



Genvinset[®]

HFE multiplex

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro multiplexní detekci mutací
H63D a C282Y v genu HFE.*

Pro použití v diagnostice in vitro

Rev. 01 / 2023-09-13



Camino del Pilón 86, Casa 7, Loca l
50011 - Zaragoza
(Španělsko)



www.bdrdiagnostics.com



Kódy výrobků:	UDI-DI	Skladování:
GVS-HFE-M-24 (24 testů)	8437016942796	Od -30 °C do -18 °C
GVS-HFE-M-48 (48 testů)	8437016942802	
GVS-HFE-M-96 (96 testů)	8437016942819	

Genvinset®

HFE multiplex

Index

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

1- Informace o bezpečnosti

Přečtěte 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 popisu metody stanovení se obraťte na výrobce. Kontaktujte 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 manuální bezpečnostní listy (MSDS).

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

2- Zamýšlené použití

HFE multiplex je poloautomatická in vitro diagnostická souprava pro kvalitní detekci mutace C282Y (NCBI dbSNP rs1800562; NM_000410.4:c.845G>A) a mutace H63D (NCBI dbSNP rs1799945; NM_000410.4:c.187).C>G) související s hereditární hemochromatózou v genu HFE (OMIM: 613609) v genomové DNA extrahované z plné krve pomocí technologie Real- Time PCR se specifickými sondami TaqMan[®].

U pacienta odeslaného příslušným odborným lékařem (hematologem) a s přihlédnutím ke kompatibilitě uváděných příznaků; bolesti kloubů, bolesti břicha, únava, slabost, srdeční selhání, selhání jater, bronzově zbarvená kůže a/nebo jeho rodinná anamnéza (např. přímý předek s diagnózou hereditární hemochromatózy) může být provedeno stanovení mutací v genu HFE. Výsledky tohoto testu by neměly být jedinými, 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

Dědičná hemochromatóza (HH) je dědičná autozomálně recesivní porucha metabolismu železa. V důsledku nadměrné střevní absorpce se železo hromadí v parenchymatických buňkách jater, slinivky břišní, srdce a dalších orgánů, což vede ke strukturálnímu poškození a poruše funkce jater¹.

HH je jedním z nejčastějších genetických onemocnění u bělochů s prevalencí 1 ku 300 až 500². Příznaky jsou často nespecifické a orgánové poškození je často nevratné, jakmile k němu dojde. Proto je velmi důležitá včasná detekce a léčba jako součást preventivní medicíny³.

Objev genu HFE v roce 1996 vedl k zařazení jeho molekulární analýzy do diagnostické strategie HH. Gen HFE se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu a kóduje protein HFE, glykoprotein o 343 aminokyselinách podobný proteinům typu MHC I. třídy. Dvě mutace v genu HFE (C282Y a H63D) byly silně spojeny s rozvojem přetížení železem, což vedlo ke klinické diagnóze HH^{1,4,5}.

Většina případů HH (52-96 %) v evropských oblastech je spojena s homozygotní mutací na pozici 845 (G-'A) v exonu 4 genu *HFE* (rs1800562), která vede ke změně aminokyseliny na pozici 282 z cysteinu na tyrozin (C282Y). Druhá často zjišťovaná mutace se vyskytuje na pozici 187 (C-'G) v exonu 2 genu *HFE* (rs1799945), kde je aminokyselina histidin nahrazena kyselinou asparagovou na pozici 63 (H63D). Podíl této alely na přetížení železem je nejvýznamnější v případě kombinované heterozygoty s alelou C282Y (C282Y/H63D)^{1,4,5}.

4- Princip postupu

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

- Dva páry primerů pro amplifikaci dvou fragmentů genu *HFE*, v nichž se nacházejí mutace H63D a C282Y.
- Následující alelově specifické hydrolyzační sondy značené na 5' konci pomocí:
 - Fluorofor HEX pro detekci alely divokého typu H63D (C v rs1799945; wt H63D).
 - Fluorofor FAM pro detekci mutantní alely H63D (G v rs1799945; mut H63D).
 - Fluorofor Cy5 pro detekci alely divokého typu C282Y (G v rs1800562; wt C282Y).
 - Fluorofor ROX pro detekci mutantní alely C282Y (A na rs1800562; mut C282Y)

Všechny tyto čtyři sondy jsou na 3' konci označeny zhašedlem, 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 chenceru 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 H63D (C u rs1799945) 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 s homozygotní mutací H63D (G v rs1799945) 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 H63D (C/G u rs1799945) se na amplifikované sekvence DNA vážou sondy značené FAM i HEX, které generují signál v kanálech FAM i HEX.
- V přítomnosti vzorků s homozygotním divokým typem C282Y (G u rs1800562) 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 homozygotní mutace C282Y (A u rs1800562) se sonda specifická pro mutovanou alelu značená ROX 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 C282Y (A/G u rs1800562) se obě sondy vážou na amplifikované sekvence DNA a generují signál v kanálech ROX i Cy5.

5- Obsah soupravy

→ GVS-HFE-M-24 (24 testů)

- GVS-HFE-M-PM: Modrý uzávěr - 1 lahvička x 192 µl Primer Mix (PM)
- GVS-HFE-M-MM: 1 lahvička x 240 µl Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-HFE-M-C1: 1 lahvička x 15 µl Kontrola WT (H63D wt-C282Y wt) - zelený uzávěr
- GVS-HFE-M-C2: 1 lahvička x 15 µl Kontrolní MUT (H63D mut-C282Y mut) - Zelený uzávěr s oranžovou nálepkou
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

→ GVS-HFE-M-48 (48 testů)

- GVS-HFE-M-PM: 2 lahvičky x 192 µl Primer Mix (PM) - modrý uzávěr
- GVS-HFE-M-MM: 2 lahvičky x 240 µl Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-HFE-M-C1: 1 lahvička x 15 µl Kontrola WT (H63D wt-C282Y wt) - zelený uzávěr
- GVS-HFE-M-C2: 1 lahvička x 15 µl Kontrolní MUT (H63D mut-C282Y mut) - Zelený uzávěr s oranžovou nálepkou
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

→ GVS-HFE-M-96 (96 testů) (*)

- GVS-HFE-M-PML: 1 lahvička x 768 µl Primer Mix (PM) - modrý uzávěr
- GVS-HFE-M-MML: 1 lahvička x 960 µl Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-HFE-M-C1L: 1 lahvička x 50 µl Kontrola WT (H63D wt-C282Y wt) - zelený uzávěr
- GVS-HFE-M-C2L: 1 lahvička x 50 µl Kontrolní MUT (H63D mut-C282Y 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- Skladování soupravy

Všechny součásti soupravy 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 lahvíček 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

- Vírový mixér
- Odstředivka
- 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 G, 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.

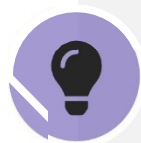


POZOR!

Se 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 (µl)
Master Mix	10
Primer Mix	8

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

3. Pipetujte 18 µl této směsi do destičky/zkumavky pro PCR.
4. Do každé jamky přidejte 2 µl DNA (doporučená koncentrace mezi 10 a 200 ng/µl), slepou reakci, kontrolní WT nebo kontrolní MUT.
5. 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.
6. Umístěte destičku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak je popsáno v následující části.

→ Konfigurace termocykleru

1. Nastavte následující čtecí kanály:
 - Kanál HEX/VIC pro detekci sondy H63D-wt značené HEX.
 - Kanál FAM pro detekci sondy H63D-mut značené FAM
 - Kanál CY5 pro detekci sondy C282Y-wt značené CY5.

- Kanál ROX pro detekci C282Y-mut sondy značené ROX.
2. Nastavte následující amplifikační program a spusťte běh:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	50	95	00:15	X
		64	01:00	single
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:

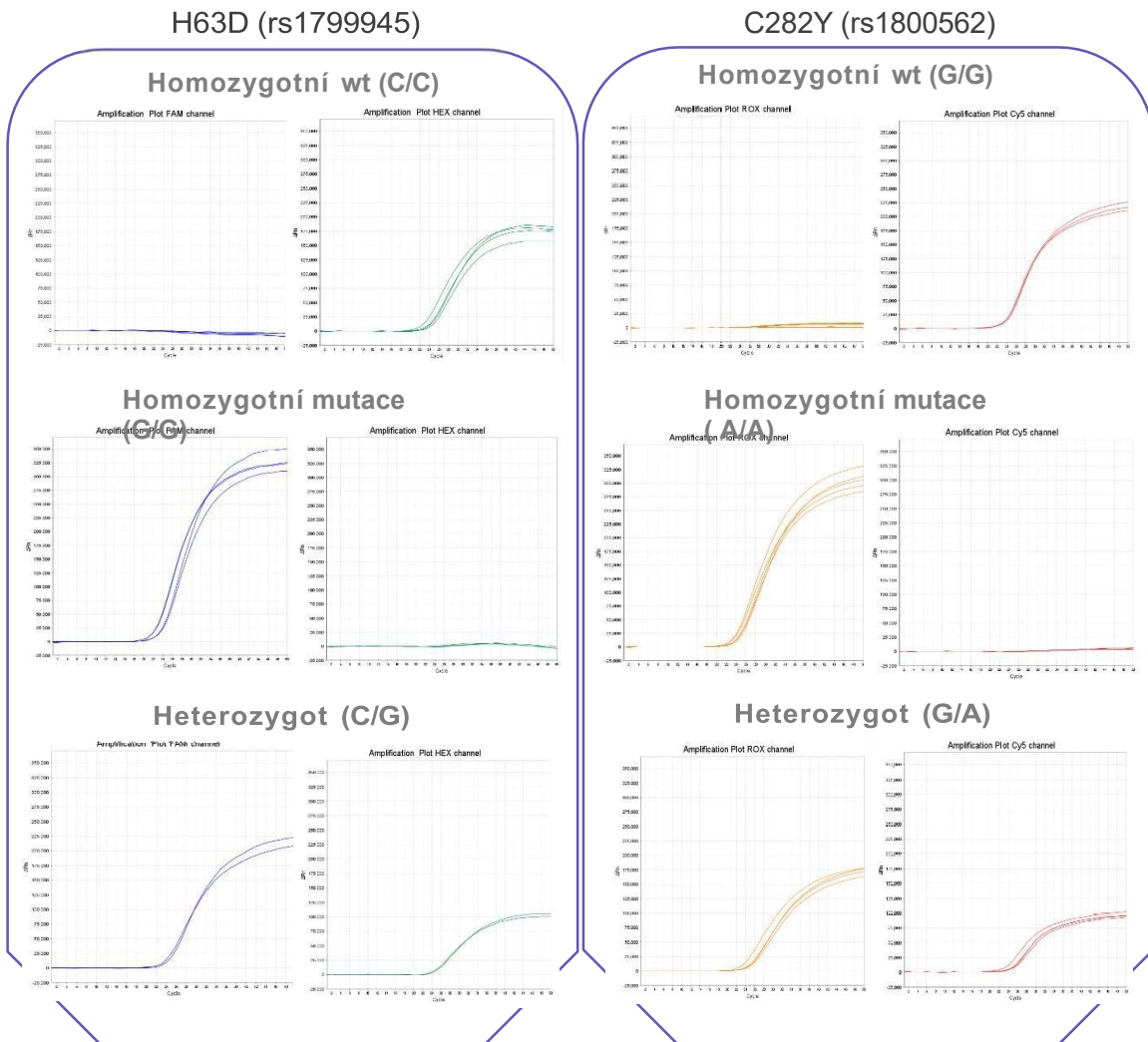
Zvolte lineární zobrazení a vyberte oblast, kde je fluorescenční signál stabilní před exponenciálním zesílením. Umístěte prahovou čáru nad tento signál pozadí tak, aby procházela blízko inflexního bodu amplifikační křivky. Tato čára by měla mírně přesahovat hodnotu nejvyšší fluorescence získané s negativními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

→ Interpretace výsledků

Po ověření správného tvaru amplifikačních křivek se pro genotypové testy doporučuje interpretace výsledků na základě alelické diskriminační křivky. Výsledky genotypizace H63D se získávají z kanálů FAM a HEX, zatímco výsledky genotypizace C282Y se získávají z kanálů ROX a CY5. Fluorescenční signály pro kanály FAM, HEX, ROX a CY5 jsou vykresleny modře, zeleně, oranžově a červeně.

Amplifikační křivka

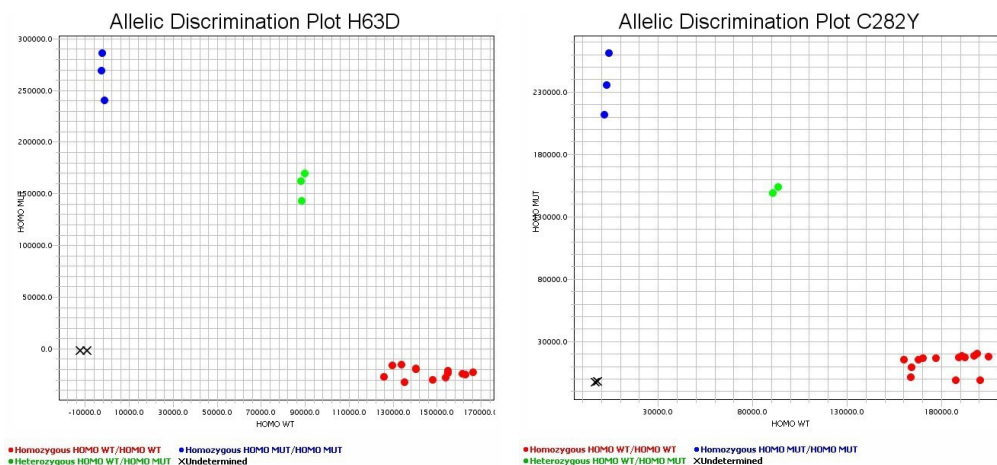
Zvolte "lineární stupnici" a sledujte absenci/přítomnost vhodných exponenciálních křivek amplifikace v každém kanálu.



Graf rozptylu

Výsledky genotypizace H63D se získávají z kanálů FAM a HEX, zatímco výsledky genotypizace C282Y se získávají z kanálů ROX a Cy5. Mnoho softwarových programů pro PCR v reálném čase umožňuje automaticky porovnat intenzitu fluorescence jednoho kanálu v koncovém bodě oproti druhému (alelická diskriminace/genotypizace). V tomto typu znázornění odpovídají datové body umístěné blízko os X a Y homozygotním genotypům pro alelu.

detekovány 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.



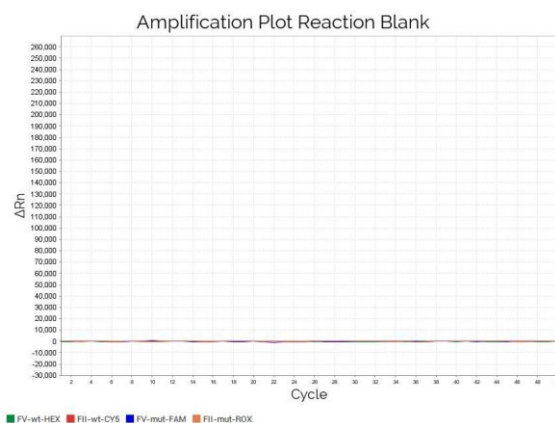
Graf znázorňující homozygotní wt (červené body), homozygotní mutované (modré body) a heterozygotní (zelené body) vzorky pro mutace H63D (graf vlevo) a C282Y (graf vpravo) a Reaction Blank (černý křížek) s použitím multiplexového kitu *Genvinset® HFE*.

11- Kontrola kvality

Souprava obsahuje Reaction Blank (negativní kontrola), Control WT (H63D a C282Y wild-type) a Control MUT (H63D a C282Y mutant), které musí být testovány v každém testu. Odpovídající chování těchto kontrolních vzorků je zárukou správného provedení reakce.

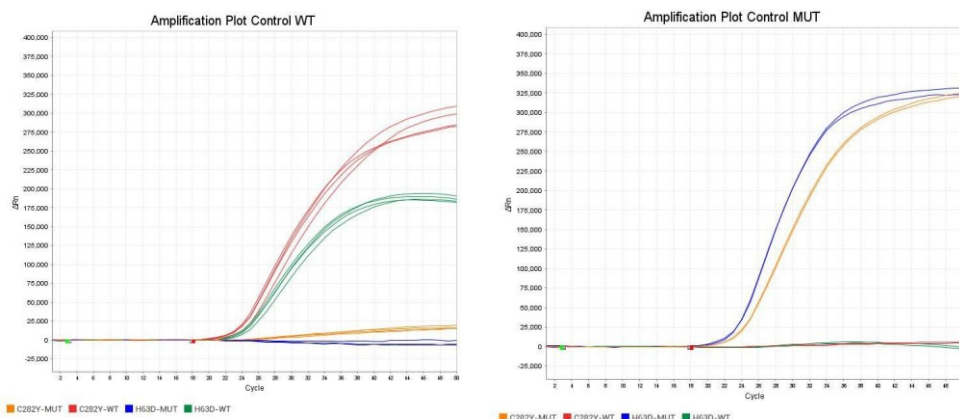
Test je považován za platný, pokud je u kontrolních vzorků pozorován následující amplifikační vzorec:

Reakční blank



Žádný signál ani zesílení s $Ct > 35$ v kanálech.

Kontrola WT (C1) a kontrola MUT (C2)



*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 a 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 souprava Genvinset® HFE multiplex. Výsledky soupravy Genvinset® HFE multiplex se plně shodují s genotypy získanými jinou technologií. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách:

H63D	Genvinset® HFE multiplex		
Předchozí metoda	Homozygotní divoký typ	Heterozygotní	Homozygotní mutant
Homozygotní WT	42	0	0
Heterozygotní	0	16	0
Homozygotní MUT	0	0	3

C282Y	Genvinset® HFE multiplex		
	Homozygotní divoký typ	Heterozygotní	Homozygotní mutant
Homozygotní WT	47	0	0
Heterozygotní	0	8	0
Homozygotní MUT	0	0	6

Kromě toho byly sekvence primerů a sond srovnány *in silico*. Nasedání sekvencí primerů je specifické pro gen *HFE*. Sondy nasedají specificky na pozici H63D (NCBI dbSNP rs1799945; NM_000410.4:c.187C>G) a C282Y (NCBI dbSNP rs1800562; NM_000410.4:c.845G>A) v genu *HFE*. Nebyly zaznamenány žádné zkřížené reakce s genomovou DNA.

Přítomnost variant v místech nasedání 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® HFE multiplex: rs8934889, rs1467801632, rs977937170, rs147426902, rs556335391, rs1800730, rs748693003, rs1190990892, rs369354634, rs1177377262, rs111033563, rs1156920296, rs143175221. Správné genotypy byly až na výjimky získány v případě většiny variant (viz oddíl 13, Omezení postupu).

Byl analyzován vliv některých exogenních a endogenních potenciálně interferujících látek na výsledky multiplexního kitu Genvinset® HFE a byly vypočteny hodnoty IC50. Tyto látky byly přidány ke gDNA, které byly následně analyzovány pomocí soupravy Genvinset® HFE multiplex. Anomální amplifikační křivky se objevily v přítomnosti 8,57 g/l imunoglobulinu G a při 1,66 g/l laktoferinu. Hodnoty IC50 jsou uvedeny v následující tabulce:

Látka	IC50
Hemoglobin	0,81 g/l
Imunoglobulin G	0,70 g/l
FeCl3	4,67 mM
Hemin	2,38 mM
Laktoferin	0,99 g/l
K2-EDTA	39,77 mM
Ethanol	41.52 %

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

→ Analytická citlivost

LoD: Ředící test byl proveden s použitím tří vzorků DNA (H63D homozygotní mutant, C282Y homozygotní mutant a H63D/C282Y heterozygot). Testované vstupní hladiny DNA se pohybovaly od 40 ng do 0016 ng (**) v trojnásobné ředící sérii. Každá koncentrace byla testována ve třech opakováních. Byly získány následující údaje:

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

Horní mez: tři vzorky DNA (H63D homozygotní mutant, C282Y homozygotní mutant a H63D/C282Y heterozygotní mutant) byly testovány v sérii dvojnásobného ředění v rozmezí od 400 ng do 400 ng.

6,25 ng (**). Výkonnost testu zůstala přijatelná při všech vstupních úrovních, vhodné sigmoidální amplifikační křivky a genotypová volání byla přesně provedena při všech úrovních (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® HFE multiplex. Byly získány následující výsledky:

H63D	Genvinset® HFE multiplex		
Předchozí metoda	Homozygotní divoký typ	Heterozygotní	Homozygotní mutant
Homozygotní WT	21	0	0
Heterozygotní	0	19	0
Homozygotní MUT	0	0	8

C282Y	Genvinset® HFE multiplex		
Předchozí metoda	Homozygotní divoký typ	Heterozygotní	Homozygotní mutant
Homozygotní WT	25	0	0
Heterozygotní	0	13	0
Homozygotní MUT	0	0	10

Výsledky získané pomocí soupravy Genvinset® HFE 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 dvakrát.

Multiplexní souprava Genvinset® HFE vykazovala 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi jednotlivými sériemi, šaržemi, termálními cykly v reálném čase a operátory. Použité vzorky reprezentují celý rozsah očekávaných analytů, které lze měřit pomocí soupravy Genvinset® HFE multiplex, tj. homozygotní i heterozygotní. Byly testovány tři různé šarže ve třech různých termálních cyklech PCR v reálném čase.

Genvinset® HFE multiplex kit vykázal 100% reprodukovatelnost.

→ Pravdivost

Správnost analytického postupu soupravy Genvinset® HFE multiplex se posuzuje porovnáním s referenční metodou. Studie byla vypracována jako interní validace

čidlo, u něhož byla prokázána správnost se 100% hodnotou. Viz oddíl "Diagnostická citlivost a specifčnost".

13- Omezení postupu

- Metoda detekuje mutaci H63D (NCBI dbSNP rs1799945; NM_000410.4:c.187C>G) a mutaci C282Y (NCBI dbSNP rs1800562; NM_000410.4:c.845G>A) v genu HFE (OMIM: 613609).
- Mutace nebo polymorfismy v místech žíhání primerů/sond mohou mít za následek nedostatečnou definici alel. K vyřešení typizace může být nutné použít jiné technologie. Vzorky heterozygotů H63D budou v přítomnosti varianty rs977937170 nesprávně genotypizovány jako homozygotní mutanti H63D. H63D heterozygotní vzorky mohou být nesprávně genotypizovány jako H63D homozygotní mutant v přítomnosti varianty rs147426902. C282Y heterozygotní vzorky budou nesprávně genotypizovány jako C282Y homozygotní mutant v přítomnosti varianty rs369354634 a mohou být nesprávně genotypizovány jako homozygotní mutant v přítomnosti nebo varianty rs111033563. 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 čidly 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 hereditární hemochromatózu. Tyto výsledky používejte ve spojení 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 přiřaďte polohu vzorků.
- Čidlo 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 ji po uplynutí doby použitelnosti.

- Uvedená množství jednotlivých činidel nebyla do reakční směsi přidána.
 - Zkontrolujte objem jednotlivých složek přidávaných 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 injekční lahvičky Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank.
 - Test opakujte s čerstvými alikvoty.
- Prostor pro přípravu PCR je kontaminovaný.
 - Čistěte povrchy, nástroje, 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 naše oddělné technické podpory najdete na adrese customersupport@bdrdiagnostics.com
- Přítomnost rušivých látek:
 - Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Test opakujte s novým odběrem vzorků a extrakcí DNA.

15- Odkazy

- 1) Katsarou, M. S., Papasavva, M., Latsi, R. G Drakoulis, N. Hemochromatóza: dědičná hemochromatóza a gen HFE. *Vitamins and Hormones* **110**, 201-222 (2019).
- 2) Porter, J. L. G Rawla, P. Hemochromatóza. *Medicina Interna de Mexico* **35**, 896-905 (2021).
- 3) Pearlman, B. L. Hereditární hemochromatóza: Včasná detekce běžného, ale nepolapitelného onemocnění. *Consultant- greenwich-*, **42**(2), 237-241 (2002).
- 4) Cukjati, M., Vaupotič, T., Rupreht, R. G Čurin-Šerbec, V. Prevalence mutací genů pro hereditární hemochromatózu H63D, S65C a C282Y ve slovinské populaci pomocí zdokonaleného vysokokapacitního genotypového testu. *BMC Medical Genetics* **8**, 69 (2007).
- 5) Kowdley, K. v., Brown, K. E., Ahn, J. G Sundaram, V. ACG Clinical Guideline: Hereditární hemochromatóza. *American Journal of Gastroenterology* **114**, 1202-1218 (2019).

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, nepřenositelná 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.
Rev. 01	Zavedení označení CE. Soulad s nařízením (EU) 2017/746.

18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

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