



Genvinset[®]

FIIFV multiplex

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro multiplexní detekci
mutace G20210A protrombinu (FII) i
mutace G1691A faktoru V*

Pro použití v diagnostice in vitro

Rev. 01 / 2023-09-13



Camino del Pílon 86, Casa 7, Local
50011 – Zaragoza (Spain)



www.bdrdiagnostics.com



Kódy výrobků:

GVS-FIIFV-24 (24 testů)

GVS-FIIFV-48 (48 testů)

GVS-FIIFV-96 (96 testů)

UDI-DI

8437016942765

8437016942772

8437016942789

Skladování:

od -30°C do -18°C

Genvinset[®]

FIFV multiplex

Obsah

1- Informace o bezpečnosti	2
2- Zamýšlené použití	2
3- Shrnutí a vysvětlení	3
4- Principy postupu	3
5- Obsah sady	4
6- Skladování soupravy	5
7- Požadované, ale nedodané materiály	5
8- Odběr a příprava vzorků	6
9- Pracovní postup	6
10- Výsledky	7
11- Kontrola kvality	9
12- Specifická operační data	10
13- Omezení postupu	13
14- Průvodce řešením problémů	13
15- Odkazy	15
16- Upozornění pro zákazníka	15
17- Kontrola změn	16
18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích	16

1- Informace o bezpečnosti

Přečtete si prosím kompletně tento návod k použití a dodržujte jej při používání této IVD soupravy.

Soupravu IVD musí používat odborníci, kteří mají velké zkušenosti s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

V případě pochybností ohledně pracovního postupu se obraťte na výrobce na telefonním čísle +34 976 094 603 nebo na e-mailové adrese customersupport@bdrdiagnostics.com.

Souprava IVD má omezenou dobu použitelnosti. Před použitím soupravy se ujistěte, že doba použitelnosti neuplynula. Reagencie ze soupravy po uplynutí doby použitelnosti by mohly být znehodnoceny, což by mohlo zhoršit výsledky. Reagencie s prošlou dobou použitelnosti zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.

Kontaminace vzorku nebo činidla může vést k nesprávným výsledkům. Při extrakci DNA a manipulaci se vzorkem a činidly buďte opatrní.

Tato sada se může při přepravě nebo skladování poškodit. V případě podezření na poškození během přepravy soupravu nepoužívejte. Pečlivě dodržujte podmínky skladování popsané na štítku a v příručce IFU.

Zajistěte, aby bylo s odpadem nakládáno v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s odpadem může vést ke kontaminaci životního prostředí.

Toxikologické vlastnosti soupravy nebyly důkladně prozkoumány, proto se doporučuje vyhnout se kontaktu s kůží a sliznicemi. Nepožívejte. Na vyžádání jsou zákazníkovi k dispozici Bezpečnostní listy (MSDS).

Ujistěte se, že tato souprava je vhodná pro požadovanou analýzu klinickým lékařem.

2- Zamýšlené použití

Genvinset® FIIFV multiplex je poloautomatická souprava pro in vitro kvalitativní detekci mutace G20210A (NCBI dbSNP rs1799963; NM_000506.5:c.*97G>A) v genu pro protrombin (FII) (OMIM: 176930) a mutace G1691A (NCBI dbSNP rs6025; NM_000130.5:c.1601) v genu pro protrombin (FII).G>A) v genu pro faktor V (FV) (OMIM: 612309) spojená s rizikem trombofilie v genomové DNA extrahované z plné krve pomocí technologie Real-Time PCR se specifickými sondami TaqMan®.

U pacienta, kterého doporučí příslušný odborný lékař (kardiolog, internista), a s přihlédnutím ke slčitelnosti uváděných příznaků; abnormální sraženiny, které mohou způsobit dlouhodobé nebo život ohrožující zdravotní problémy, nejčastěji v nohách a plicích, a/nebo jeho rodinná anamnéza (například přímý předek, který měl epizody trombózy), může být provedeno stanovení mutace v genech FII a FV. Výsledky tohoto testu by neměly být jedině, na nichž je založeno terapeutické rozhodnutí, a měly by být použity jako pomůcka při diagnostice spolu s výsledky dalších markerů onemocnění.

Předpokládaným uživatelem soupravy je technický personál vyškolený k provádění protokolu a interpretaci výsledků popsaných v tomto dokumentu.

3- Shrnutí a vysvětlení

Trombofilie spočívá v predispozici k tvorbě krevních sraženin, která je způsobena základním hyperkoagulačním stavem způsobeným dědičnými nebo získanými poruchami krevní srážlivosti nebo fibrinolýzy ¹.

Protrombin (známý také jako faktor II) je bílkovina koagulační kaskády, která je nezbytná pro tvorbu krevních sraženin. Mutace G20210A (NCBI dbSNP rs1799963; NM_000506.5:c.*97G>A) v genu pro protrombin je spojena se zvýšeným rizikem trombózy². FII G20210A je missense mutace, která vede k přechodu guaninu na adenin. Ačkoli molekulární mechanismus, který je základem mutace G20210A, je zatím nejasný, zdá se, že způsobuje nadměrnou expresi protrombinového genu, a tím zvyšuje riziko trombózy ³.

Kromě toho je dobře zdokumentováno, že další missense mutace, mutace G1691A (NCBI dbSNP rs6025; NM_000130.5:c.1601G>A) v genu, který kóduje koagulační faktor V (známý jako FV Leiden nebo FVL), je také spojena se zvýšeným rizikem trombofilie a žilní trombózy ^{1,4}. Molekulárním základem FV Leiden je missense mutace na pozici G1691A, která vede k záměně argininu (R506) za glutamin (R506Q) na jednom ze štěpných míst aktivovaného proteinu C (APC). V důsledku toho se aktivovaný faktor V stává rezistentním vůči štěpení APC a rychlost jeho inaktivace se desetkrát zpomalí, čímž se zachová jeho prokoagulační aktivita ⁵⁻⁷.

Tyto dvě mutace se dědí autozomálně dominantně a jsou nejčastějším rizikovým faktorem trombózy. V literatuře byl navržen multifaktoriální model rizika žilního tromboembolismu (VTE), který závisí na interakcích s různými trombofilními mutacemi. Tak bylo zdokumentováno, že pacienti nesoucí jak mutaci faktoru V Leiden, tak mutaci FII G20210A mají třikrát vyšší riziko VTE ⁸. Byl rovněž naznačen možný vliv dalších vlastností, jako je délka trvání počáteční antikoagulační léčby a současná přítomnost jiných trombofilních stavů, na riziko recidivy u pacientů nesoucích mutace v heterozygotním stavu ⁹. Absolutní trombotické riziko tedy závisí na interakci mezi těmito a dalšími dědičnými trombofilními mutacemi nebo získanými vysoce rizikovými faktory, jako jsou věk, těhotenství, imobilizace, dlouhé cestování, operace, nádorová onemocnění, užívání perorální antikoncepce a hormonální substituční terapie ¹⁰⁻¹¹.

4- Principy postupu

Test je založen na technologii PCR v reálném čase s hydrolýzními sondami. Každý vzorek je analyzován pomocí:

- Pár primerů pro amplifikaci fragmentu genu pro faktor V (F5) a pár primerů pro amplifikaci fragmentu genu pro faktor II (F2). Amplifikované fragmenty obsahují sekvence, ve kterých se nachází mutace G1691A i G20210A.
- Následující alelově specifické hydrolyzační sondy, které jsou na 5' konci označeny:
 - Fluorofoř HEX pro detekci alely divokého typu FV (wt 1691G).
 - Fluorofoř FAM pro detekci mutantní alely FV (mut 1691A).
 - Fluorofoř Cy5 pro detekci alely divokého typu FII (wt 20210G).
 - Fluorofoř ROX pro detekci mutantní alely FII (mut 20210A).

Všechny tyto čtyři sondy jsou na 3' konci označeny zhášedlem, které potlačuje fluorescenci fluoroforů, když je sonda neporušená.

V průběhu PCR reakce štěpí 5'→3' exonukleáza Taq polymerázy sondy připojené k jejich komplementární sekvenci, čímž se oddělí fluorofor od zhášedla a vzniká fluorescenční signál úměrný množství vzniklého PCR produktu, který je monitorován v reálném čase v PCR přístroji. Takto:

- V případě homozygotních vzorků divokého typu G1691A (FV 1691G/G) se sonda specifická pro wt alelu značená HEX váže na komplementární sekvenci amplifikovaného genu a je pozorován následující průběh:
 - fluorescenční signál v kanálu HEX a
 - žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM.
- V přítomnosti vzorků homozygotní mutace G1691A (FV 1691A/A) se sonda specifická pro mutovanou alelu značená FAM váže na svou amplifikovanou komplementární sekvenci. V tomto případě se detekuje následující:
 - fluorescenční signál v kanálu FAM a
 - žádný signál nebo slabý signál v kanálu HEX.
- V případě heterozygotních vzorků G1691A (FV 1691G/A) se obě sondy vážou na amplifikované sekvence DNA a generují signály v kanálech FAM i HEX.
- V přítomnosti homozygotních vzorků divokého typu G20210A (FII 20210G/G) se sonda specifická pro wt alelu značená Cy5 váže na komplementární sekvenci amplifikovaného genu a je pozorována následující situace:
 - fluorescenční signál v kanálu Cy5 a
 - žádný signál nebo slabý signál v kanálu ROX.
- V přítomnosti vzorků homozygotních mutantů G20210A (FII 20210A/A) se sonda značená ROX specifická pro mutovanou alelu váže na svou amplifikovanou komplementární sekvenci. V tomto případě se detekuje následující:
 - fluorescenční signál v kanálu ROX a
 - žádný signál nebo slabý signál v kanálu Cy5.
- V případě heterozygotních vzorků G20210A (FII 20210G/A) se obě sondy vážou na amplifikované sekvence DNA a generují signály v kanálech ROX i Cy5.

5- Obsah soupravy

→ GVS-FIIFV-24 (24 testů)

- GVS-FIIFV-PM: Modrý uzávěr: 1 lahvička x 192 µl směsi primerů (PM)
- GVS-FIIFV-MM: 1 lahvička x 240 µl Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-FIIFV-C1: 1 injekční lahvička x 15 µl Kontrola WT (FV wt-FII wt) - zelený uzávěr
- GVS-FIIFV-C2: 1 lahvička x 15 µl Kontrolní MUT (FV mut-FII mut) - Zelený uzávěr s oranžovou nálepkou
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

→ GVS-FIIFV-48 (48 testů)

- GVS-FIIFV-PM: 2 lahvičky x 192 µl Primer Mix (PM) - modrý uzávěr
- GVS-FIIFV-MM: 2 lahvičky x 240 µl Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-FIIFV-C1: 1 injekční lahvička x 15 µl Kontrola WT (FV wt-FII wt) - zelený uzávěr
- GVS-FIIFV-C2: 1 lahvička x 15 µl Kontrolní MUT (FV mut-FII mut) - Zelený uzávěr s oranžovou nálepkou
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

→ GVS-FIIFV-96 (96 testů) (*)

- GVS-FIIFV-PML: 1 lahvička x 768 µl Primer Mix (PM) - modrý uzávěr
- GVS-FIIFV-MML: 1 lahvička x 960 µl Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-FIIFV-C1L: 1 injekční lahvička x 50 µl Kontrola WT (FV wt-FII wt) - zelený uzávěr
- GVS-FIIFV-C2L: 1 injekční lahvička x 50 µl Kontrolní MUT (FV mut-FII mut)- Zelený uzávěr s oranžovou nálepkou
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

(*) Tento formát je k dispozici pouze na vyžádání.

6- Sada skladování

Všechny součásti sady musí být po obdržení skladovány při teplotě od -30 °C do -18 °C. Za těchto podmínek jsou stabilní až do data expirace uvedeného na štítku.

Neprovádějte více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení lahviček soupravy, protože to může snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Pokud se mají testy provádět s malým počtem vzorků, doporučuje se použít alikvotní části reagentů, aby se snížil počet cyklů zmrazení/rozmrazení.

Vzhledem k fotocitlivé povaze Primeru se vyvarujte trvalého vystavení světlu.

7- Požadované, ale nedodávané materiály

Obecné

- Jednorázové rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební materiál

- Filtrační špičky (P200, P20 a P10)
- 1,5 ml autoklávované zkumavky
- Kompatibilní spotřební materiál pro každý přístroj PCR v reálném čase

Vybavení

- Vortex -vírový mixér
- Centrifuga
- Mikropipety (P200, P20 a P10)
- Přístroj pro PCR v reálném čase s detekčními kanály FAM, HEX/VIC, ROX a Cy5.
Byla ověřena následující zařízení:
 - 7500, QuantStudio™ 5 a QuantStudio™ 6 Real-Time PCR systémy, Applied Biosystems™

- LightCycler® 96 System a LightCycler® 480 (*), Roche.
- Rotor-Gene® Q, Qiagen®
- Systém DT Lite Real-Time PCR, DNA-Technology
- CFX 96 Real-Time PCR, BioRad
- Mic qPCR, Bio Molecular Systems
- qTower³, Analytik Jena (*)

(*) Je nutná specifická kompenzace barev.

Tato sada je kompatibilní s automatickými pipetovacími systémy, jako jsou OMNIA (Mamec Biomed), OT-2 (Opentrons) a epMotion® 5075 (Eppendorf). Ve všech případech musí být před použitím této soupravy provedena validační zkouška těchto systémů.

8- Odběr vzorků a příprava

Vzorky musí být odebírány v souladu s návodem k použití odběrového zařízení (není součástí soupravy) a podle národních a mezinárodních pokynů.

Tento test by měl být prováděn pouze s DNA extrahovanou ze vzorků plné krve konzervovaných antikoagulačními látkami, jako je EDTA (podrobnosti viz oddíl 12).

Tato technika je kompatibilní s několika metodami extrakce DNA. Byly testovány některé interferující látky, které by mohly ovlivnit výsledek (viz oddíl 12). Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška s takovou extrakční metodou.



POZOR!

Sě všemi biologickými a krevními vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními. Při manipulaci s nimi dodržujte odpovídající základní a univerzální bezpečnostní opatření.

9- Použití postupy

→ Nastavení PCR



POZOR!

- Definujte pracovní prostory před a po provedení PCR, které by měly být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Připravte PCR v oblasti před PCR.
- Používejte laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Pracujte na ledu nebo nad chladným blokem. Zkraťte dobu mezi přípravou destičky a zahájením testu na minimum.
- Pro každou relaci se doporučuje testovat slepou reakci (negativní kontrola) a obě kontroly WT a MUT, které jsou součástí soupravy.

1. Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Vortexujte lahvičku se směsí primerů a pečlivě promíchejte lahvičku s master směsí. Krátce odstředte, abyste zachytili objem na dně zkumavek.
2. Připravte následující směs pro n+1 vzorků s použitím množství uvedených v následující tabulce:

	Objem na vzorek (μ l)
Master Mix	10
Směs základních nátěrů	8

Jemně promíchejte a odstředte, aby se veškerý objem usadil na dně zkumavky.

- Pipetujte 18 μ l této směsi do PCR destiček/zkumavek.
- Do každé jamky přidejte 2 μ l DNA (doporučená koncentrace mezi 10 a 200 ng/ μ l), slepou reakci, kontrolní WT nebo kontrolní MUT.
- Uzavřete destičku/zkumavku pomocí vhodného těsnicího prostředku, krátce vortexujte a krátce centrifugujte, aby se veškerý objem usadil na dně jamky. Pokud je to možné, ujistěte se, že v jamkách nejsou žádné bubliny.
- Umístěte destičku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak je popsáno v následující části.

→ Konfigurace termocykleru

- Nastavte následující čtecí kanály:
 - Kanál HEX/VIC pro detekci sondy FV-wt značené HEX.
 - Kanál FAM pro detekci sondy FV-mut značené FAM.
 - Kanál CY5 pro detekci sondy FII-wt značené CY5.
 - Kanál ROX pro detekci sondy FII-mut značené ROX.
- Nastavte následující amplifikační program a spusťte běh:

	Cykly	Teplota ($^{\circ}$ C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	50	95	00:15	X
		62	01:00	Jednotlivé stránky
Chlazení	1	15	∞	X

→ Likvidace

S odpadními produkty se nakládá v souladu s místními předpisy.

10- Výsledky

→ Vizualizace výsledků

Analýza výsledků se provádí pomocí specifického softwaru použitého přístroje pro PCR v reálném čase a podle pokynů výrobce.

Po dokončení běhu vyberte lineární stupnici pro vizualizaci amplifikačních křivek. Důrazně doporučujeme zkontrolovat správné chování amplifikačních křivek, než budete pokračovat v interpretaci výsledků:

- Amplifikační signál je považován za pozitivní, pokud je pozorován rychlý a pravidelný nárůst hodnot fluorescence (exponenciální amplifikace) s $Ct < 35$.
- Slabý fluorescenční signál na pozadí nebo exponenciální signál s $Ct > 35$ by neměl být považován za pozitivní amplifikaci. Tento test umožňuje detekci alel, které se liší pouze o jeden nukleotid, a proto lze u vzorků homozygotních pro jednu z alel pozorovat slabé nespecifické signály fluoroforu použitého pro detekci druhé alely. Výskyt těchto signálů neznamená neplatnost testu.

Vzorek je považován za pozitivní, pokud dojde k exponenciální amplifikaci s $Ct < 35$. Vzorek je považován za negativní, pokud produkuje neexponenciální amplifikaci s nízkou intenzitou nebo exponenciální amplifikaci s hodnotou $Ct > 35$.

Vzorky s anomálními amplifikačními křivkami musí být znovu testovány.



POZOR!

Chcete-li určit hodnotu Ct v každém kanálu, nastavte prahovou čáru následujícím způsobem:

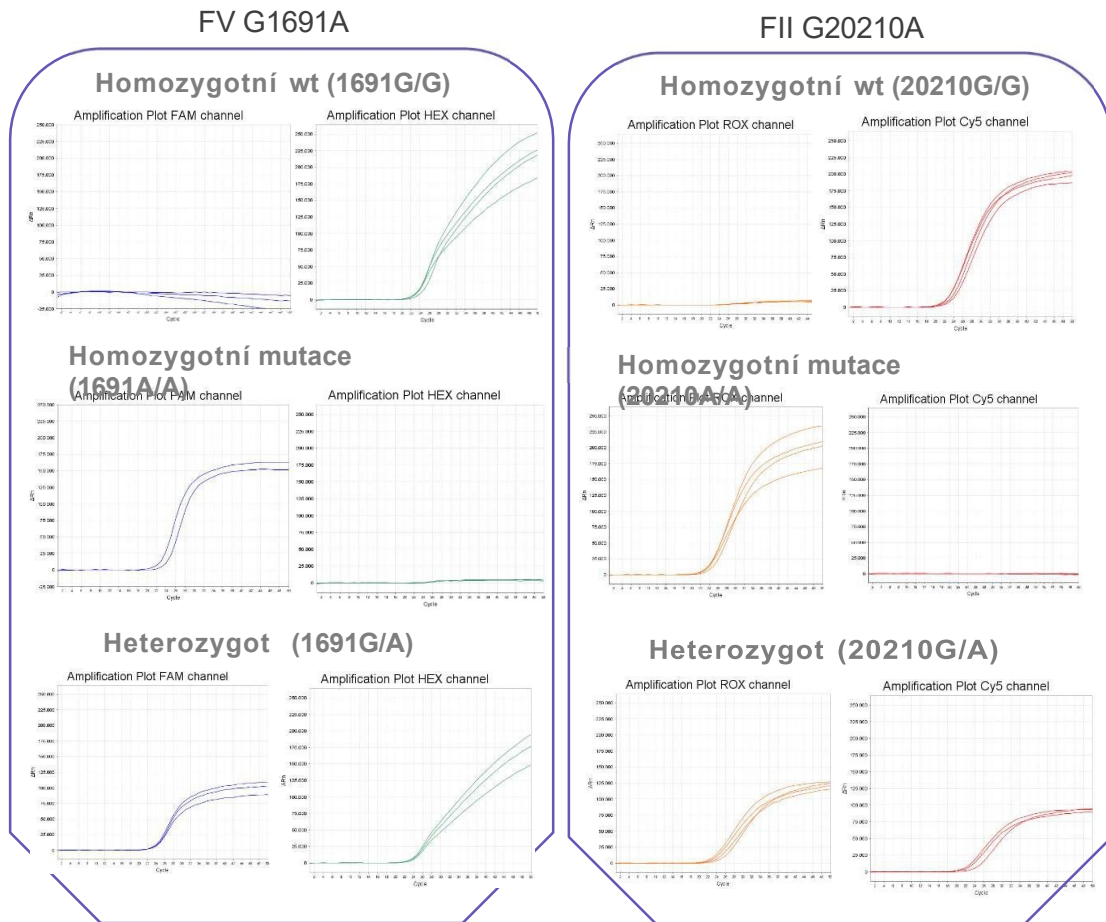
Zvolte lineární zobrazení a vyberte oblast, kde je fluorescenční signál stabilní před exponenciálním zesílením. Umístěte prahovou čáru nad tento signál pozadí tak, aby procházela blízko inflexního bodu amplifikační křivky. Tato čára by měla mírně přesahovat hodnotu nejvyšší fluorescence získané s negativními vzorky pro alelu detekovanou v tomto kanálu.

→ Interpretace výsledků

Po ověření správného tvaru amplifikačních křivek se pro genotypové testy doporučuje interpretace výsledků na základě alelických diskriminačních grafů. Výsledky genotypizace FV G1691A se získávají z kanálů FAM a HEX, zatímco výsledky genotypizace FII G20210A se získávají z kanálů ROX a CY5. Fluorescenční signály z kanálů FAM, HEX, ROX a CY5 jsou vykresleny modře, zeleně, oranžově a červeně.

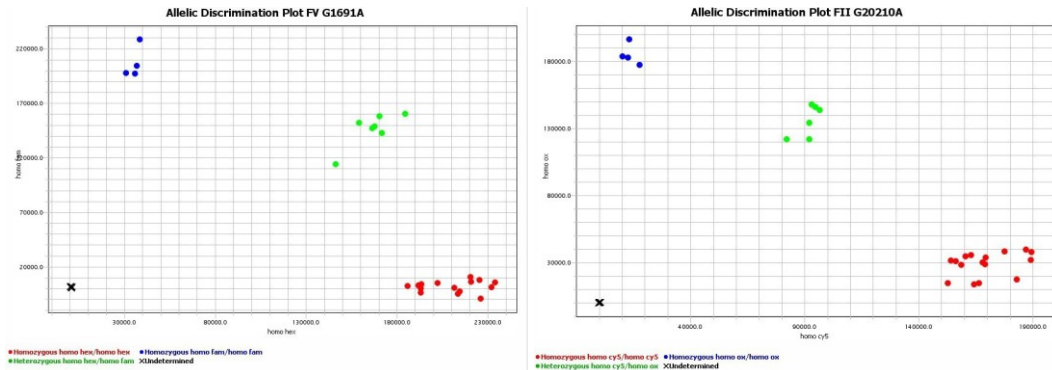
Amplifikační křivka

Zvolte "lineární stupnici" a sledujte absenci/přítomnost vhodných exponenciálních křivek zesílení v každém kanálu.



Graf rozptylu

Výsledky genotypizace FV G1691A jsou získány z kanálů FAM a HEX, zatímco výsledky genotypizace FII G20210A jsou získány z kanálů ROX a CY5. Mnoho softwarových programů pro PCR v reálném čase umožňuje automaticky vykreslit intenzitu fluorescence koncového bodu jednoho kanálu oproti druhému (alelická diskriminace/genotypizace). V tomto typu znázornění odpovídají datové body umístěné v blízkosti os X a Y homozygotním genotypům pro alelu detekovanou fluoroforem znázorněným na příslušné ose. Body umístěné přibližně uprostřed osy odpovídají heterozygotním genotypům. Negativní kontrola (Reaction Blank) by se měla objevit vlevo dole, blízko počátku souřadnic. Tento druh analýzy důrazně doporučujeme k interpretaci výsledků tohoto testu.

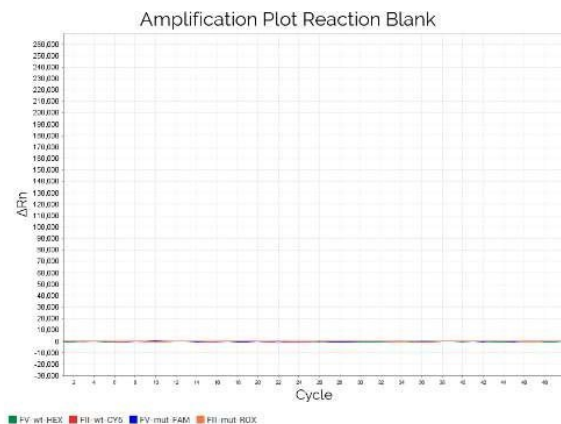


Graf zobrazující homozygotní wt (červené body), homozygotní mutace (modré body) a heterozygotní (zelené body) vzorky pro mutace FV G1691A (graf vlevo) a FII G20210A (graf vpravo) a Reaction Blank (černý křížek), s použitím multiplexové soupravy Genvinset® FIIFV.

11- Kontrola kvality

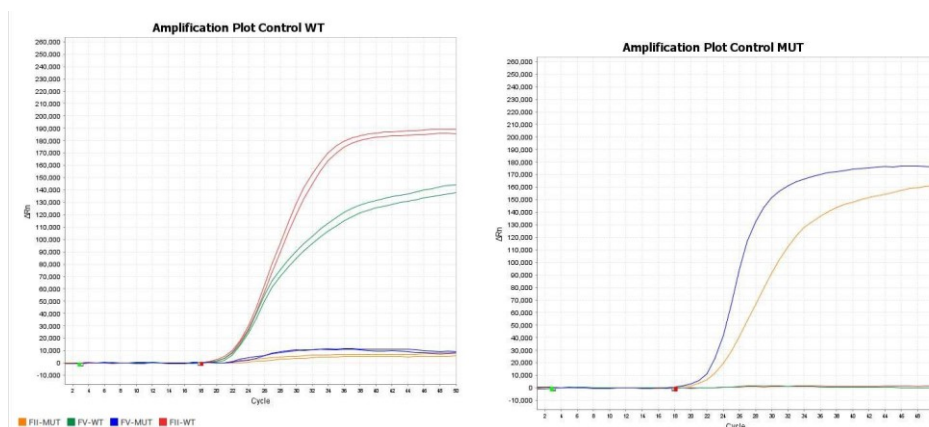
Souprava obsahuje Reaction Blank (negativní kontrola), Control WT (divoký typ FV a FII) a Control MUT (mutantní FV a FII), které musí být testovány v každém testu. Odpovídající chování těchto kontrolních vzorků je zárukou správného provedení reakce.

Test je považován za platný, pokud je u kontrolních vzorků pozorován následující amplifikační vzorec:



V kanálech není žádný signál nebo zesílení s Ct<35.

Kontrola WT a kontrola MUT



Kontrola WT: amplifikace s $Ct < 35$ v kanálech HEX (zelená čára) i Cy5 (červená čára).
Kontrola MUT: amplifikace s $Ct < 35$ v obou kanálech FAM (modrá čára) a ROX (oranžová čára).

Pokud je u pozitivních kontrolních reakcí pozorováno odpovídající chování, pokračujte v interpretaci ostatních vzorků, jak je uvedeno v předchozí části.

Výsledek je považován za neplatný a měl by se opakovat, pokud:

- Amplifikační křivka s $Ct < 35$ je pozorována v kanálech FAM, HEX, ROX a/nebo CY5 ve slepé reakci.
- V reakcích Control WT nebo Control MUT se objeví neexponenciální amplifikační signál nebo amplifikační signál s $Ct > 35$ v očekávaných kanálech.
- Neexistuje amplifikační signál alespoň v jednom z fluoroforů dvojice FAM/HEX a ROX/Cy5. Očekává se amplifikační signál alespoň v jednom z fluoroforů dvojice FAM/HEX a ROX/CY5. Vzorky, které poskytují amplifikační křivky pouze v jedné z dvojic FAM/HEX nebo ROX/CY5, by měly být považovány za pochybné a měla by být provedena nová analýza z nové extrakce DNA.
- Vzorky s exponenciálními amplifikačními křivkami s hodnotami $Ct > 35$ v kanálech FAM a/nebo HEX nebo ROX a/nebo Cy5 je třeba považovat za pochybné a provést novou analýzu z nové extrakce DNA.

12- Specifická operační data

→ Analytická specifita

V rámci stanovení analytické specifity byla na našem pracovišti provedena studie s různými vzorky gDNA, které byly dříve typizovány jinou metodikou genotypizace než multiplexní souprava Genvinset® FIIFV. Výsledky soupravy Genvinset® FIIFV multiplex se plně shodují s genotypy získanými jinou technologií. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách:

FV G1691A	Genvinset® FIIFV multiplex		
Předchozí metoda	Homozygotní divoký typ	Heterozygotní	Homozygotní mutant
Homozygotní WT	55	0	0
Heterozygotní	0	10	0
Homozygotní MUT	0	0	2

<i>FII G20210A</i>	<i>Genvinset® FIIFV multiplex</i>		
<i>Předchozí metoda</i>	<i>Homozygotní divoký typ</i>	<i>Heterozygotní</i>	<i>Homozygotní mutant</i>
Homozygotní WT	61	0	0
Heterozygotní	0	3	0
Homozygotní MUT	0	0	3

Kromě toho byly sekvence primerů a sond srovnány *in silico*. Zarovnání sekvencí primerů je specifické pro geny FV a FII. Sondy se zarovnávají specificky na pozici G1691A (NCBI dbSNP rs6025; NM_0001305: c.1601G>A) z genu pro faktor V a na pozici G20210A (NCBI dbSNP rs1799963; NM_000506.5:c.*97G>A) u genu pro protrombin (FII). Nebyly zaznamenány žádné zkřížené reakce s genomovou DNA.

Přítomnost variant v místech žihání primerů a/nebo sond může mít za následek nedostatečnou definici alel. Syntetické DNA plazmidy obsahující následující jednotlivé známé varianty byly testovány ve třech opakováních, aby se ověřil jejich vliv na výsledky soupravy Genvinset® FIIFV multiplex: rs6020, rs140627208, rs1398334466, rs1557920079, rs946421075, rs1463895656, rs780639864, rs748598519, rs879187678, rs72550707, rs1555159078, rs1389826595, rs112016113,

rs1385271979 a rs1592422978. Správné genotypy byly až na výjimky získány u většiny variant (viz oddíl 13 - Omezení postupu).

Byl analyzován vliv některých exogenních a endogenních potenciálně interferujících látek na výsledky multiplexního kitu Genvinset® FIIFV a byly vypočteny hodnoty IC50. Tyto látky byly přidány ke gDNA, které byly následně analyzovány pomocí soupravy Genvinset® FIIFV multiplex. Při koncentracích heparinu mezi 2 a 4 mg/l byly získány nesprávné výsledky genotypizace. Hodnoty IC50 jsou uvedeny v následující tabulce.

<i>Látka</i>	<i>IC50</i>
<i>Hemoglobin</i>	4,21 g/l
<i>Imunoglobulin G</i>	0,50 g/l
<i>FeCl3</i>	4,8 mM
<i>Heparin</i>	1 mg/l
<i>Warfarin</i>	Žádný účinek při 66 mg/l
<i>Sintrom</i>	2,41 g/l
<i>K2-EDTA</i>	38,06 mM
<i>Ethanol</i>	15.36 %

Přítomnost potenciálně inhibičních látek musí být eliminována jak při extrakci DNA, tak při purifikaci. Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška s takovou extrakční metodou.

→ Analytická citlivost

LoD: Ředící test byl proveden s použitím tří vzorků DNA (FV G1691A homozygotní mutant, FII G20210A homozygotní mutant a FV G1691 a FII G20210A heterozygotní). Testované vstupní hladiny DNA se pohybovaly od 40 ng do 0016 ng (**) v sérii trojnásobného ředění. Každá koncentrace byla testována ve třech opakováních. Byly získány následující údaje:

- Mez detekce = 1,48 ng (Ct<35)

Horní mez: tři vzorky DNA (FV G1691A homozygotní mutant, FII G20210A homozygotní mutant a FV G1691 a FII G20210A heterozygotní) byly testovány v sérii dvojnásobného ředění v rozmezí od 400 ng do 6,25 ng (**). Výkonnost testu zůstala přijatelná při všech vstupních úrovních a při všech úrovních byly přesně vytvořeny vhodné sigmoidální amplifikační křivky a genotypové volání (s hodnotami Ct <35).

(**) Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

→ Diagnostická citlivost a specifita

V rámci validace této soupravy byly v externích laboratořích analyzovány různé vzorky gDNA, které byly dříve typizovány pomocí genotypizační metodiky odlišné od soupravy Genvinset® FIIIFV multiplex. Byly získány následující výsledky:

FV G1691A	Genvinset®FIIIFV multiplex		
Předchozí metoda	Homozygotní divoký typ	Heterozygotní	Homozygotní mutant
Homozygotní WT	21	0	0
Heterozygotní	0	17	0
Homozygotní MUT	0	0	6

FII G20210A	Genvinset®FIIIFV multiplex		
Předchozí metoda	Homozygotní divoký typ	Heterozygotní	Homozygotní mutant
Homozygotní WT	32	0	0
Heterozygotní	0	13	0
Homozygotní MUT	0	0	2

Výsledky získané pomocí soupravy Genvinset® FIIIFV multiplex se 100% shodují s genotypy získanými dříve alternativní metodou.

→ Přesnost

Studie opakovatelnosti spočívá v posouzení variability v rámci série prostřednictvím analýzy replik všech druhů vzorků, které lze pomocí soupravy měřit (homozygotní a heterozygotní vzorky). Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních.

Multiplexní souprava Genvinset®FIIIFV vykazovala 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi jednotlivými sériemi, šaržemi, real-time termocyklery a operátory. Použité vzorky reprezentují celý rozsah očekávaných analytů, které lze měřit pomocí multiplexu Genvinset® FIIIFV, tj. homozygotní i heterozygotní. Byly testovány tři různé šarže ve třech různých termocyklerech PCR v reálném čase.

Multiplex Genvinset®FIIIFV vykázal 100% reprodukovatelnost.

→ Pravdivost

Správnost analytického postupu multiplexu Genvinset® FIIIFV se posuzuje srovnáním s referenční metodou. Studie byla vypracována jako interní validace

čínidlo, u něhož byla prokázána správnost se 100% hodnotou. Viz oddíl "Analytická specifčnost".

13- Omezení postupu

- Metoda detekuje mutaci G1691A (NCBI dbSNP rs6025; NM_000130.5:c.1601G>A) v genu pro faktor V (FV) (OMIM: 612309) a mutaci G20210A (NCBI dbSNP rs1799963; NM_000506.5:c.*97G>A) v genu pro protrombin (FII) (OMIM: 176930).
- Mutace nebo polymorfismy v místech žihání primerů/sond mohou mít za následek nedostatečnou definici alel. K vyřešení typizace může být nutné použít jiné technologie. Vzorky heterozygotů faktoru V G1691A budou v přítomnosti variant rs1557920079 nebo rs946421075 nesprávně genotypizovány jako homozygotní mutanti faktoru V G1691A. Vzorky heterozygotů faktoru II G20210A budou nesprávně genotypizovány jako homozygotní faktor II G20210A v přítomnosti variant rs72550707, rs1555159078 nebo rs112016113. Důrazně se doporučuje, aby homozygotní mutantní vzorky byly potvrzeny jinou metodikou.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli výkony, které nesplňují tyto údaje, mohou vést ke špatným výsledkům.
- Nepoužívejte soupravu, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnějšího boxu nebo jakýkoli jiný případ, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Veškerá manipulace s čínidly Genvinset® musí být prováděna v souladu se správnou laboratorní praxí a přizpůsobena místním předpisům.
- Nemíchejte komponenty z jiných sad nebo čísel šarží.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti. Prošlé reagentie zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Přístroj pro PCR v reálném čase musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán v souladu s pokyny výrobce.
- Údaje a interpretaci výsledků by měl revidovat kvalifikovaný personál.
- Tento produkt je pomocným nástrojem pro diagnostiku pacientů s podezřením na trombofilií. Tyto výsledky používejte společně s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených u pacienta.

14- Řešení problémů průvodce

→ **V žádném vzorku není detekován amplifikační signál (ani v pozitivních kontrolách) nebo je jeho intenzita velmi nízká.**

- Přístroj PCR v reálném čase není správně naprogramován. Tepelný profil není správný/čtecí kanály nejsou správně nakonfigurovány/ vybrané fluorofory nejsou vhodné.
 - Zkontrolujte, zda byl přístroj správně naprogramován.
- Pozice vzorků a kontrol uvedených při přípravě testu neodpovídají pozicím, ve kterých byly umístěny v přístroji.
 - Správně přiřadte polohu vzorků.
- Čínidlo nefunguje správně.
 - Zajistěte, aby byla souprava skladována při vhodné teplotě (mezi -30°C a -18°C) a chráněna před světlem. Vyhněte se zbytečným cyklům zmrazování a rozmrazování. Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti.

- Uvedená množství jednotlivých činidel nebyla do reakční směsi přidána.
 - Zkontrolujte objem jednotlivých složek přidaných do směsi.
- Použitý spotřební materiál není kompatibilní s používaným zařízením.
 - Ujistěte se, že byl použit správný spotřební materiál (kompatibilní s použitým přístrojem pro PCR v reálném čase).

→ **V klinických vzorcích nebyl zjištěn žádný signál (signál se objevuje v pozitivní kontrole)**

- Špatná kvalita použité DNA.
 - Zkontrolujte poměr absorbance 260/280 a vyřadte nekvalitní vzorky. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Nedostatečná koncentrace DNA.
 - Upravte koncentraci DNA na doporučené rozmezí.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
- Inhibice amplifikace.
 - Odeberte plnou krev do zkumavek s protisrážlivými látkami, jako je EDTA.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
 - Opakujte test a ujistěte se, že byly přidány všechny vzorky.

→ **Signál detekovaný v negativní kontrole**

- Chyba při pipetování.
 - Při každém přidání DNA do jamky vyměňte špičku pipety. Zkontrolujte, zda vzorek přidáný do jamky odpovídá tomu, co je napsáno v pracovním listu.
- Kontaminace lahvičky Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank.
 - Test opakujte s čerstvými alikvoty.
- Prostor pro přípravu PCR je kontaminovaný.
 - Čistěte povrchy, přístroje a laboratorní pláště a vyměňujte spotřební materiál a reagenty. Zopakujte analýzu.

→ **Intenzita fluorescence se liší mezi vzorky nebo abnormální amplifikační křivky**

- Znečištění vně reakční zkumavky ruší detekci fluorescence.
 - Zařízení důkladně vyčistěte. Zkontrolujte, zda je vnější strana zkumavek/desek čistá. S destičkou/zkumavkou manipulujte v rukavicích.
- Objem není na dně jamky nebo se v něm vyskytují bublinky.
 - Před vložením do termocyklu zkumavky/destičky odstředte.
 - Zkontrolujte, zda se neobjevují bubliny. Pokud ano, krátkým otáčením je odstraňte.
- Deska/trubky nebyly správně uzavřeny.
 - Zopakujte test a zkontrolujte, zda byly zkumavky/plotýnky správně uzavřeny.
- Byly použity DNA o různých koncentracích nebo použitý vzorek obsahuje inhibitor reakce.
 - Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Přítomnost polymorfismů nebo mutací na vazebných místech sondy/primeru.
 - Kontakt na naši technickou stránku oddělení na adrese customersupport@bdrdiagnostics.com
- Přítomnost rušivých látek:
 - Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Test opakujte s novým odběrem vzorků a extrakcí DNA.

15- Odkazy

- 1) Lane, D. A. G Grant, P. J. Role polymorfismů hemostatických genů u žilních a arteriálních trombotických onemocnění. *Blood* 95, 1517-1532 (2000).
- 2) Frenkel, E. P. G Bick, R. L. Mutace genu pro protrombin G20210A, defekty heparinového kofaktoru II, primární (esenciální) trombocytémie a trombohemoragické projevy. *Semin Thromb Hemost* 25, 375-386 (1999).
- 3) Ceelie, H., Spaargaren-van Riel, C. C., Bertina, R. M. G Vos, H. L. G20210A je funkční mutace v genu pro protrombin; vliv na hladinu proteinu a tvorbu 3'-konce. *J Thromb Haemost* 2, 119-127 (2004).
- 4) Reitsma, P. H. G Rosendaal, F. R. Minulost a budoucnost genetického výzkumu trombózy. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1, 264-269 (2007).
- 5) Bertina, R. M. et al. Mutace v krevním koagulačním faktoru V spojená s rezistencí na aktivovaný protein C. *Nature* 369, 64-67 (1994).
- 6) Segers, K., Dahlbäck, B. G Nicolaes, G. A. F. Koagulační faktor V a trombofilie: pozadí a mechanismy. *Thrombosis and Haemostasis* 98, 530-542 (2007).
- 7) Nicolaes, G. A. F. G Dahlbäck, B. Faktor V a trombotická onemocnění: popis proteinu s tvář janusu. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 530-538 (2002).
- 8) Bosler, D., Mattson, J. G Crisan, D. Fenotypová heterogenita u pacientů s homozygotním genotypem protrombinu 20210AA : A Paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 8, 420 (2006).
- 9) Marchiori, A., Mosená, L., Prins, M. H. G Prandoni, P. Riziko opakovaného žilního tromboembolismu u heterozygotních nositelů mutace faktoru V Leiden nebo protrombinu G20210A. *Systematický přehled prospektivních studií. Haematologica* 92, 1107-1114 (2007).
- 10) Franchini, M. Užitečnost testování na faktor V Leiden. *Blood Transfusion* 10, 257 (2012).
- 11) Franchini, M. G Veneri, D. Dědičná trombofilie: aktualizace. *Clinical Laboratory* 51, 357-365 (2005).

16- Upozornění pro kupujícího na







- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely *in vitro*.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie, musí uživatel v případě, že dojde k závažné události týkající se použití soupravy, tuto skutečnost nahlásit výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo země pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být provedeno v souladu s místními požadavky pro každou zemi.
- Souhrn bezpečnosti a výkonnosti (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný uživatelům soupravy (<https://ed.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).
- Produkty společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. by neměly být dále prodávány, upravovány za účelem dalšího prodeje nebo používány k výrobě jiných komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.
- Veškeré informace obsažené v tomto dokumentu mohou doznat změn bez předchozího upozornění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. nenese žádnou odpovědnost za případné chyby v dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době jeho zveřejnění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. v žádném případě nenese odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo odvozené škody vzniklé v důsledku použití tohoto dokumentu.
- Nákupem tohoto produktu získává kupující práva na některé patenty společnosti Roche, které se používají pouze k poskytování diagnostických služeb *in vitro*. Neuděluje žádný generický patent ani žádné jiné patenty zaměřené na jiné než uvedené použití.
- FAM™, HEX™ a ROX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- Na FAM™, HEX™ a ROX™ se může vztahovat jeden nebo více patentů společnosti Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto produktu zahrnuje omezená, nepřenosná práva.

- Cy® je registrovaná ochranná známka společnosti Cytiva.
- TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.
- Genvinset® je registrovaná ochranná známka společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.

17- Kontrola změn

Verze	Popis úpravy
Rev. 00	První revize dokumentu. Pouze pro výzkumné účely (RUO).
Rev. 01	Zavedení označení CE. Soulad s nařízením (EU) 2017/746.

18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro		Datum vypršení platnosti
	Katalogové číslo		Obsah dostačující pro <n> testů
	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní limit		Chraňte před slunečním zářením
	Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 o diagnostice in vitro. zdravotnický prostředek		Přečtěte si elektronický návod k použití