



Genvinset[®]

HLA C*06

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro detekci skupiny alel HLA-C*06*

Pro in vitro diagnostické použití

Rev. 04 /2024-09-25



Blackhills Diagnostic Resources S.L.U
Camino del Pílon 86, Casa 7, Local
50011 – Zaragoza (Španělsko)



www.bdrdiagnostics.com



Kódy výrobku:

GVS-Co6-24 (24 tests)

GVS-Co6-48 (48 tests)

UDI-DI:

8437016942482

8437016942499

Skladování:

od -30°C do -18°C

Genvinset®

HLA C*06

Obsah

1 -	<i>Bezpečnostní informace</i>	3
2 -	<i>Zamýšlené použití</i>	3
3 -	<i>Souhrn a vysvětlení</i>	3
4 -	<i>Princip metody</i>	4
5 -	<i>Obsah soupravy</i>	4
6 -	<i>Skladování soupravy</i>	5
7 -	<i>Materiál potřebný, ale nedodávaný</i>	5
8 -	<i>Odběr vzorku a příprava</i>	6
9 -	<i>Pracovní postup</i>	6
10 -	<i>Výsledky</i>	7
11 -	<i>Kontrola kvality</i>	8
12 -	<i>Specifická operační data</i>	9
13 -	<i>Omezení metody</i>	11
14 -	<i>Řešení problémů</i>	11
15 -	<i>Odkazy</i>	13
16 -	<i>Poznámky zákazníkovi</i>	13
17 -	<i>Kontrola změn</i>	14
18 -	<i>Vysvětlení symbolů použitých na štítcích</i>	14

1- Bezpečnostní informace

Přečtěte si prosím celý tento návod k použití a následujte jej během používání aktuální IVD soupravy.

Souprava IVD by měla být používána odborníky se dobrými zkušenostmi s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

V případě pochybností ohledně popisu metody testu se poraďte s výrobcem. Kontaktujte telefonicky +34 976 094 603 nebo emailovou adresou customersupport@bdrdiagnostics.com.

Souprava IVD má omezenou životnost. Před použitím soupravy se ujistěte, že nevypršela doba použitelnosti. Reagencie ze soupravy po datu expirace mohou být znehodnoceny, což by mohlo zhoršit výsledky. Reagencie s prošlou dobou použitelnosti zlikvidujte podle platných předpisů.

Kontaminace vzorku nebo činidla může způsobit nesprávné výsledky. Buďte pozorní při extrakci DNA a manipulaci se vzorky a činidly.

Tato souprava se může během přepravy nebo skladování poškodit. V případě podezření na poškození během přepravy soupravu nepoužívejte. Pečlivě dodržujte podmínky skladování popsané na štítku a v návodu k použití.

Zajistěte, aby bylo s odpadem nakládáno v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s odpady může vést ke kontaminaci životního prostředí. Nevylévejte jej do kanalizace nebo vodních toků. Likvidaci obsahu nebo nádoby zajistěte s pomocí pověřeného správce odpadů.

Jedna ze součástí soupravy, Primer Mix, obsahuje látku formamid, klasifikovanou jako zdraví nebezpečná v souladu s Nařízením (ES) č. 1272/2008. Na štítku je pro tuto složku odpovídající výstražný piktogram.

Toxikologické vlastnosti soupravy nebyly do hloubky studovány, proto se doporučuje vyhnout se kontaktu s kůží a sliznicemi. Nepožívejte. Používejte rukavice a ochranný oděv. Bezpečnostní listy materiálů (MSDS) jsou zákazníkům k dispozici na vyžádání a na webových stránkách výrobce. Nemanipulujte s reagenciemi, dokud si nepřečtete a nepochopíte všechna bezpečnostní opatření.

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

2 - Zamýšlené použití

Genvinset® HLA C*06 je poloautomatická diagnostická souprava in vitro pro stanovení skupiny alel HLA-C*06 v genomové DNA extrahované z plné krve, které souvisí s náchylností k psoriáze a účinnosti její léčby, pomocí PCR v reálném čase s využitím technologie sond TaqMan®.

Test pro určení skupiny alel HLA C06. je určené pro pacienty doporučené příslušným odborníkem - dermatologem a s ohledem na kompatibilitu prezentovaných příznaků; vyrážka se svědivými, šupinatými červenými skvrnami, zejména na kolenou, loktech, trupu a pokožce hlavy, a/nebo s rodinnou anamnézou (např. bezprostřední ascendent s diagnózou lupénky). Pacienti, kteří mohou mít prospěch z tohoto určení, jsou ti, kteří jsou doporučeni specialistou. Výsledky tohoto testu by neměly být jedině, na kterých je založeno terapeutické rozhodnutí a měly by sloužit jako pomůcka při diagnostice spolu s výsledky dalších markerů onemocnění.

Předpokládaným uživatelem soupravy je technický personál vyškolený k provádění protokolu a interpretaci výsledků popsanych v návodu k použití.

3 - Souhrn a vysvětlení

Psoriasis vulgaris je chronické zánětlivé onemocnění kůže charakterizované hyperplazií epidermis, zánětlivou buněčnou infiltrací a cévní přestavbou ^{1,2}. V běžné populaci má přibližně 2-4% prevalenci a až u 40 % psoriaticů se vyvine psoriatická artritida ^{3,4}. Má komplexní etiologii, která zahrnuje jak genetické,

tak environmentální faktory. Hlavní příčina psoriázy však zůstává neznámá.

Rodinné studie prokázaly, že lupénka má genetický základ a ve většině případů, ne-li ve všech, je multifaktoriální. Navzdory četným studiím genetických vazeb, které přinesly nejméně 19 kandidátních lokusů, identita příslušných genů zůstává nejasná⁵. Nicméně panuje obecná shoda, že hlavní genetická determinanta psoriázy, definovaná jako "psoriasis susceptibility 1" (PSORS1 [OMIM #177900]), se nachází v hlavním histokompatibilním komplexu (MHC)^{5,6}.

Existence alelických asociací mezi psoriázou a geny pro lidské leukocytární antigeny (HLA) v MH C je známá již více než 50 let⁷. HLA-C*06 byl identifikován jako hlavní genetický polymorfismus náchylnosti k psoriáze a identifikuje časnou psoriázu (typ 1) a guttatový podtyp onemocnění⁵. Celosvětová frekvence alely HLA-C*06 se značně liší a může se pohybovat od 14,1 % do 59,1 %, zatímco procento pacientů s psoriázou nesoucích HLA-C*06 se podle Chena a spol.⁸ pohybuje od 10,5 % do 77,2 %. Ačkoli je alela HLA-C*06 vysoce spojena s onemocněním, frekvence alely přímo neodráží prevalenci patologie, protože patogeneze psoriázy integruje genetické, environmentální a imunologické faktory¹.

Bylo prokázáno, že přítomnost alely HLA-C*06 ovlivňuje různé aspekty psoriázy, od genetické náchylnosti po klinickou manifestaci, komorbiditu a účinnost léčby⁸. Zajímavé je, že ačkoli je pozitivita této alely obvykle spojena s těžší a nestabilnější formou onemocnění, zdá se, že odpověď na léčbu je příznivější jak u konvenčních přípravků, tak u některých biologických léčiv^{9,10}.

4- Princip metody

Test je založen na metodě PCR v reálném čase a sondách TaqMan®. Každý vzorek se analyzuje:

- Pár *primerů* pro amplifikaci alel HLA-C*06 a pár primerů pro gen *ACTB* (β-actinu), která slouží jako vnitřní pozitivní kontrola (IPC).
- Hydrolýzní sonda specifická pro alelu HLA-C*06 značená na 5' konci fluoroforem FAM a hydrolýzní sonda specifická pro gen *ACTB* (IPC) značená na 5' konci fluoroforem HEX. Obě sondy jsou značené na 3' konci quencherem (zhašedlem), který inhibuje fluorescenci, pokud nedojde k amplifikaci.

V jak reakce PCR pokračuje dochází k štěpení sond hybridizovaných s komplementární sekvencí díky aktivitě 5'→3' exonukleázy Taq polymerázy, čímž se fluorofor oddělí od zhašedla a vzniká fluorescenční signál (v reálném čase), který je úměrný množství vzniklého produktu PCR. Který se monitoruje v přístroji pro PCR v reálném čase. Tudiž:

- V případě vzorků s jednou nebo dvěma kopiemi alel HLA-C*06 (HLA-C*06 pozitivní) se sonda značená FAM váže na svou komplementární sekvenci DNA, sonda značená HEX se váže na svou komplementární sekvenci DNA u IPC a je pozorována následující situace:
 - Fluorescenční signál v kanálu FAM (λ_{max} 518 nm)
 - Fluorescenční signál v kanálu HEX (λ_{max} 556 nm).
- V přítomnosti vzorků bez kopií alel HLA-C*06 (HLA-C*06 negativní) se sonda značená HEX váže na svou komplementární sekvenci DNA u IPC a je pozorováno následující:
 - Žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM a
 - Fluorescenční signál v kanálu HEX.

5- Obsah soupravy

→ GVS-Co6-24 (24 testů)

- GVS-Co6-PM: 1 lahvička x 192 µL Primer Mix (PM) - Modrý uzávěr
- GVS-Co6-MM: 1 lahvička x 240 µL Master Mix (MM) - Červený uzávěr
- GVS-Co6-C+: 1 lahvička x 15 µL Positive Control (C+) - Zelený uzávěr

- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µL Reaction Blank (RB) - Přírodní uzávěr

→ GVS-Co6-48 (48 testů)

- GVS-Co6-PM: 2 lahvičky 192 µL Primer Mix (PM) - -Modrý uzávěr
- GVS-Co6-MM: 2 lahvičky 240 µL Master Mix (MM) - Červený uzávěr
- GVS-Co6-C+: 1 lahvička x 15 µL Positive Control (C+) - Zelený uzávěr
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µL Reaction Blank (RB) - Přírodní uzávěr

6- Skladování soupravy

Všechny složky soupravy by měly být uchovávány při teplotě -30 až -18 °C. Při této teplotě jsou reagenty stabilní do data expirace vyznačené na lahvičce.

Neprovádějte více než 3 zmrazovací / rozmrazovací cykly lahviček neboť tím může být snížena senzitivita testu a ovlivněny výsledky. Pokud se provádění běhy s méně vzorky, doporučuje se reagenty alikvotovat a tak zredukovat zmrazovací / rozmrazovací cykly

Z důvodů fotosenzitivity Primer Mix, zabraňte stálé expozici světlu.

7- Materiál potřebný, ale nedodávaný

Obecně

- Rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební materiál

- Filtrační špičky (P200, P20, P10)
- 1,5 ml autoklávaná zkušavky
- RT-PCR reagenty specifické pro přístroj

Vybavení

- Vortex-mixer
- Centrifuga
- Pipety (P200, P20 & P10)
- Real-time PCR přístroj s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Následující přístroje byly validovány:
 - 7500, QuantStudio™ 5 and QuantStudio™ 6 Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems™.
 - LightCycler® 96 and LightCycler® 480 System, Roche.
 - Rotor-Gene® Q, Qiagen®.
 - DT Lite Real-Time PCR System, DNA-Technology.
 - qTOWER3 , Analytik Jena.
 - CFX 96 Real-Time PCR, BioRad.
 - Mic qPCR, Bio Molecular Systems

Tato souprava je kompatibilní s automatizovanými pipetovacími systémy, jako jsou OMNIA (Masmec Biomed), OT-2 (Opentrons) a epMotion® 5075 (Eppendorf). Ve všech případech musí být před použitím s touto soupravou proveden validační test těchto systémů.

8- Odběr vzorku 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 genomovou DNA extrahovanou ze vzorků plné krve konzervovaných antikoagulačními látkami, jako je EDTA nebo citrát. (podrobnosti viz oddíl 12)

Tato technika je kompatibilní s několika metodami extrakce DNA. Byly zjištěny některé interferující substance (viz oddíl 12). Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měl být proveden validační test 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- Pracovní postup

➔ Příprava 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 a zahájením testu na minimum.
 - Pro každý test se doporučuje testovat Reaction Blank (negativní kontrolu) a Positive Control (C+) dodanou se sadou.
- Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Injekční lahvičky se Primer Mix silně promíchejte a injekční lahvičky s Master Mix pečlivě promíchejte. Krátce odstředte, abyste zachytili objem na dně zkumavek.
 - Připravte reakční 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 zkumavek.

- Pipetujte 18 μl každé směsi do destiček/zkumavek PCR.
- Do každé jamky přidejte 2 μl DNA, (doporučená koncentrace mezi 10 a 200 ng/μl), Reaction Blank nebo Positive Control (C+).
- Uzavřete destičky/zkumavky pomocí příslušného těsnění a krátce odstředte, abyste odstranili případné bubliny. Ujistěte se, že se veškerý objem usadil na dně jamky.
- Umístěte destičku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak je popsáno v následující části.

➔ Konfigurace termo-cykleru

- Nastavte následující čtecí kanály:
 - FAM kanál pro detekci prób značených FAM
 - HEX/VIC kanál pro detekci prób značených HEX.

2. Nastavte následující amplifikační program a spusťte běh:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	40	95	00:10	X
		64	00:30 (*)	Single
Chlazení	1	15	∞	X

(*) Pro Rotor-Gene® (Qiagen) a DT-Lite (DNA-Technology) real-time PCR termo-cykly prosím nastavte následující program:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	40	95	00:10	X
		64	00:25 (*)	Single
Chlazení	1	15	∞	X

➔ Likvidace

Likvidace produktu musí být v souladu s lokálními nařízeními.

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. Doporučuje se zkontrolovat správné chování získaných amplifikačních křivek:

- Amplifikační signál je považován za pozitivní, pokud je pozorován rychlý a pravidelný nárůst hodnot fluorescence (exponenciální) (sigmoidální amplifikace) s $Ct < 35$.
- Slabý fluorescenční signál, signál na pozadí nebo exponenciální signál s $Ct > 35$ by neměl být považován za pozitivní amplifikaci. Tento test umožňuje detekci některých alel zahrnutých do skupiny vysoce polymorfních alel HLA, mezi nimiž byly popsány malé rozdíly v jejich sekvencích. Proto lze v kanálu FAM pozorovat slabé nespecifické signály jiných sekvencí podobných, ale nedetekovaných alel HLA. Výskyt těchto signálů neznamená neplatnost testu.

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

Vzorky s anomálními amplifikačními křivkami musí být znovu testovány.

POZOR!



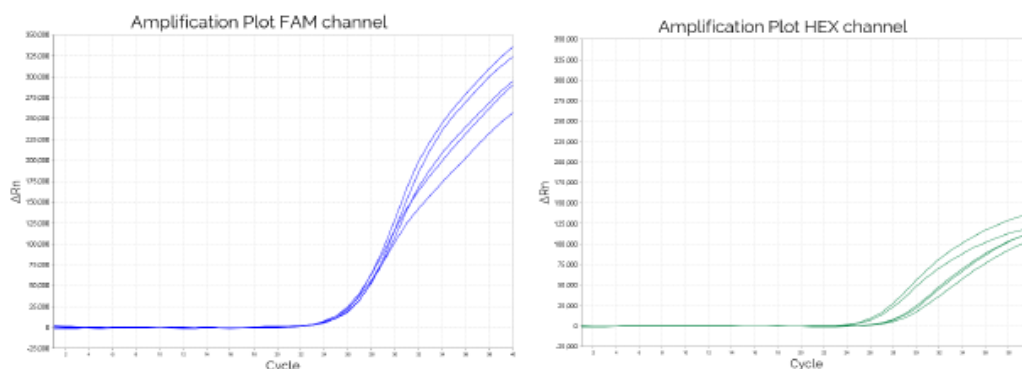
Chcete-li určit hodnotu Ct v každém kanálu, nastavte prahovou čáru následujícím způsobem:

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

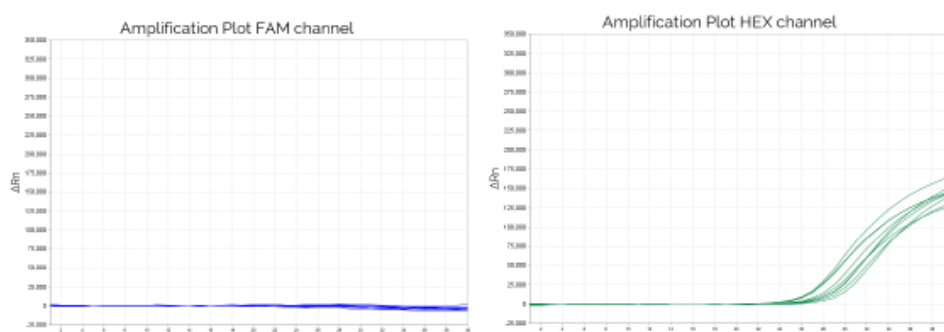
Výsledky získané pomocí této soupravy lze interpretovat vizualizací amplifikačních křivek v kanálech FAM a HEX. Zvolte "lineární stupnici" a určete nepřítomnost/přítomnost sigmoidální amplifikace v každém kanálu.

HLA C*06 pozitivní vzorky



Exponenciální amplifikace s $Ct < 35$ v kanálu FAM i HEX

HLA C*06 negativní vzorky



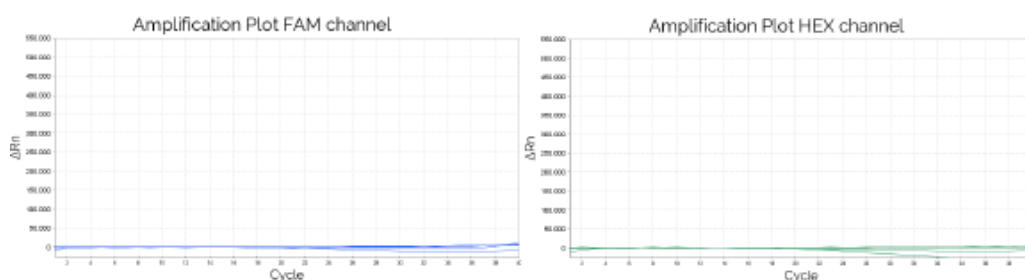
Žádný signál nebo signál s nízkou intenzitou v kanálu FAM a exponenciální zesílení v kanálu HEX ($Ct < 35$).

11- Kontrola kvality

Souprava obsahuje Reaction Blank a Positive Control (C+), které musí být testovány v každém běhu. Odpovídající chování těchto kontrolních vzorků je zárukou správného provedení testu soupravou.

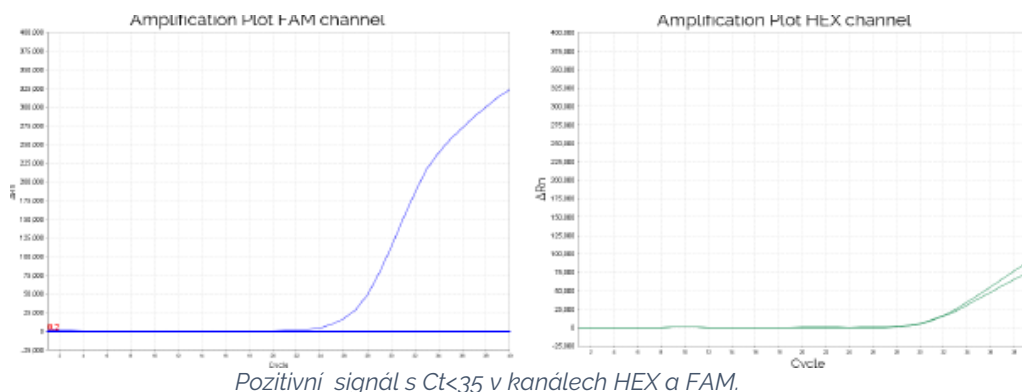
Výsledky se považují za platné, pokud se u kontrolních vzorků získá následující amplifikační vzorec:

Reaction Blank



Žádný signál v kanálech FAM i HEX nebo amplifikace s $Ct > 35$.

Positive Control (C+)



IPC se detekuje v kanálu HEX a používá se jako vnitřní pozitivní kontrola pro každý analyzovaný vzorek. Proto je výsledek vzorku považován za platný, pokud je v kanálu HEX alespoň sigmoidní amplifikace s $Ct < 35$.

Pokud je u výše uvedených kontrol pozorováno odpovídající chování, pokračujte v interpretaci vzorků, jak je uvedeno v předchozím oddíle.

Výsledek se považuje za neplatný a měl by se opakovat, pokud:

- Je pozorována amplifikační křivka s $Ct < 35$ v kanálech FAM a/nebo HEX v Reaction Blank.
- Je pozorován neexponenciální amplifikační signál nebo se v Positive Control objeví amplifikační signál s $Ct > 35$.
- Vzorky DNA s amplifikačními křivkami s $Ct > 35$ v kanálech FAM a/nebo HEX je třeba považovat za pochybné a je třeba je znovu otestovat provedením nové extrakce DNA.

12- Specifická operační data

→ Analytická specifita

Analytická specifita soupravy Genvinset® HLA C*06 byla analyzována na základě:

- výsledků získaných během interní validace této soupravy, kdy byla v našich zařízeních analyzována studie s různými vzorky gDNA dříve typovanými alternativní metodou. Výsledky soupravy Genvinset® HLA C*06 jsou plně v souladu s výsledky genotypu získanými alternativní metodou. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Předchozí metoda	Souprava Genvinset® HLA C*06	
	HLA-C*06 pozitivní	HLA-C*06 negativní
HLA-C*06 pozitivní	25	0
HLA-C*06 negativní	0	93

- Zarovnání sekvence primerů a sond s databází genomové DNA. Nebyly hlášeny žádné jevy zkřížené reakce s jinými oblastmi DNA.
- Zarovnání sekvence primerů a sond s databází IPD-IMGT/HLA. Je možné, že intronové oblasti některých nečastých alel ještě nebyly sekvenovány, takže *in silico* zarovnání primerů a sond v těchto oblastech není známo. Vygeneruje se zpráva se seznamem detekovaných alel a žádných testovaných alel s možným signálem nízké intenzity. Tato zpráva je každoročně aktualizována a lze ji nalézt na adrese www.bdrdiagnostics.com.

Byl analyzován účinek některých exogenních a endogenních potenciálně interferujících látek na výsledky soupravy Genvinset® HLA C*06 a byly vypočteny hodnoty IC₅₀. Tyto látky byly přidány do gDNA, které byly následně analyzovány soupravou Genvinset® HLA C*06. Hodnoty IC₅₀ jsou zobrazeny v následující tabulce:

Interference	IC ₅₀
Hemoglobin	2,08 g/L
Imunoglobulin G	10,02 g/L
FeCl ₃	0,28 mM
Citrát	1,5 mM
K ₂ -EDTA	7,03 mM
Ethanol	26,7 %

Přítomnost potenciálně inhibičních látek musí být během protokolů extrakce a purifikace DNA eliminována. Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška s takovou extrakční metodou.

➔ Analytická senzitivita

LoD: Diluční test byl proveden s použitím dvou vzorků DNA (HLA C*06 pozitivní a C*06 negativní vzorky). Testované vstupní hladiny DNA se pohybovaly od 40 ng do 0,016 ng (**) v trojnásobné ředící sérii. Každá úroveň byla testována ve třech opakováních. Byly získány následující údaje:

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

Horní mez: Dva vzorky s různými genotypy (HLA C*06 pozitivní a negativní) byly testovány v sérii dvojnásobného ředění v rozmezí od 800 ng do 6,25 ng (**). Výkonnost testu zůstala na všech vstupních úrovních přijatelná: vhodné sigmoidální amplifikační křivky a genotypová volání byla přesně detekována na všech úrovních (s hodnotami Ct<35).

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

➔ Diagnostická senzitivita a specifita

V různých laboratořích byly analyzovány různé vzorky. Tyto vzorky byly dříve typizovány jinou metodikou genotypizace než je souprava Genvinset® HLA C*06. Byly získány následující výsledky:

Předchozí metoda	Souprava Genvinset® HLA C*06	
	HLA-C*06 Pozitivní	HLA-C*06 Negativní
HLA-C*06 Pozitivní	23	0
HLA-C*06 Negativní	0	26

Byla zjištěna 100% shoda při testování soupravou Genvinset® HLA C*06 a jinými metodami.

➔ Přesnost

Studie opakovatelnosti spočívá v měření variability v rámci série prostřednictvím analýzy replik všech druhů vzorků, které lze soupravou měřit (pozitivní i negativní vzorky HLA-C*06). Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních.

Souprava Genvinset® HLA C*06 vykázala 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi

jednotlivými běhy, šaržemi, real-time termocyklery a operátory. Použité vzorky reprezentují celý rozsah očekávaných analytů, které lze měřit pomocí soupravy Genvinset® HLA C*06, tj. jak HLA-C*06 pozitivní, tak negativní vzorky. Tři různé šarže ve třech real-time termocyklerech byly testovány různými operátory.

Souprava Genvinset® HLA C*06 vykázala 100% reprodukovatelnost.

➔ Pravdivost

Správnost analytického postupu soupravy Genvinset® HLA C*06 byla posouzena porovnáním s referenční metodou. Studie byla vypracována jako interní validace, v níž byla prokázána pravdivost se 100% hodnotou. Viz oddíl "Diagnostická senzitivita a specificita".

13- Omezení metody

- Souprava detekuje alely HLA-C*06 zahrnuté v "HLA alleles detected_GVS-C06" na adrese www.bdrdiagnostics.com. Vzhledem k vysoce polymorfní povaze alel HLA, v kanálu FAM se mohou objevit slabé signály z jiných alel podobného pořadí, které nejsou detekovány touto soupravou
- Jsou možné mutace nebo polymorfismy v místech nasedání primerů/sond, což může vést k nedostatečné definici alel. K vyřešení typizace by mohly být nezbytné další technologie.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli úkony, které tyto pokyny nesplňují, mohou vést ke špatným výsledkům.
- Nepoužívejte soupravu, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnější krabičky nebo jakýkoli jiný výskyt, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Veškerá manipulace s činidly Genvinset® musí být prováděna v souladu se správnou laboratorní praxí a musí být přizpůsobena místním nařízením.
- Nemíchejte složky z jiných souprav nebo čísel šarží.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti. Prošlá činidla zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Termocykler PCR v reálném čase musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán v souladu s pokyny výrobce.
- Vzhledem ke složitosti typizace HLA, údaje a interpretaci výsledků by měl revidovat kvalifikovaný personál.
- Tento produkt je pomocným nástrojem pro diagnostiku pacientů s podezřením na onemocnění asociovaná s HLA-C*06. Tyto výsledky používejte ve spojení s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených u pacienta.

14- Řešení problémů

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

- PCR přístroj 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 na pracovním listu se neshodují s pozicemi, ve kterých byly umístěny v přístroji.
 - Správně přiřadte polohu vzorků.
- Činidlo nepracuje správně.
 - Zajistěte, aby byla souprava skladována při vhodné teplotě (mezi -30 °C a -18 °C) a chráněna před světlem. Vyhněte se zbytečným cyklům zmrazování/rozmrazování. Nepoužívejte ji po uplynutí doby použitelnosti.

- Do reakční směsi nebyla přidána uvedená množství jednotlivých činidel.
 - Zkontrolujte objemy jednotlivých složek přidanych do směsi.
- Použitý spotřební materiál není kompatibilní s používaným zařízením.
 - Ujistěte se, že používáte správný spotřební materiál (kompatibilní s přístrojem PCR).

→ V klinických vzorcích není detekován 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.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
 - Nastavte koncentraci DNA na doporučovanou hodnotu
- Inhibice amplifikace.
 - Odeberte plnou krev do zkumavek s EDTA nebo citrátem.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
 - Opakujte test a ujistěte se, že byly přidány vzorky.

→ Signál detekován 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.
- Znečištění lahvičky se Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank vzorku.
 - Opakujte test s čerstvými alikvoty.
- Prostor pro přípravu PCR je kontaminován.
 - Vyčistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a vyměňte spotřební materiál a reagenty. Opakujte test.

→ Intenzita fluorescence se u jednotlivých vzorků liší nebo jsou zjištěny abnormální amplifikační křivky.

- Znečištění vně reakční zkumavky ruší detekci fluorescence.
 - Důkladně vyčistěte zařízení. Zkontrolujte, zda je vnější strana zkumavek/plotýnek čistá. S destičkami/zkumavkami manipulujte v rukavicích.
- Objem není na dně jamky nebo se v něm vyskytují bublinky.
 - Před vložením do termocykleru destičky/zkumavky odstředte.
 - Zkontrolujte, zda se v nich nevyskytují bubliny. Pokud ano, odstraňte je.
- Destička/zkumavky nebyly řádně uzavřeny.
 - Zopakujte analýzu a zkontrolujte, zda byly destičky/zkumavky 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.
 - Kontaktujte naše oddělení technické podpory prostřednictvím webové stránky customersupport@bdrdiagnostics.com.
- Přítomnost interferujících substancí
 - Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte testy s novými vzorky a DNA extrakcí

15- Odkazy

- 1) Nestle, F. O., Kaplan, D. H. & Barker, J. Psoriasis. *New England Journal of Medicine* **361**, 496–509 (2009).
- 2) Christophers, E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* **26**, 314–320 (2001).
- 3) Reindl, J. *et al.* Proteomic biomarkers for psoriasis and psoriasis arthritis. *Journal of Proteomics* **140**, 55–61 (2016).
- 4) Rachakonda, T. D., Schupp, C. W. & Armstrong, A. W. Psoriasis prevalence among adults in the United States. *J Am Acad Dermatol* **70**, 512–516 (2014).
- 5) Mahil, S. K., Capon, F. & Barker, J. N. Genetics of Psoriasis. *Dermatologic Clinics* **33**, 1–11 (2015).
- 6) Capon, F., Trembath, R. C. & Barker, J. N. An update on the genetics of psoriasis. *Dermatol Clin* **22**, 339–347 (2004).
- 7) Russell, T. J., Schultes, L. M. & Kuban, D. J. Histocompatibility (HL-A) Antigens Associated with Psoriasis. *New England Journal of Medicine* **287**, 738–740 (1972).
- 8) Chen, L. & Tsai, T. F. HLA-Cw6 and psoriasis. *Br J Dermatol* **178**, 854–862 (2018).
- 9) Dand, N. *et al.* HLA-C*06:02 genotype is a predictive biomarker of biologic treatment response in psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* **143**, 2120–2130 (2019).
- 10) Talamonti, M., Galluzzo, M., Chimenti, S. & Costanzo, A. HLA-C*06 and response to ustekinumab in Caucasian patients with psoriasis: Outcome and long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol* **74**, 374–375 (2016).

16- Poznámky zákazníkovi

- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely *in vitro*.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie a pokud dojde k závažnému incidentu v souvislosti s použitím soupravy, musí to uživatel nahlásit výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo zemi pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být provedeno v souladu s místními požadavky pro každou zemi.
- Souhrn bezpečnosti a výkonu (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný uživatelům soupravy (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).
- Výrobky společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. by neměly být dále prodávány, upravovány za účelem dalšího prodeje nebo používány k výrobě jiných komerčních výrobků bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.
- Všechny 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.
- Zakoupením tohoto produktu získává kupující práva vyplývající z některých patentů společnosti Roche, které se používají pouze k poskytování diagnostických služeb *in vitro*. Neuděluje žádný generický patent ani žádné jiné patenty zaměřené na jiné použití než uvedené.
- FAM™ a HEX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- Na FAM™ a HEX™ se může vztahovat jeden nebo více patentů společnosti Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto produktu zahrnuje omezená, nepřenosná práva.
- TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.
- Genvinset® je ochranná známka společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.

17- Kontrola změn

Verze	Popis úpravy
Rev. 01	První verze dokumentu
Rev. 02	Oprava překlepů a chyb v překladu. Nové sekce: Informace pro bezpečnost, Přesnost a Pravdivost. Byly přidány informace týkající se určeného uživatele, určeného pacienta a interferenci. Nový design dokumentu. Změna objemu pozitivní kontroly. Změny v seznamu validovaných přístrojů. Vložení kódů UDI-DI.
Rev. 03	Označení CE doprovázené číslem NB, které certifikuje pod IVDR. Změna ve validovaných přístrojích. Změna v počtu validovaných vzorků. Změna názvu genu IPC. Oprava chyb. Aktualizace zamýšleného použití. Zahrnutí skutečnosti, že SSP je nahráno do EUDAMED a je přístupné uživatelům. Nové informace obsažené v sekci 12. Změny v LoD.
Rev. 04	Do oddílu 1 o složení a likvidaci činidla byla přidána další bezpečnostní upozornění. Byl přidán symbol ohrožení zdraví v části 17. Legální výrobce je uveden na titulní straně tohoto dokumentu.

18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Datum expirace
	Katalogové číslo		Obsah dostačující pro <n> testů
	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní limit		Chraňte před slunečním zářením
	Positive Control		Nahlédněte do elektronického návodu k použití
	Serious health hazard		Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 o <i>in vitro</i> testech. Diagnostický zdravotnický prostředek