphisms and antidepressant response in geriatric depression. Pharmacogenetics and Genomics, Vol 00 No 00, 1744-6872.
7. Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M, Dose T, Ebinger M, Rosenhagen M, Kohli M, Kloiber S, Salyakina D, Bettecken T, Specht M, Pütz B, Binder EB, Müller-Myhsok B, Holsboer F (2008) Polymorphisms in the Drug Transporter Gene ABCB1 Predict Antidepressant Treatment Response in Depression. Neuron, 57, 203-209.
8. Breitenstein B, Scheuer S, Pfister H, Uhr M, Lucae S, Holsboer F, Ising M, Brückl TM (2014) The clinical application of ABCB1 genotyping in antidepressant treatment: a pilot study. CNS Spectr., 19(2);165-75.
9. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005.