Genvinset®

HLA A29

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro detekci skupiny alel HLA-A*29*

Pro in vitro diagnostické užití

Rev. 06 / 2021-12-17

Camino del Pilón 86, Casa 7, Local 0011 – Zaragoza (Spain)

www.bdrdiagnostics.com

Katalogové číslo	Skladujte při
GVS-A29-48 (48 testů)	-18°C až -30°C
GVS-A29-24 (24 testů)	

Genvinset®

HLA A29

Index

1. Bezpečnostní informace 2

2. Účel použití 2

3. Souhrn a vysvětlení 2

4. Zásady postupu 3

5. Obsah soupravy 4

6. Skladování soupravy 4

7. Požadované materiály, které nejsou dodány 4

8. Odběr a příprava vzorků 5

9. Postupy použití 5

10. Výsledky 7

11. Kontrola kvality 8

12. Specifické operační údaje 9

13. Omezení postupu 10

14. Průvodce řešením problémů 10

15. References 12

16. Oznámení kupujícímu 12

17. Řízení změn 13

18. Explanation of symbols used on the labels 13

1. Bezpečnostní informace

Přečtěte si prosím celý tento návod k použití a aplikujte jej během používání používané IVD spoupravy.

Soupravy diagnostických zdravotnických prostředků in vitro jsou určeny pro použití odborníky s rozsáhlými zkušenostmi s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

Poraďte se s výrobcem, pokud existují pochybnosti týkající se popisu testovací metody. Kontaktujte telefonicky +34 976 094 603 nebo e-mailovou adresou *customersupport@bdrdiagnostics.com*.

IVD souprava má omezenou trvanlivost. Před použitím soupravy se ujistěte, že doba použitelnosti nevypršela. Činidla ze soupravy mohou být po uplynutí doby použitelnosti poškozena, což by mohlo zhoršit výsledky. Činidla, jejichž expirace vypršela, zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.

Kontaminace vzorku nebo činidla může vést k nesprávným výsledkům. Buďte opatrní při extrakci DNA a manipulaci se vzorky a činidly.

Tato souprava může být znehodnocena během přepravy nebo skladování. Nepoužívejte soupravu v případě podezření na znehodnocení během přepravy. Pečlivě dodržujte podmínky skladování popsané na štítku a v návodu k použití (IFU).

Zajistěte, aby se s odpadem nakládalo v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s odpady může vést ke kontaminaci životního prostředí.

Toxikologické vlastnosti soupravy nebyly studovány do hloubky, proto se doporučuje vyhnout se kontaktu s kůží a sliznicemi. Nepožívejte. Bezpečnostní listy (MSDS) jsou zákazníkovi k dispozici na vyžádání.

Ujistěte se, že tato sada je adekvátní pro požadovanou analýzu klinickým lékařem.

2. Účel použití

Genvinset® HLA A29 je *in vitro* diagnostická souprava pro stanovení skupiny alel HLA-A*29 v genomové DNA extrahované z plné krve, svázané s predispozicí k onemocnění nazývanému Birdshot retinochoroidopatie, metodou real-time PCR pomocí technologie Taqman® sond.

Pacienti, kteří mohou mít prospěch z tohoto stanovení, jsou ti, kteří jsou doporučeni odborníkem. Výsledky tohoto testu by neměly být jediné, na kterých 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. Souhrn a vysvětlení

Birdshot retinochoroidopatie (BSRC) je vzácná, chronická, bilaterální, zadní uveitida charakterizovaná výraznými, mnohočetnými, hypopigmentovanými choroidálními a retinálními lézemi, poprvé identifikovanými Ryanem a Maumenee [1]. Rozmazané vidění a plovoucí obraz jsou nejčastějšími příznaky. Pacienti mohou také hlásit dyschromatopsii a špatnou kontrastní citlivost. Makulární edém nebo atrofie je nejčastější příčinou poklesu

zrakové ostrosti a 10% pacientů je doslova slepých. Nejčastěji jsou postiženi běloši středního věku severoevropského původu [2-5]. Patogeneze není známa, ale zdá se, že pozitivita HLA-A*29 svědčí o predispozici [6-10] a zdá se, že zde hraje roli autoimunita sítnice [9]. U pacientů s BSCR byly hlášeny I cévní onemocnění [4], sarkoidóza [4, 11], psoriáza [12], autoimunitní senzorineurální ztráta sluchu [13] a vitiligo [2].

Relativní riziko BSRC u HLA-A*29 pozitivních jedinců bylo odhadnuto na 50 až 224 a většina výzkumníků uznává přítomnost alely HLA-A29 jako nezbytné kritérium pro diagnózu BSRC pro výzkumné účely. HLA-A29 je přítomen až u 7% bělochů a je rozdělen do více než 20 podtypů - většinou A*2902 u bělochů a A*29:01 u Asiatů. Dokonce to vypadá,že i Asiaté, kteří žijí ve stejné zemi jako běloši v Evropě nebo ve Spojených státech, netrpí BSRC. Navíc se zdá, že Afroameričané žijící v Severní Americe a nesoucí A*29:02 s frekvencí 3,57% jsou vůči této nemoci take imunní. Zjistili jsme, že genové sekvence všech pacientů a zdravých jedinců sdílejících podtyp A*29:01 nebo A*29:02 byly identické [14-16]. Kromě toho studie polymorfismů v HLA-A oblasti u pacientů a kontrolních subjektů neprokázala žádné rozdíly, ale překvapivě definovala dva silné rozšířené haplotypy A*29:01 a A*29:02 [16].

4. Zásady postupu

Test je založen na technologii real-time PCR se sondami TaqMan®. Každý vzorek je analyzován pomocí:

- Páru primerů specifických pro alely HLA-A*29 a páru primerů specifických pro gen β-globinu (HBB), který slouží jako vnitřní pozitivní kontrola (IPC).
- Sondy hydrolýzy specifické pro analyzované alely HLA-A*29 značené na 5' konci FAM fluoroforem a sondy hydrolýzy specifické pro gen β-globinu (HBB) (IPC) značená na 5' konci fluoroforem HEX.
  Všechny sondy jsou označeny na 3' konci zhášedlem, které inhibuje fluorescenční emisi fluoroforem, když je sonda neporušená.

Jak PCR reakce pokračuje, aktivita 5→'3'exonukleázy Taq polymerázy štěpí sondy připojené k jejich komplementární sekvenci, odděluje fluorofor od zhášedla a produkuje fluorescenční signál (v reálném čase), který je úměrný množství produktu PCR generovaného a monitorovaného v reálném čase PCR přístrojem Tedy:

- V přítomnosti vzorků s jednou nebo dvěma kopiemi alel HLA-A*29 (HLA-A*29 pozitivní) se sondy značené FAM vážou na své komplementární sekvence DNA, HEX-značená sonda se váže na svou komplementární sekvenci DNA v genu HBB (β-globin) a je pozorováno následující:
  - Fluorescenční signál v kanálu FAM (λmax 518 nm) a
  - Fluorescenční signál v HEX kanálu (λmax 556 nm).
- V přítomnosti vzorků bez kopií alel HLA-A*29 (HLA-A*29 negativní) se sonda značená HEXem váže na svou komplementární sekvenci DNA v genu HBB (β-globin) a je pozorováno následující:
  - Žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM a
  - Fluorescenční signál v HEX kanálu.

5. Obsah soupravy

➔ Katalogové číslo GVS-A29-24 (24 testů)

- GVS-A29-PM: 1 injekční lahvička x 248 µl Primer Mix (PM)
- GVS-A29-C+: 1 injekční lahvička x 5 µl Pozitivní kontrola (C+)
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 µl Slepý vzorek reakce (RB)

➔ Katalogové číslo GVS-A29-48 (48 testů)

- GVS-A29-PM: 2 injekční lahvičky x 248 µl Primer Mix (PM)
- GVS-A29-C+: 1 injekční lahvička x 5 µl Pozitivní kontrola (C+)
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 µl Slepý vzorek reakce (RB)

6. Skladování soupravy

Všechny součásti soupravy musí být po příjmu skladovány při teplotě -18 ˚C až -30 ˚C. Za těchto podmínek si souprava zachovává svou funkčnost až do data použitelnosti uvedeného na štítku.

Neprovádějte více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení lahviček soupravy, protože to může snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Mají-li být testy prováděny s malým počtem vzorků, doporučuje se rozdělit složky do alikvotních částí, aby se snížil počet zmrazení/rozmrazení.

Vzhledem k fotosenzitivní povaze primer Mixu se vyhněte nepřetržitému vystavení světlu.

7. Požadované materiály, které nejsou dodány

Obecné

- Jednorázové rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební zboží

- Filtrační špičky (P200, P20 a P10)
- 1,5 ml autoklávované zkumavky
- Kompatibilní spotřební materiál pro každý real-time PCR přístroj (v případě použití RotorGene Q jsou povoleny pouze zkumavky o objemu 0,1 ml).

Vybavení

- Vortex - mixer
- Odstředivka
- Mikropipety (P200, P20 a P10)
- Přístroj real.time PCR s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Byla ověřena následující zařízení:
  - StepOneTM, Aplikované biosystémyTM
  - 7500 Real-time PCR System, Applied BiosystemsTM

- LightCycler® 96 System, Roche
- LightCycler® 480, Roche
- Rotor-Gene® Q, Qiagen®

Reagencie

- Rekombinantní Taq (5U/µL) s aktivitou 5'—› 3' exonukleázy (nepoužívejte enzymy HotStart). Další Taq byly ověřeny:
  - Taq DNA PolymeraseRoche™
  - Go Taq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega®)
  - Axi Taq (inno-vlak)
  - AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems™)
  - MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline™)
  - BioTaq™ DNA Polymerase (Bioline™)
  - Taq DNA Polymerase (Applichem™)

8. Odběr a příprava vzorků

Vzorky by měly být odebírány v souladu s návodem k použití odběrového prostředku (není součástí dodávky) a veškerými mezinárodními a vnitrostátními pokyny. Tento test by měl být proveden pouze se vzorky plné krve ošetřenými EDTA antikoagulačními látkami nebo citrátem. Heparin může interferovat s procesem PCR a je třeba se mu vyhnout.

Tato technika je kompatibilní s několika metodami extrakce DNA. Před dodáním výsledků s diagnostickým účelem by měl být proveden validační test pro používanou extrakční metodu.

POZOR!

Všechny biologické a krevní vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční. Při manipulaci s nimi je třeba přijmout odpovídající základní (obecná) opatření.

9. Postupy použití

Nastavení PCR

OPATŘENÍ!

- Definujte pracovní prostory před a po PCR, které by měly být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Připravte PCR v pracovním prostoru pre-PCR. Používejte laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Dobře promíchejte a krátce odstřeďte.
- Práce na ledu nebo nad chladným blokem. Minimalizujte dobu mezi přípravou destičky a začátkem analýzy. Vždy noste rukavice a laboratorní plášť.
- Pro kařdý běh se doporučuje zahrnout Reaction Blank a pozitivní kontrolu dodávanou se soupravou.

1. Pro vzorky n+1 se připraví tato směs s použitím objemů uvedených v následující tabulce:

	Obj. na vzorek (µl)
Taq (5U/µl)	0.1
Směs primerů	9

POZNÁMKA - Použijte jakoukoli rekombinantní Taq (5U/µL) s aktivitou exonukleázy 5'—› 3'

2. Pipetujte 9 µl této směsi do PCR destičky/zkumavek a přidejte 1 µl DNA, pozitivní kontroly nebo slepé reakce na reakci.
3. Destičku/zkumavku uzavřete vhodným těsnicím prostředkem a odstřeďte, aby se veškerý objem usadil na dně jamky.
4. Umístěte Destičku/zkumavku do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak je popsáno v následující části.

➔ B) Konfigurace termocykleru

5. Nastavte následující kanály čtení:
6. FAM kanál (emitovaná fluorescence: 495-520nm).
7. Kanál HEC/VIC (emitovaná fluorescence: 535-554 nm).

8. Nastavte následující profil zesílení a spusťte běh:

	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Ramp (%)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	100	X
Cykly	50	95	00:15	100	X
		60	01:00	100	single
Cooling/ Chlazení	1	15	∞	100	X

POZNÁMKA – Speciální nastavení pro Rotor Gene Q:

b) Otevřete software Rotor-Gene Q – Pure Detection. Vyberte záložku "Advanced" v okně New Run a klikněte na "New.

c) Vyberte typ použitého rotoru (akceptují se pouze zkumavky o objemu 0,1 ml, viz oddíl "Požadované materiály, ale nedodané", strana 8). Zaškrtněte políčko "Lock Ring Attached" (Uzamčený kroužek je nasazen) a pokračujte kliknutím na tlačítko "Next".

d) Zadejte "Reaction volume " 10 µl a identifikujte operátora a vzorek.

e) Klikněte na "Edit Profile" a nastavte program amplifikace (viz kapitola 'Konfigurace teplotních cyklů'). Vyberte krok 60 s při 60 °C a klikněte na "Aquiring to Cycling A". Vyberte kanály pro snímání fluorescence "Green" a "Yellow". Pak "OK". Kliknutím na "OK" přijmete a zavřete okno " Edit Profile ".

f) Kliknutím na "Gain Optimization" v dialogovém okně "Run New Wizard" otevřete okno " Auto-Gain Optimisation Setup ". V rolovací nabídce " Channel Settings " vyberte " Acquiring Channels " a poté "Add". V okně " Auto-Gain Optimisation Setup " nastavte pro každý kanál následující parametry "Green" a "Yellow"):

- Tube position = 1
- Target Sample Range: 5 FI up to 10 FI
- Acceptable Gain Range: -10 to 10

g) Aktivujte možnost " Perform Optimisation Before 1st Acquisition" a klikněte na "Close".
h) Vyberte "Next" a poté "Start Run" v okně "New Run Wizard".

➔ Likvidace

S odpadními produkty nakládejte podle místních předpisů.

10. Výsledky

➔ Vizualizace výsledků

Analýza výsledků se provádí pomocí specifického softwaru použitého qPCR přístroje a podle návodu výrobce k použití.

Po dokončení běhu vyberte lineární stupnici pro vizualizaci amplifikačních křivek. Doporučuje se zkontrolovat správný tvar amplifikačních křivek:

1. Křivka amplifikace je považována za pozitivní, pokud je pozorován rychlý a pravidelný (exponenciální) nárůst fluorescenčních hodnot (sigmoidální amplifikace) s Ct<35.

2. Slabý fluorescenční nebo lineární nebo exponenciální signál pozadí s Ct>35 by neměl být považován za pozitivní amplifikaci. Tento test umožňuje detekci některých alel zařazených do skupiny vysoce polymorfních HLA alel, mezi nimiž byly popsány malé rozdíly v jejich sekvencích. Proto lze v kanálu FAM pozorovat slabé nespecifické signály z jiných podobných sekvenčních, ale nedetekovaných HLA alel. Výskyt těchto signálů neruší platnost testu.

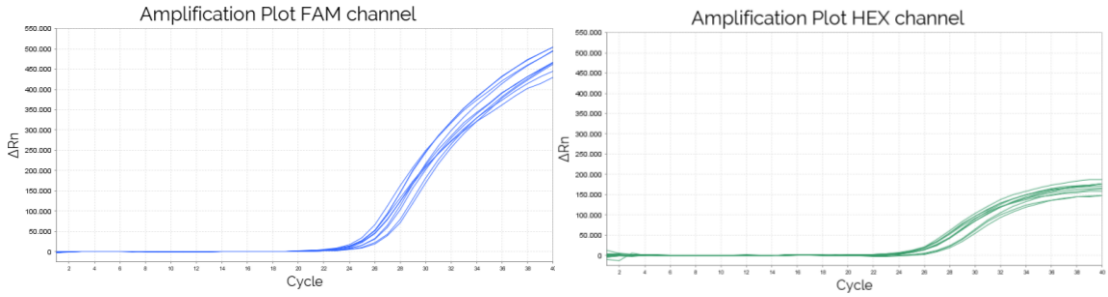
Chcete-li určit hodnotu Ct v každém kanálu, upravte prahovou čáru následujícím způsobem:

1. Vyberte zobrazení lineárního měřítka a zvolte oblast, kde je fluorescenční signál stabilní před exponenciálním zesílením. Umístěte prahovou čáru nad tento signál pozadí tak, aby protínal inflexní bod amplifikační křivky. Tato čára by měla mírně překročit bod nejvyšší fluorescence amplifikace negativních vzorků pro tento fluorofor.

➔ Interpretace výsledků

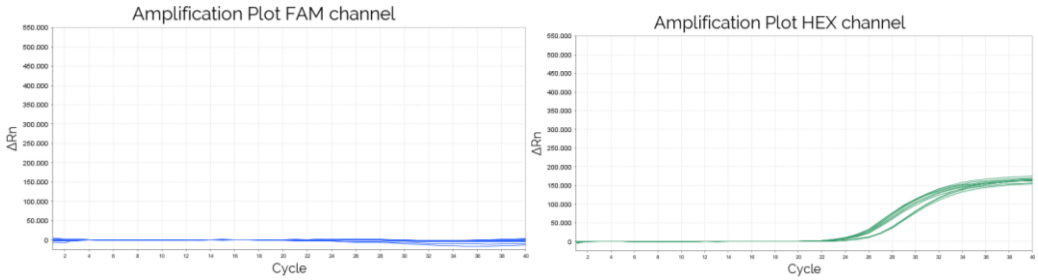
Výsledky získané touto soupravou musí být interpretovány vizualizací amplifikačních křivek ve FAM i HEX kanálech. Vyberte "lineární stupnici" a určete nepřítomnost/přítomnost sigmoidní amplifikace v každém kanálu.

HLA A*29 pozitivních vzorků



Exponenciální amplifikace pomocí Ct<35 v FAM i HEX kanálu

HLA A*29 negative samples



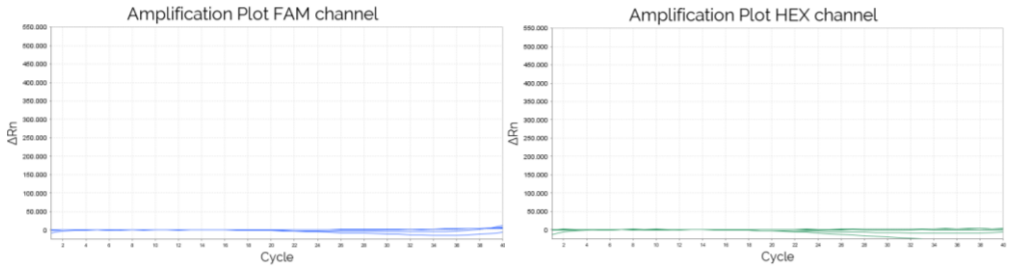
Absence signálu nebo neexponenciálního signálu nízké intenzity v kanálu FAM a exponenciální amplifikace v HEX kanálu (Ct<35)

11. Kontrola kvality

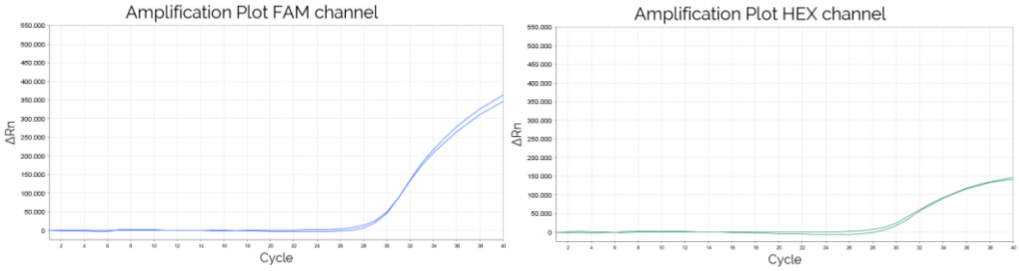
Souprava obsahuje reakční blank a pozitivní kontrolu. Tyto kontroly musí být zahrnuty do každého běhu. Přiměřené chování kontrolních vzorků je zárukou správného výkonu soupravy.

Výsledek testu se považuje za platný, jestliže je získán následující amplifikační vzorec:

- Reakční blank negeneruje sigmoidální amplifikační křivku. Křivka amplifikace s hodnotou Ct<35 by měla být považována za negativní.



- Pozitivní kontrola generuje sigmoidální amplifikaci s hodnotou Ct<35 v obou FAM a HEX kanálech.



IPC je detekován v HEX kanálu a používá se jako vnitřní kontrola. Proto se výsledek vzorku považuje za platný, pokud existuje alespoň sigmoidální křivka s Ct<35 v HEX kanálu.

Je-li u výše uvedených kontrol pozorováno odpovídající chování, přistoupí se k interpretaci vzorků, jak je uvedeno v předchozím oddíle.

Výsledek je třeba považovat za neplatný a měl by se opakovat, jestliže:

- Reakční blank generuje amplifikační křivku s hodnotou Ct<35 v kanálech FAM a/nebo HEX.
- Pozitivní kontrola generuje neexponenciální amplifikační signál nebo zesilovací signál s hodnotou Ct<35 v kanálech FAM a/nebo HEX.
- V IPC (HEX kanálu) není amplifikaces Ct<35.

Vzorky DNA generující amplifikační křivky s Ct>35 ve FAM a/nebo HEX kanálech musí být považovány za pochybné a měly by být znovu testovány při provedení nové extrakce DNA.

12. Specifické operační údaje

➔ Analytická specificita

Zkřížená reaktivita byla hodnocena ve dvou nezávislých studiích s cílem externě validovat soupravu Genvinset® HLA A29. Tyto studie jsou popsány níže.

Vzhledem k vysoce polymorfní povaze HLA systému, *in silico* navázání primerů a sond v nejběžnější databázi HLA (IMGT-HLA) poskytlo seznam detekovaných, nedetekovaných a netestovaných alel s možnými alelami s nízkou intenzitou signálu, které lze nalézt na *www.bdrdiagnostics.com*. Bylo by možné, že intronové oblasti některých méně častých alel ještě nebyly sekvenovány, takže *in silico* navázání primerů a sond v těchto oblastech není známo. Nebyly hlášeny žádné zkřížené reakce s jinými oblastmi DNA.

Interference byla studována pomocí bibliografického vyhledávání, protože je toho dost známo o mechanismech inhibice PCR v krvi. Heparinové antikoagulancium může inhibovat aktivitu Taq polymerázy a soutěžit s cílovou nukleovou kyselinou, takže odebraná krev musí být ošetřena jinými antikoagulancii, jak je uvedeno v bodě "Odběr a příprava vzorků". Některé látky nalezené v krvi jsou známé jako inhibitory PCR: hemoglobin, hemin, bilirubin, žlučové soli, laktoferin, imunoglobulin G. Polymerázy validované soupravou Genvinset® HLA A29 prokázaly vysokou odolnost vůči inhibici a složení Primer Mix je navrženo tak, aby se vypořádalo s interferenčními látkami. Nicméně přítomnost potenciálně inhibičních látek musí být eliminována během extrakčních a purifikačních protokolů DNA. Před dodáním výsledků s diagnostickým účelem by měla být proveden validační test pro používanou extrakční metodu.

➔ Analytická citlivost

Test ředění byl proveden se dvěma vzorky DNA (HLA-A*29 pozitivní a HLA-A*29 negativní). Koncentrace DNA byla měřena spektrofotometrem Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Vstupní koncentrace DNA byla 63 a 83 ng/µl ve čtyřnásobné řadě ředění, která zahrnovala 8 úrovní.

Z hlediska analytické citlivosti při detekci alel HLA-A*29 byly získány následující výsledky:

- Detekční limit alel HLA-A*29 = 0,32 ng/µl (*)
  (*) Čp < 35

➔ Diagnostická citlivost a specificita

Ve dvou studiích lidské genomové DNA bylo analyzováno 90 vzorků získaných ze dvou klinických laboratoří. Dříve byly typizovány HLA-SSO v platformě Luminex nebo SSP + sérologii.

Z 90 testovaných vzorků všechny poskytly platné výsledky (IPC pozitivní amplifikace) a 60 z nich bylo shledáno pozitivními na A*29:

		Genvinset® HLA A29	
		A*29 +	A*29 -
Předchozí metoda genotypizace	A*29 +	60	0
	A*29 -	0	30

Existuje 100% shoda ve výsledcích získaných s Genvinset HLA A29 a typizací dříve získanou pomocí SSO (sekvenčně specifická oligonukleotidová typizace), SSP (sekvenčně specifická typizace primů) nebo sérologické metodiky.

13. Omezení postupu

- Kit detekuje alely HLA A*29 obsažené v "HLA alleles detected_GVS-A29" v www.bdrdiagnostics.com. Vzhledem k vysoce polymorfní povaze HLA alel se mohou objevit slabé signály z jiných alel podobných v pořadí.
- Mutace nebo polymorfismy na místech nasedání primeru/sondy mohou mít za následek chybějící definici alel. K vyřešení typizace mohou být zapotřebí další technologie.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli postupy, které nesplňují tyto indikace, mohou vést ke špatným výsledkům.
- Nepoužívejte soupravu, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnějšího boxu nebo jakýkoli jiný výskyt, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Všechny manipulace s činidly Genvinset® musí být prováděny v souladu s obecnými osvědčenými postupy laboratoře a musí být přizpůsobeny místním předpisům.
- Nemíchejte komponenty z jiných souprav nebo čísel šarží.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti. Činidla, jejichž platnost prošla, zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Tepelný cykler qPCR musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán podle pokynů výrobce.
- Vzhledem ke složitosti typizace HLA musí být interpretace dat a výsledků revidována kvalifikovaným personálem.
- To slouží jako pomocný nástroj pro diagnostiku pacientů s podezřením na poruchy spojené s HLA-A29. Použijte tyto výsledky ve spojení s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených na pacientovi.

14. Průvodce řešením problémů

➔ V žádném vzorku není detekován žádný amplifikační signál (ani u pozitivních kontrol) nebo je intenzita velmi nízká

- Přístroj real-time PCR není správně naprogramován. Tepelný profil není správný / čtecí kanály nejsou správně nakonfigurovány / vybrané fluorofory nejsou vhodné.
  - Zkontrolujte, zda byl přístroj správně naprogramován.

- Polohy vzorků a kontrol uvedené během přípravy testu neodpovídají poloze, ve které byly umístěny do prostředku.
  - Správně přiřaďte polohu vzorků.
- Činidlo nefunguje správně.
  - Ujistěte se, že souprava je skladována při vhodné teplotě (mezi -18 a -30 ˚ C) a chráněna před světlem. Vyhněte se zbytečným cyklům zmrazení/rozmrazení. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Uvedená množství každého z činidel nebyla přidána do reakční směsi.
  - Zkontrolujte objem každé složky přidané do směsi.
- Použitý spotřební materiál není kompatibilní s používaným vybavením.
  - Ujistěte se, že byl použit správný spotřební materiál (kompatibilní s použitým nástrojem PCR).

➔ V klinických vzorcích nebyl zjištěn žádný signál (signál se objeví při pozitivní kontrole)

- Špatná kvalita použité DNA.
  - Zkontrolujte poměr absorbance 260/280 a zlikvidujte vzorky nízké kvality. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů (heparin, hemoglobin, hemin, bilirubin, žlučové soli, laktoferin, imunoglobulin G). Opakovaný odběr vzorků a extrakce DNA.
- Nedostatečná koncentrace DNA.
  - Upravte koncentraci DNA na doporučený rozsah koncentrací.
  - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
- Inhibice amplifikace.
  1. Odeberte plnou krev do zkumavek EDTA nebo citrátu.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
- Test zopakujte s přidáním vzorku.

➔ Signál detekován v negativní kontrole

- Chyba dávkování (pipetování).
  - Pipetovací špičku vyměňte pokaždé, když je do jamky přidána DNA. Zkontrolujte, zda vzorek přidaný do jamky odpovídá vzorku zadanému na listu.
- Kontaminace lahvičky Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank.
  - Test zopakujte s čerstvými alikvoty.
- Oblast přípravy PCR je kontaminována.
  - Očistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a vyměňujte spotřební materiál a činidla. Opakujte test.

➔ Intenzita fluorescence se liší mezi vzorky nebo abnormálními křivkami zesílení

- Nečistoty vně reakční zkumavky interferují s detekcí fluorescence.
  - Zařízení důkladně vyčistěte. Zkontrolujte, zda je vnější strana trubek/desky čistá. Manipulujte s deskou/trubkou v rukavicích.
- Objem není na dně studny nebo jsou nějaké bubliny.
  - Před vložením zkumavek/destiček do zařízení qPCR je odstřeďte.
  - Zkontrolujte, zda nejsou nějaké bubliny. Pokud ano, proveďte krátké otočení, abyste je odstranili.
- Destička/zkumavky nebyly správně uzavřeny.
  - Test zopakujte a zkontrolujte, zda byly zkumavky/destičky správně utěsněny.
- Byly použity DNA s různými koncentracemi nebo použitý vzorek obsahuje inhibitor reakce.
  - Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.

- Přítomnost polymorfismů nebo mutací na vazebných místech sondy/primeru.
  - Kontaktujte naše oddělení technické podpory prostřednictvím *customersupport@bdrdiagnostics.com*

15. References

1) Ryan SJ, Maumenee AE. Birdshot retinochoroidopathy. Am J Ophthalmol. 1980;89:31–45.
2) Gass JD. Vitiliginous chorioretinitis. Arch Ophthalmol 1981;99:1778–87.
3) Kaplan HJ, Aaberg TM. Birdshot retinochoroidopathy. Am J Ophthalmol 1980;90:773–82.
4) Priem HA, Oosterhuis JA. Birdshot chorioretinopathy: clinical characteristics and evolution. Br J Ophthalmol 1988;72:646–59.
5) Ryan SJ, Maumenee AE. Birdshot retinochoroidopathy. Am J Ophthalmol 1980;89:31–45.
6) Baarsma GS, Kijlstra A, Oosterhuis JA, et al. Association of birdshot retinochoroidopathy and HLA-A29 antigen. Doc Ophthalmol 1986;61:267–9.
7) Baarsma GS, Priem HA, Kijlstra A. Association of birdshot retinochoroidopathy and HLA-A29 antigen. Curr Eye Res 1990;9:63–8.
8) LeHoang P, Ozdemir N, Benhamou A, et al. HLA-A29.2 subtype associated with birdshot retinochoroidopathy. Am J Ophthalmol 1992;113:33–5.
9) Nussenblatt RB, Mittal KK, Ryan S, et al. Birdshot retinochoroidopathy associated with HLA-A29 antigen and immune responsiveness to retinal S-antigen. Am J Ophthalmol 1982; 94:147–58.
10) Priem HA, Kijlstra A, Noens L, et al. HLA typing in birdshot chorioretinopathy. Am J Ophthalmol 1988;105:182–5.
11) Yoshioka T, Yoshioka H, Tanaka F. Birdshot retinochoroidopathy as a new ocular sign of sarcoidosis. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 1983;87:283–8.
12) Hesse S, Berbis P, Chemila JF, et al. Psoriasis and birdshot chorioretinopathy: response to aromatic retinoids. Dermatology 1993;187:137–9.
13) Heaton JM, Mills RP. Sensorineural hearing loss associated with birdshot retinochoroidopathy. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993;119:680–1.
14) Tabary T, Prochnicka-Chalufour A, Cornillet P, Lehoang P, Betuel H, Cohen JHM. HLA-A29 sub-types and "Birdshot" choroido-retinopathy susceptibility: a possible "resistance motif" in the HLAA29.1 molecule (in French). C R Acad Sci Paris. 1991;313: 599–605.
15) LeHoang P, Ozdemir N, Benhamou A et al. HLA-A29.2 subtype associated with birdshot retinochoroidopathy. Am J Ophthalmol. 1992;113:33–35.
16) Donvito B, Monnet D, Tabary T, et al. Different HLA classI A region complotypes for HLA-A29.2 and -A29.1 antigens, identical in birdshot retinochoroidopathy patients or healthy individuals. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46:3227–3232.

16. Oznámení kupujícímu

- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely in vitro.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie, musí uživatel v případě vážného incidentu v souvislosti s používáním soupravy tuto skutečnost oznámit výrobci a příslušnému orgánu své země a/nebo země pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být prováděno v souladu s místními požadavky pro každou zemi.
- Produkty BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U. nesmí být dále prodávány, upravovány pro další prodej nebo používány k výrobě jiných komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U.
- Veškeré informace obsažené v tomto dokumentu mohou být bez předchozího upozornění upraveny. Společnost BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U. nepřebírá žádnou odpovědnost za případné chyby v dokumentu. Tento dokument je v době zveřejnění považován za úplný a přesný. Společnost BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U. nebude v žádném případě odpovědná za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo odvozené škody způsobené použitím tohoto dokumentu.
- Zakoupením tohoto produktu získáváte kupujícímu práva na určité patenty společnosti Roche, které se používají pouze k poskytování diagnostických služeb in

vitro. Neuděluje žádný generický patent ani žádné jiné patenty zaměřené na jiné použití kromě toho, který je specifikován.

- FAM™ a HEX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- FAM™ a HEX™ mohou být pokryty jedním nebo více patenty vlastněnými společností Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto produktu zahrnuje omezená, nepřevoditelná práva.
- TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.
- Genvinset® je ochranná známka společnosti BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U.

17. Řízení změn

Verze	Popis modifikace
Rev. 06	Oprava překlepů a chyb v překladu. Nové sekce: Informace pro bezpečnost, Kontrola změn a Vysvětlení symbolů použitých na štítcích. Byly přidány informace týkající se zamýšleného uživatele, zamýšleného pacienta a rušivých vlivů.

18. Explanation of symbols used on the labels

IVD	*In vitro* diagnosticky zdravotnický prostředek		Datum expiracee
REF	Katalogové číslo	Σ	Obsah dostačuje pro <n> testů
LOT	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní omezení		Uchovávejte mimo sluneční svit
CONTROL +	Pozitivní kontrola		Nahlédněte do elektronického dokumentu Návod k použití
CE	Tento výrobek splňuje požadavky směrnice 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro		