



IVD

CeliacStrip

Souprava pro detekci HLA haplotypu spojeného s onemocněním celiakií



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA
+ 34 976 503597



CELIACSTRIP

Souprava pro detekci haplotypů spojených s onemocněním celiakií.

**POUZE PRO ODBORNÉ POUŽITÍ
PŘED POUŽITÍM TESTU SI POZORNĚ PŘEČTĚTE TENTO PRACOVNÍ NÁVOD.**

ÚVOD

URČENÉ POUŽITÍ

Test CeliacStrip je určen ke kvalitativní detekci hlavních haplotypů HLA spojených s celiakií prostřednictvím metody reverzního blottingu a pomáhá tak stanovit diagnózu této nemoci.

Test detekuje přítomnost nebo nepřítomnost alel, které kódují HLA-DQ2 a HLA-DQ8, HLA-DQ2.5, HLA-DQ8, HLA-DQ2.2 a HLA-DQ7.5 a umožňují odhadnout riziko onemocnění celiakií na základě kombinace zjištěných alel.

Haplotyp HLA-DQ		Alely HLA-DQA1	Alely HLA-DQB1	Alely HLA-DRB1
DQ2.5 (cis)		05*	02‡	03
DQ2.5 (trans)	DQ7.5 (DQA1*05)	05*	0301	11/12
	DQ2.2	02	02‡	07
DQ8		03†	0302	04

*Zahrnuje alely 05:01 a 05:05. †Zahrnuje alely 03:01 y 03:02. ‡Zahrnuje alely 02:01 y 02:02.

Podle příruček Španělské společnosti pro celiakii se k diagnostikování tohoto onemocnění genetickými testy stanoví riziko určené na základě přítomnosti různých haplotypů následovně:

Velmi vysoké riziko (DQ2.5 se dvěma kopiemi DQB1*02)	DQ2.5 (cis)+ DQ2.5 (cis) DQ2.5 + DQ2.2
Vysoké riziko (DQ2.5 s jednou kopií DQB1*02) (homozygot DQ8)	DQ2.5 (cis) + X DQ2.5 (trans) = DQ7.5+ DQ2.2 DQ8+DQ8 X≠DQ2.5, DQ2.2
Střední riziko (DQ8 a/nebo DQB1*02)	DQ8+X DQ2.2+Y X≠DQ8, DQ2.5

	Y≠DQ7.5
Nízké riziko (DQA1*05)	DQ7.5+X DQA1*05 + X X≠DQ2.2, DQ8, DQ2.5

Poznámka: v klasifikaci mohou existovat mírné změny v závislosti na zkoumané populaci.

Poznámka: tímto testem nelze potvrdit všechny kombinace.

Kromě alel HLA-DQA1 a HLA-DQB1 umožňuje test detekovat alely DRB1* (DR3, DR4, DR7, DR11 a DR12). Tyto alely se používají ke zvětšení rozlišení a specifity genotypizace a snazší určení genotypu v případě složitých haplotypů.

Tento test je pouze nástroj na pomoc odborníkům při diagnostikování udané patologie. Je důležité zdůraznit, že v případě celiakie má HLA typizace vysokou negativní prediktivní hodnotu (téměř 100 %), nicméně její pozitivní prediktivní hodnota je nízká. Nepoužívejte ho proto k diagnostice celiakie samostatně, protože přibližně 35–40 % celkové populace má heterodimery DQ2.5 a DQ8, ale pouze cca 1 % má celiakii. Ke konečné diagnostice je třeba brát v úvahu další parametry, jako projevující se symptomy, výsledky dalších analytických zkoušek a anamnézu pacienta.

Test probíhá za použití vzorků DNA. Tuto DNA lze extrahovat z krve (s EDTA nebo citrátem), ze slin nebo z tkáně.

Test je kvalitativní a neprovádí se automatizovaně, přestože lze jeho výsledky interpretovat vizuálně nebo prostřednictvím skeneru.

Tento test je určen výhradně k in vitro diagnostice.

Určeno pouze pro odborníky. Není určeno k samovyšetření. Test nenahrazuje lékařskou péči.

VŠEOBECNE INFORMACE

Celiakie je chronické zánětlivé onemocnění trávicího traktu způsobené nesnášenlivostí potravin obsahujících lepek a asociované proteiny, které se nacházejí v pšenici, ječmeni, žitu.

Nejvíce se vyskytuje v Kavkazské populaci s prevalencí 1:100 až 1:500 v Evropě a Severní Americe.

Citlivost na lepek je geneticky podmíněná. Je hereditární povahy manifestovaná se zvyšující se prevalencí v rodině (10-15%) a z 80 % u homozygotních dvojčat. Bylo prokázáno, že na této genetické predispozici se podílí série genů lokalizovaných na hlavním histokompatibilitním systému (MHC)I. V podstatě se předpokládá, že tento komplex se podílí na genetické citlivosti k celiakii ze 40 % a pravděpodobnost dalšího izolovaného genu je minimální.

Hlavní histokompatibilní systém se skládá ze sad genů, mnohé z nich jsou polymorfní, jejichž produkty jsou exprimovány v široké oblasti buněk a jsou zodpovědné za „adaptivní“ imunitní systém. Tyto geny jsou přítomné ve všech obratlovcích. Lidské geny jsou známé jako HLA (Human Leukocyte Antigen) systém. Proteiny kódované těmito geny se nazývají 'HLA molekuly' nebo 'HLA antigeny'.

Ve většině zkoumané populace je přibližně 88 % celiaků nositeli heterodimeru HLA-DQ2.5 kódovaného alelami DQA1*05 a DQB1*02 v poloze cis (stejný chromozóm) nebo v poloze trans (jiný chromozóm). 6 % celiaků exprimuje heterodimer HLA-DQ8 (bez HLA-DQ2.5) kódovaný alelami DQA1*03 a DQB1*0302. Ostatní kombinace spojované s celiakií (5,6 % pacientů) odpovídají „polovině“ genotypu HLA-DQ2.5, zejména DQB1*02 ve vazebné nerovnováze s DQA1*02 (HLA-DQ2.2, 4 % pacientů). Druhá polovina HLA-DQ2.5, DQA1*05 bez DQB1*02 se s celiakií spojuje jen zřídka (v 1,6 % případů). Tento genotyp je obvykle pozorován jako HLA-DQ7.5 (DQA1*05 a DQB1*0301) (Tye-Din J. et al).

Kromě toho, že má jedinec jednu z těchto specifických alel, závisí riziko rozvoje celiakie také na genové dávce. Nositelé HLA-DQ2.5 mají větší riziko, že se u nich celiakie rozvine, když mají dvě kopie alely HLA-DQB1*02, tedy ti s dvěma haplotypy DQ2.5 nebo jedním haplotypem DQ2.5 + jedním haplotypem DQ2.2 (Murray J. et al). Následující rizikovou kategorií tvoří jedinci s HLA-DQ2.5 s jednou kopií HLA-DQB1*02, tj. pouze ti s jedním haplotypem HLA-DQ2.5 nebo s HLA-DQ2.5 kódovaným v poloze trans. Při existenci pouze HLA-DQ8 nebo HLA-

DQ2.2 je riziko menší. Pro HLA-DQ8 byl rovněž navržen efekt genové dávky, aby homozygoty pro tento heterodimer přešly do kategorií s vyšším rizikem (Martínez-Ojinaga E et al). Přítomnost HLA-DQ7.5 (nebo DQA1*05) tvoří kategorii s nejnižším genetickým rizikem.

POPULACE, PRO NIŽ JE TEST URČEN

Výrobek je určen pro použití se vzorky pacientů, u nichž probíhá diagnostika celiakie, a jejich přímých rodinných příslušníků.

Jak již bylo uvedeno, přítomnost antigenů HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 není pro rozvinutí celiakie dostatečná. Ve skutečnosti je nositeli těchto heterodimerů 25–30 % celkové populace ve srovnání s více než 95 % celiaků. Jejich přítomnost však značně zvyšuje možnost onemocnění celiakií (50 až 100krát).

HLA genotypizaci doporučujeme provést v následujících případech:

- Vyloučení možnosti celiakie: pokud má jedinec příznaky, jež by mohly toto onemocnění indikovat, ale biopsie a sérologie nejsou průkazné, lze použít HLA typizaci jako další aspekt k posouzení. Přestože test není „specifický“, protože 35–40 % jedinců bez celiakie jsou nositeli heterodimerů HLA-DQ2.5/HLA-DQ8, může pomoci vyloučit celiakii u těch, kteří je nemají.
- Vyšetření možných pacientů s celiakií, kteří se již stravují bez lepku.
- Vyšetření rodinných příslušníků celiaků: umožňuje seznámit se s tím, u jakých rodinných příslušníků, zejména sourozenců, existuje riziko, že se u nich celiakie rozvine, a u kterých nikoli. Následně tak lze:
 - - důkladněji sledovat ty jedince, kteří mají markery HLA, a být na pozoru před možnými symptomy indikujícími celiakii, což umožňuje snížit poškození způsobené opožděnou diagnostikou,
 - - vyloučit pravidelné opakování sérologických analýz u těch rodinných příslušníků, kteří nemají markery HLA.

VÝSKYT ONEMOCNĚNÍ V POPULACI

Celiakie je jedním nejčastějších onemocnění v kavkazské populaci, s prevalencí přibližně 1 % (v závislosti na analyzované populaci).

ZDŮVODNĚNÍ

Test CeliacStrip je založený na technice reverzního blottingu a jeho provedení se skládá ze tří kroků:

a) extrakce DNA b) PCR amplifikace c) hybridizace.

a) DNA extrakce:

Reagencie nejsou součástí soupravy.
Viz oddíl „Vzorky“.

b) PCR amplifikace: současná amplifikace fragmentů genu β-globinu a exonů 2 HLA-DQA1, HLA-DQB1 a HLA-DRB1 v prvním kroku. Jsou amplifikovány následující skupiny alel uvnitř výše zmíněných HLA:

- HLA-DQA1: DQA1*01, DQA1*02, DQA1*03, DQA1*04, DQA1*05 and DQA1*06.
- HLA-DQB1: DQB1 * 02, DQB1*03, DQB1*04
- HLA-DRB1: DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14.

Přesto, že všechny uvedené alely se amplifikují PCR, nejsou jednotlivě detekovány pomocí stripu.

c) Hybridizace a specifická vazba:

K průkazu fragmentů PCR-amplifikované DNA se využívá série prób, které jsou kovalentně vázané na nylonovou membránu.

Každá membrána má následující próby:

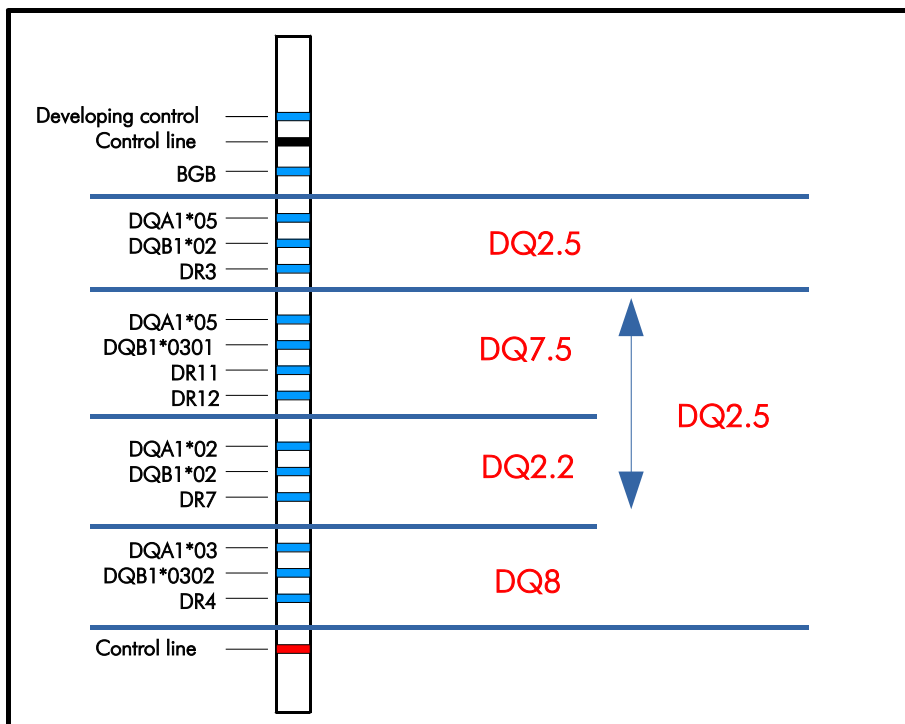
- 11 prób pro detekci různých skupin alel, dvě z nich ((DQA1*05 a DQB1*02) jsou v duplikátu na dvou lokacích na membráně.
- próba pro β-globinový fragment, používaná jako vnitřní kontrola PCR,
- kontrolní linie průběhu reakce.

Navíc se na membráně nachází dvě značky – černá a červená pro monitorování pozice stripu při interpretaci výsledků.

Vizualizace fragmentů hybridizovaných k různým próbám je pomocí konjugátu streptavidinperoxidázy, která se naváže na biotinový marker na amplifikovaných fragmentech DNA. Po přidání substrátu peroxidázy (TMB) se objeví modrý precipitát na hybridizovaných lokacích.

Výsledkem testu je vzorec linií, které je možno interpretovat pomocí kontrolního stripu.

Próby HLA alel jsou rozděleny na stripu do čtyř skupin:



OBSAH SOUPRAVY:

CELIACSTRIP			16-test-kit	48-test-kit
	Membrány	STRIPS	16	48
	8-pozic rámeček	PL	2	--
PCR Reagent REAG PCR	PCR směs	REAG PCR MIX	0,8 ml	1,2 ml x 2
	Primery	REAG PRIMER	0,1 ml	0,275 ml
	Taq	REAG TAQ	0,030	0,07
	Denaturace	SOLN DN	1 ml	1 ml
	Hybridizační pufr	BUF HYB	60 ml	125 ml
	Promývací pufr 1	BUF WASH 1	100 ml	250 ml
	Konjugát	CONJ HRP	60 ml	125 ml
	Promývací pufr 2	BUF WASH 2	130 ml	350 ml
	Substrát	SUBS TMB	30 ml	65 ml
	Návod		1	1
	Interpretační tabulka		1	1

1) Informace o složení reagensů jsou uvedeny v bezpečnostním listu výrobku. O jeho výtisk můžete požádat na e-mailové adrese msds@operon.es

2) Pozor: v případě používání automatických temperovaných třepaček destiček typu Profiblot nebo Dynablot Heat zaručuje obsah soupravy maximálně 4 celková použití.

3) Tyto pokyny k použití platí pro jakoukoli obchodní značku produktu: 3.152.XX.YY.000

MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY:

Pro použití soupravy je potřeba následující materiál:

1. Mikrozkmavky pro PCR.
2. Mikropipety a příslušné špičky (sterilní nebo UV, ideálně s filtrem).
3. Kleštičky a tužka.
4. Hodiny.
5. Teploměr.

VYBAVENÍ POTŘEBNÉ PRO VÝVOJ STRIPU.

1. Temperovaná třepačka (Termoshaker) pro destičky
Souprava byla validována s následujícími přístroji: PST-60HL (Biosan S.L), Profiblot T30 a T48 (Tecan) Autoblots 3000H (medTec), TENDIGO (Fujirebio).
2. Termocykler
Byly s úspěchem otestovány následující přístroje: PTC-100 (MJResearch), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S10000 Thermal Cycler (BioRad), G-Storm GS1 (Gene Technologies).
3. Skener BLOTrix S1 nebo BLOTrix R2 (BioSciTec, volitelně)

UPOZORNĚNÍ

1. Pouze pro in vitro použití.
2. Přesně následujte pracovní postup. Modifikace předepsaných **kroků a teplot** může významně ovlivnit výsledek
3. Výrobek je založen na technikách molekulární biologie, a proto je nutné dodržovat veškerá nezbytná opatření k zabránění kontaminace reagensů a/nebo degradace vzorků nukleových kyselin. Během celého procesu je tudíž třeba používat rukavice, měnit je podle potřeby a pečlivě udržovat čistotu pracoviště. Všechny materiály musí být bez kontaminace DNA-sou. Doporučuje se použití špiček s filtrem pro zamezení kontaminace aerosolem. Ujistěte se, že byla provedena všechna obvyklá opatření pro amplifikaci. Používejte autoklávaný materiál pro hybridizaci a vyvolání
4. Konjugát obsahuje materiál živočišného původu (kasein). Veškeré materiály živočišného původu jsou komerční a mají příslušný certifikát výrobce prokazující, že nejsou infekční.
5. Součásti soupravy skladujte podle návodu
6. Pokud jste nevyužili všechny reaktivní stripy, zajistěte řádné uzavření sáčku. Stripy by mohla poškodit vysoká vlhkost prostředí.
7. Nemíchejte komponenty soupravy z různých šarží
8. Nepoužívejte reagenty po datu expirace
9. Stripy jsou pro jedno použití
10. Dodané žlábkové jsou pro jedno použití
11. Každý žlábkový je pouze pro jeden strip.
12. V případě poškození vnější krabice, kdy nebyly poškozeny komponenty, je možné soupravu dále používat.
13. V případě poškození nebo porušení primárního obalu test zlikvidujte.
14. Jednotlivé komponenty je třeba likvidovat podle místních zákonů.
15. Se vzorky pacientů je třeba vždy nakládat jako s potenciálně infekčním. Je třeba dodržet standardy ochrany prostředí a bezpečnosti práce.
16. S použitým stripem je třeba zacházet jako se vzorkem. Je třeba pracovat s odpovídající opatrností a nakládat s ním jako s nebezpečným biologickým materiálem.
17. Denaturační roztok obsahuje <2 % NaOH a může podráždit oči i kůži (H314a P280, P305, P351, P338, P310).
18. Nelikvidujte vnější obal soupravy, dokud jste zcela nespotebovali obsah. Vnější obal obsahuje důležité informace o CE značení a šarži složek.
19. Jakoukoli závažnou nehodu související s výrobkem nahláste výrobci a příslušnému úřadu členského státu, u něhož je uživatel a/nebo pacient veden.

SKLADOVÁNÍ

Všechny reagenty skladujte při 2-8 °C. V některých roztocích se během skladování při nízké teplotě mohou objevit precipitáty (hybridizační pufr, promývací pufr 1 a 2, konjugát). Při temperování reagentů dojde k opětovnému rozpuštění – na pokojovou teplotu (konjugát) nebo předehřívání na 42 °C (hybridizační pufr, promývací pufr 1 a 2).

Datum expirace je vytištěno na nálepce.

Expirace a podmínky skladování otevřených reagentů jsou shodné s expirací a podmínkami původních reagentů.

VZORKY

Základním materiálem pro stanovení je DNA o známé koncentraci. Tato DNA může být extrahována z krve nebo z tkáně a měla by mít dostatečnou kvalitu pro PCR amplifikaci ($R_{260/280} > 1,5$).

Na CeliacStripu byly úspěšně testovány vzorky DNA, získané různými extrakčními postupy. Extrakční postupy byly:

- Extrakce DNA z čerstvé nebo zmražené krve na silikagelu (QIAamp DNA Blood Kit en Qiacube, Qiagen).
- Rychlá extrakce DNA z čerstvé nebo zmražené krve precipitací solí (vysolování)
- Extrakce z kapky krve na FTA filtračním papíru za použití soupravy Whatman (2 mm kruh)
- Extrakce z kapky krve na FTA filtračním papíru za použití soupravy Chelex 100 resin (8 mm kruh, 25 μ l Chelexu, PCR s 5 μ l)
- Vzorky slin odebrané a extrahované soupravou Norgen Biotek "Saliva DNA collection, isolation and purification kit".

Vzorky DNA uchovávejte při 2-8 °C pro použití ihned nebo při -20 °C pro delší dobu skladování.

INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Byl vyhodnocen možný efekt interference hlavních inhibitorů reakce PCR, které mohou být přítomné v krvi, konkrétně hemoglobinu, EDTA, lidských IgG, laktoferinu a acycloviru. Bylo prokázáno, že výsledky testu nejsou ovlivněny při provedení reakce za přítomnosti až 45 μ g/PCR lidských IgG, 100 ng/PCR laktoferinu a 10 000 μ M acycloviru. Tato množství značně převyšují maximální množství, které by mohlo být přítomno v krvi.

V případě EDTA je možná genotypizace až do koncentrace 0,7 mM, i když je patrné snížení intenzity značení od 0,4 mM (obvykle používaná koncentrace EDTA jako antikoagulantu je 0,35 mM). V případě hemoglobinu je možná genotypizace až do koncentrace 7,5 mg/ml v reakci, i když je patrné snížení intenzity značení od 0,2 mg/ml.

Nezávisle na těchto výsledcích se možné interferenční látky, jež by mohly mít vliv na reakci amplifikace, eliminují během procesu extrakce DNA. Existují dostatečné vědecké důkazy na to, že po standardní extrakci (ať již precipitací solí nebo za použití pryskyřic s oxidem křemičitým či magnetických částic) nezůstávají zbytkové látky, jež by mohly ovlivnit reakci PCR. Provedený test tedy odráží výsledky, které lze očekávat v případě nesprávné extrakce DNA.

Přítomnost inhibitorů v konečné DNA se detekuje nepřítomností amplifikace kontrolního genu během PCR.

CELIACSTRIP – PRACOVNÍ POSTUP

1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Příprava PCR:

Důležité: před otevřením víček reagenty krátce centrifugujte. To zajistí, že celý obsah bude na dně zkušební skleničky.

- Připravte potřebný počet PCR zkušebek podle počtu vzorků DNA na amplifikaci.
- Do každé PCR zkušebky přidejte: 39 μ l PCR premixu + 5 μ l primerů + 1 μ l Taq + 5 μ l DNA (50 ng/ μ l).

Dobře promíchejte. Pokud je to možné, udržujte během přípravy reagentie a směsi při 2-8 °C. Pokud bude amplifikováno více různých vzorků DNA, připravte běžnou směs tak, aby bylo možné přidat 45 µl směsi + 5 µl DNA (50 ng/µl). Příklady:

Počet PCR	PCR premix	Primery	Taq
1	39 µl	5 µl	1 µl
3	136,5 µl	17,5 µl	3,5 µl
5	214,5 µl	27,5 µl	5,5 µl
8	351 µl	45 µl	9 µl

*Směs obsahující všechny PCR komponenty by měla být vždy připravena s ohledem na kompenzaci ztráty během pipetování.

Dle požadavků správné laboratorní praxe by měl uživatel zařadit také negativní kontrolu (např. vodu nebo TE pufr) aby vyloučil kontaminaci a je-li požadováno i pozitivní kontrolu (není součástí soupravy)

Amplifikace:

Mějte na zřeteli potřebu vhodné koncentrace DNA pro správný výsledek.

Umístěte zkumavky do termocykleru (pokud je třeba, přidejte kapku Nujol mineral oil do každé PCR reakce) a amplifikujte podle následujícího programu:

96 °C, 5 min
 30 cyklů: 96 °C, 1 min
 55 °C, 1 min
 72 °C, 1 min
 72 °C, 5 min
 4 °C

→ Schéma přípravy PCR viz příloha dokumentu

Verifikace PCR

Výsledek může být ověřen na 2.5 % agarózovém gelu: Aplikujte 5 µl z každé PCR do jamky na gelu. Elektroforéza probíhá při 100 V 80 min a odečtete pod UV světlem.

Velikosti produktů amplifikace jsou následující:

β-globin: 268 bp.
 DQA1: 225 bp.
 DQB1: 269 bp.
 DR3/DR11/DR12/DR13/DR14: 270 bp.
 DR4: 259 bp.
 DR7: 261 bp.

Je možné, že na agarózovém gelu nerozlišíte jednotlivé proužky v důsledku podobné velikosti, nicméně obecně by se měly objevit alespoň 2 proužky, horní s vyšší intenzitou než nižší.

Po ukončení amplifikace proveďte buď ihned vyvíjení stripu nebo vzorky uchovejte po dobu 24 hod. při 2-8 °C nebo pro delší dobu zmražené při -20°C.

2. Vývoj stripu

Proces hybridizace a vyvíjení stripu je třeba provést protřepáním za kontrolované teploty (42 °C).

Souprava byla testována na různých platformách; testovány byly výše specifikované, ale nejsou požadovány exklusivně pro použití soupravy, je třeba pouze dodržet pracovní protokol. Souprava pracuje správně na jakékoliv platformě, důležité je zajištění požadované teploty.

Následující tabulka shrnuje nezbytné kroky:

		Teplota	Objem	Čas
Krok 1	Denaturační	Pokožová teplota	12,5 μ l PCR + 12,5 μ l DN	10 minut
Krok 2	Hybridizační	42 °C	2 ml Hybridizační pufr	30 minut
Krok 3	Promývací 1	42 °C	2 ml promývací pufr 1	10 minut
Krok 4	Promývací 1	42 °C	2 ml promývací pufr 1	10 minut
Krok 5	Konjugát	42 °C	2 ml de konjugátu	30 minut
Krok 6	Promývací 2	42 °C	2 ml promývací pufr 2	5 minut
Krok 7	Promývací 2	42 °C	2 ml promývací pufr 2	5 minut
Krok 8	Promývací 2	42 °C	2 ml promývací pufr 2	5 minut
Krok 9	Vývoj	42 °C	1 ml de substrátu	5-10 minut
Krok 10	Promývací H ₂ O	42 °C	2 ml de vody	2 minuty
Krok 11	Promývací H ₂ O	42 °C	2 ml de vody	2 minut
Krok 12	Promývací H ₂ O	42 °C	2 ml de vody	2 minut

Na vyžádání poskytne Operon pracovní postup pro konkrétní přístroj (TENDIGO, Profiblot nebo Autoblot 3000H), případně pro manuální provádění analýzy (PST-60HL manuální třepačka) nebo na: <https://operondx.com/es/products-protocols/> (CZ: postup na konci pracovního návodu)

V denaturačním kroku **12,5 μ l denaturačního pufru + 12,5 μ l PCR** se ředí ve žlábkách.

→ Viz příloha. Vývoj stripu

3. Odečítání stripů.

Odečítání stripu může být prováděno vizuálně pomocí výsledkové tabulky v soupravě (viz. Pracovní postup) nebo automaticky pomocí skeneru BLOTRix R2 nebo BLOTRix S1 (BioSciTec).

K vizuální interpretaci stripů:

- Vyjměte stripy z hybridizačního podnosu, položte je na vodorovnou plochu a nechte uschnout v temnu.
- Strip nalepte na papír (chcete-li stripy uchovat v dokonalém stavu, zakryjte je průhlednou lepenkou) a pomocí šablony kontrolního stripu interpretujte výsledky. Za tím účelem umístěte šablonu tak, aby byly vyrovnány černé a červené linie na stripu a na šabloně, a identifikujte proužky podle jejich polohy na stripu.

Na požádání dodá OPERON, S.A. uživateli návod pro automatické odečítání stripu pomocí skeneru (DO-09053004 "Instructions of use BLOTRix R2_S1"), případně se můžete informovat na následující adrese:

<https://operondx.com/es/products-protocols/>

Pozor: Výsledky odečítání stripů pomocí skeneru musí být vždy ověřeny vizuálně; velice slabé linie by nemusely být detekovány přístrojem.

VÝSLEDKY

Přítomnost některých haplotypů spojených s celiakií je určena přítomností skupin proužků, které detekují alely, tvořící jednotlivé haplotypy. Proto:

- Ve všech případech, kdy byla ke vzorku přidána lidská DNA, se musí objevit proužek odpovídající kontrole lidského β -globinu (BGB).
- Vzorek bude mít DQ2.5:
 - U **cis** (stejný chromozóm), když se objeví proužky odpovídající alelám DQA1*05 a DQB1*02, obvykle doprovázené alelou DRB1*03 (DR3).

Chybí-li DR3, lze zaručit existenci genotypu DQ2.5, ale její přítomnost při detekci alel DQA1*05 a DQB1*02 přináší větší specifitu..
 - U **trans**, když se objeví proužky odpovídající alelám DQA1*05 + DQB1*0301 (DQ7.5) a DQA1*02 + DQB1*02 (DQ2.2), obvykle doprovázené alelami DRB1*11 (DR11) a/nebo DRB1*12 (DR12) a DRB1*07 (DR7).

Chybí-li DR11, DR12 a/nebo DR7, lze zaručit existenci genotypu DQ2.5, ale jejich přítomnost při detekci alel DQA1 a DQB1 přináší větší specifitu.
- Vzorek bude mít DQ7.5, když se objeví proužky odpovídající alelám DQA1*05, DQB1*0301 a DRB1*11 (DR11) nebo DRB1*12 (DR12).

Vzorek bude mít DQ7.5, když se objeví proužky odpovídající alelám DQA1*05, DQB1*0301 a DRB1*11 (DR11) nebo DRB1*12 (DR12).

Za přítomnosti DR11/DR12 je potvrzena přítomnost DQ7.5, ale pokud přítomna není, výsledný genotyp je třeba potvrdit metodou s větším rozlišením.

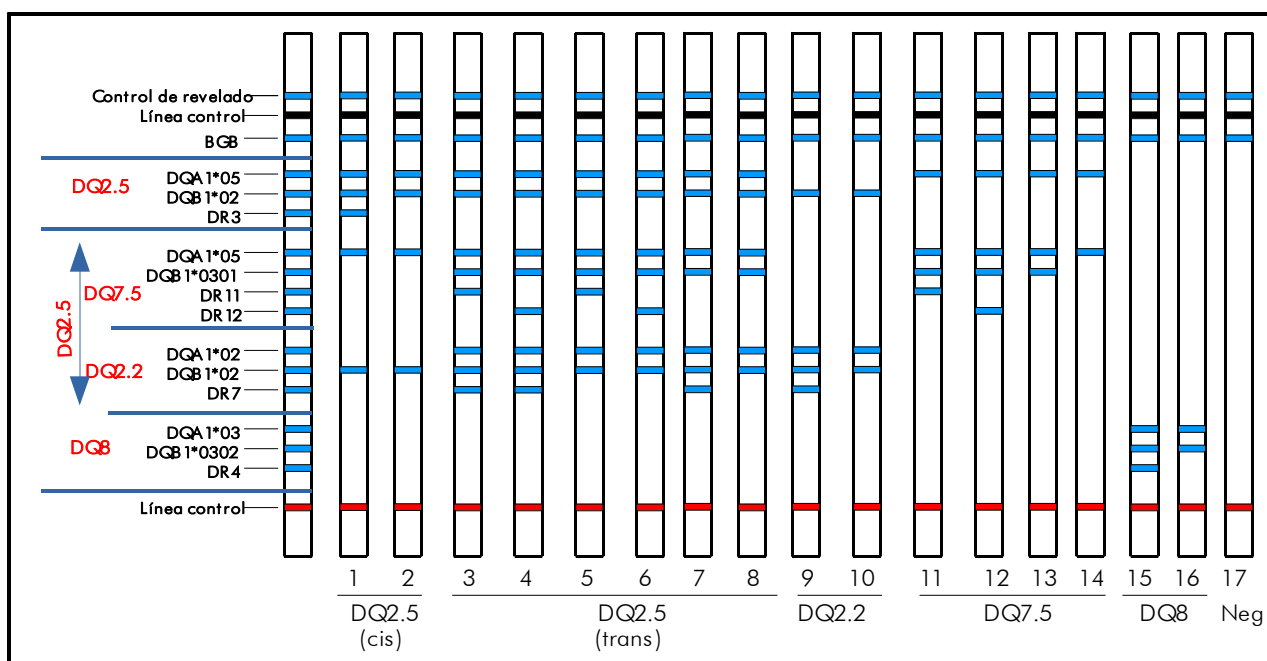
V každém případě lze zaručit přítomnost alely DQA1*05.
- Vzorek bude mít DQ2.2, když se objeví proužky odpovídající alelám DQA1*02 a DQB1*02, obvykle doprovázené alelou DRB1*07 (DR7).

Chybí-li DR7, lze zaručit existenci genotypu DQ2.2, ale její přítomnost při detekci alel DQA1*02 a DQB1*02 přináší větší specifitu.
- Vzorek bude mít DQ8, když se objeví proužky odpovídající alelám DQA1*03, DQB1*0302 a DRB1*04.

Jelikož próba B1*0302 není 100% specifická, chybí-li proužek DRB1*04 (DR4), nelze zaručit specifitu genotypu A1*03/B1*0302.

Za přítomnosti DRB1*04 je potvrzena přítomnost DQ8, ale bez něj je třeba výsledný genotyp potvrdit metodou s větším rozlišením.
- Ve všech předchozích případech lze detekovat i jiné proužky, pokud nepředstavují žádný z genotypů popsaných v tomto oddíle.
- Vzorek, který nemá některý z haplotypů spojených s celiakií, může vykazovat:
 - pouze proužek β -globinu (BGB) nebo
 - proužek β -globinu (BGB) a některý z proužků odpovídajících alelám, které tvoří haplotypy detekované pomocí této soupravy, ale za nepřítomnosti jiných proužků (nekompletní haplotypy).

Následující obrázky ilustrují možné kombinace haplotypů spojené s celiakií, které by mohly být detekovány pomocí CeliacStripu.



(*) V nepřítomnosti DRB1*11/DRB1*12 nelze zaručit přítomnost DQ7.5 genotyp by měl být potvrzen metodou s vyšším rozlišením.

(**) V nepřítomnosti DRB1*04 nelze zaručit přítomnost DQ8 genotyp by měl být potvrzen metodou s vyšším rozlišením.

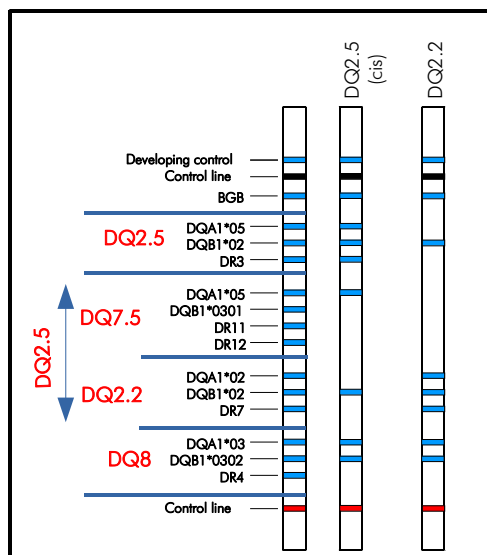
	Pozorované linie	Výsledek
Strip 1	DQA1*05 - DQB1*02 - DRB1*03	DQ2.5 (cis)
Strip 2	DQA1*05 - DQB1*02	
Strip 3	DQA1*05 - DQB1*0301 - DRB1*11 DQA1*02 - DQB1*02 - DRB1*07	DQ2.5 (trans)
Strip 4	DQA1*05 - DQB1*0301 - DRB1*12 DQA1*02 - DQB1*02 - DRB1*07	
Strip 5	DQA1*05 - DQB1*0301 - DRB1*11 DQA1*02 - DQB1*02	
Strip 6	DQA1*05 - DQB1*0301 - DRB1*12 DQA1*02 - DQB1*02	
Strip 7	DQA1*05 - DQB1*0301 DQA1*02 - DQB1*02 - DRB1*07	
Strip 8	DQA1*05 - DQB1*0301	

	Pozorované linie	Výsledek
	DQA1*02 - DQB1*02	
Strip 9	DQA1*05 - DQB1*0301 - DRB1*11	DQ7.5
Strip 10	DQA1*05 - DQB1*0301 - DRB1*12	
Strip 11	DQA1*05 - DQB1*0301	Posible DQ7.5 (*) DQA1*05 guaranteed
Strip 12	DQA1*05	DQA1*05
Strip 13	DQA1*02 - DQB1*02 - DRB1*07	DQ2.2
Strip 14	DQA1*02 - DQB1*02	
Strip 15	DQA1*03 - DQB1*0302 - DRB1*04	DQ8 (**)
Strip 16	BGB	Negativo

(*) V nepřítomnosti DRB1*11/DRB1*12 je pravděpodobnost DQ7.5 nižší než 85 %. Je třeba potvrdit prostřednictvím genotypizace jinou metodou.

(**) V nepřítomnosti DRB1*04 je pravděpodobnost DQ8 nižší než 80 %. Je třeba potvrdit prostřednictvím genotypizace jinou metodou.

V případě, genotypu s haplotypem pouze na jednom chromozomu jsou možné následující výsledky (reálné vzorky):



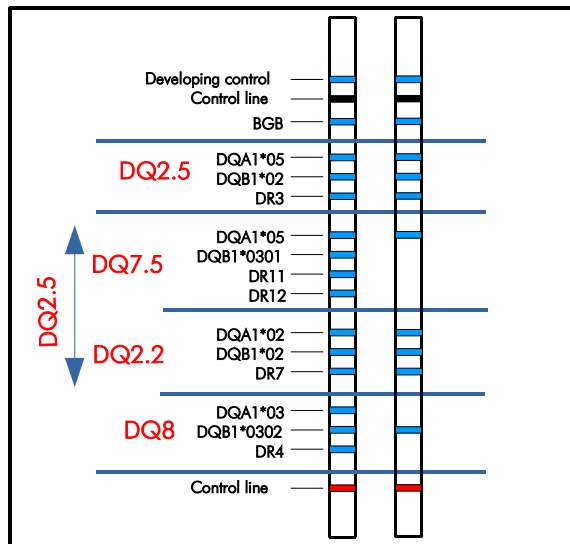
- DŮLEŽITÉ:** jsou-li přítomny pouze proužky tvořící DQ2.5 (cis) nebo DQ8 nebo DQ2.2 nebo DQ7.5, neurčuje to homozygotnost; touto soupravou se neamplifikují a nedetekují veškeré možné alely HLA-DQA/HLA-DQB, proto nelze vyloučit, že jedinec je nositelem některé z nich (ke konkretizaci je nutná analýza s větším rozlišením, než jaké se získá touto soupravou).

KONTROLA KVALITY

Linie kontroly kvality vývoje stripu se vždy objeví nad horní černou linií. Její nepřítomnost ukazuje na problémy v kroku hybridizace / vývoj barvy.

Proužek odpovídající negativní kontrole bude vykazovat pouze kontrolní linii vývoje stripu. Amplifikační kontrolní linie – kontrola spojená s detekcí β-globinu (BGB) se musí objevit u všech hodnocených vzorků. Jeho nepřítomnost indikuje problémy s krokem amplifikace (nepřítomnost DNA, nebo její nízká koncentrace, viz. PCR otázky).

Každý vzorek může vykazovat maximálně dvě DQA1 alely, dvě DQB1 alely a dvě DRB1 alely. (jednu na každém chromozomu). Konečný výsledek je třeba verifikovat s ohledem na tato pravidla. Mezi všemi analyzovanými vzorky se pouze jediný jevil jako sporný (ze 184 tj. 0,54%), nemožný analyzovat pomocí soupravy. Viz následující obrázek:



Tento vzorek vykazoval pozitivitu "DQA1*05 - DQB1*02 - DRB1*03 (haplotyp DQ2 cis) a jiný DQA1*02 - DQB1*02 - DRB1*07 (jeden z haplotypů DQ2 trans). Z toho by vyplývala přítomnost DQB1*02 alely na obou chromozómech ačkoliv se objevuje také DQB1*03:02 próba. Neboť není možné, aby se vyskytly současně tři alely DQB1*, jeden z genotypů není správný. V tomto případě není souprava schopná identifikovat, která z alel je skutečně přítomná ve vzorku.

SENZITIVITA A SPECIFICITA NÁLEZU / VLASTNOSTI / EXTERNÍ A INTERNÍ HODNOCENÍ

Používání této soupravy je omezené na odborníka., školeného v metodách molekulární biologie.

Souprava byla hodnocena pomocí vzorků získaných od pacientů s celiakií a členů jejich rodiny. Dalším použitým materiálem byly vzorky DNA dvou panelů International Histocompatibility Working Group ('SP Reference Panel' and 'Consanguineous Reference Panel'). Byly získány následující výsledky:

1. SP Reference Panel: 49 DNA vzorků bylo analyzováno (32 z nich s kompletní informací DQA1/DQB1/DRB1) ve 100 % shodě při identifikaci haplotypů spojených s celiakií (DQ2 cis, DQ2 trans and DQ8) vzhledem k informacím získaným IHWG.
2. Consanguineous Reference Panel': 49 DNA vzorků bylo analyzováno (43 z nich s kompletní informací DQA1/DQB1/DRB1) se shodou 100% při identifikaci haplotypů spojených s celiakií (DQ2 cis, DQ2 trans and DQ8) vzhledem k informacím získaným IHWG.
3. Vzorky pacientů a členů jejich rodiny: 80 DNA vzorků, z toho 98,9 % správných výsledků V 1 případě z 80 (1,2 %) souprava detekovala dva možné haplotypy bez možnosti dourčení správného výsledku.

MOŽNÉ PROBLÉMY

1. **Na stripu se neobjeví žádný proužek, ani kontrolní.**
 - Konjugát nebo substrát nebyl vytemperován na správnou teplotu.
 - Nebyl přidán konjugát nebo substrát nebo byl v příliš nízké koncentraci.
2. **Objeví se pouze kontrolní proužek**
 - PCR amplifikace neproběhla správně (ověřte na agarózovém gelu).
 - Nebyl přidán vzorek nebo byl příliš nízké koncentrace pro hybridizaci.
 - Nesprávná hybridizace nebo teplota promývacího pufru 1 (vyšší než v návodu).

- Nesprávná teplota hybridizace (vyšší než v návodu).

3. Na stripu je silné barevné pozadí

- Promývací krok nebyl proveden účinně (špatné načasování, malý objem promývacího pufru, studený pufr).

4. Nehomogenní zbarvení stripu

- Neadekvátní třepání (zkontrolujte program thermoshakeru – třepačky).
- Stripy nebyly dobře ponořeny během inkubace.

5. Neočekávané výsledky

- Neadekvátní inkubace nebo teplota reagentů.
- Kontaminace PCR (ověřte pomocí negativní kontroly).
- Kontaminace žlábků během přenášení reagentů během přidávání hybridizačního pufru.

Výkonnost testu byla vyhodnocena změnou teploty hybridizačního - vývojového kroku mezi 39 a 45 °C. Byly získány následující výsledky:

- Optimální teplota pro průběh testu je 42°C.
- Pod touto teplotou próba DRB1*12 vykazuje malou tendenci zkřížené reakce s DRB1*14 (při 41°C velice slabá s klesající teplotou se zvyšuje).
- Nad teplotou 42°C se snižuje intenzita proužků a senzitivita testu. Při 43°C je změna intenzity velice malá, mírná je i při 44°C, ale při 45°C je již signifikantní.

Tudíž doporučená teplota hybridizace, která by měla být udržována a kontrolována je 42°C.

SCHOPNOST DETEKCE A ANALYTICKÁ SPECIFICITA

Prostřednictvím několika šarží bylo vyhodnoceno minimální množství čisté DNA, které lze se sadou CeliacStrip adekvátně genotypizovat. Na základě zjištěných výsledků bylo stanoveno, že minimální množství DNA v PCR, s nímž je možné získat dokonale čitelné výsledky, je 5 ng. U nižších množství jsou proužky velmi slabé a v některých případech obtížně viditelné.

Analýzou „in silico“ byla teoreticky odhadnuta senzitivita detekce jednotlivých alel (počet detekovaných alel proti celkovému počtu alel každé skupiny, revize z r. 2019). Výsledky jsou zobrazeny níže:

	% detekovaných alel		% detekovaných alel
DQA1*02	100	DRB1*03	95,1-97,6
DQA1*03	95,5-100	DRB1*04	95,8
DQA1*05	98-100	DRB1*07	95,4-100
DQB1*02	96,7-98,6	DRB1*11	96,2-99,2
DQB1*0301	97-100	DRB1*12	89,5
DQB1*0302	97,3-100		

Ne všechny próby používané k identifikaci jednotlivých skupin alel jsou 100% specifické; test je založen na vazebné nerovnováze systému HLA k dosažení jisté detekce haplotypů spojených s celiakií. Analýzou „in silico“ (revize z r. 2019) byla prokázána 100% specifická u prób pro DQA1*05/03/03 a DQB1*02 a více než 99% v případě DRB1*03/04/07/11/12, nicméně kolem 85 % v případě DQB1*0302 a DQB1*0301. Proto výsledky testu nepoužívejte k identifikaci jednotlivých alel, zvláště v případě DQB1*0301 a DQB1*0302.

Byly zkontrolovány výsledky HLA genotypizace u 509 vzorků (IHWG). Z 509 genotypů jich 318 obsahovalo alely, které by mohly být spojené s rizikem celiakie. Z nich:

- 66 jich bylo DQ2.5 pozitivních v cis; všechny tyto byly také DR3 pozitivní. Těchto 66 bylo správně identifikováno testem CeliacStrip (senzitivita detekce haplotypu > 99,9 %).
Všechny vzorky měly stejný rizikový haplotyp: A*0501+B*0201+DR3.
- 8 jich bylo DQ2.5 pozitivních v trans; všechny tyto byly také DR7 a DRB11/DR12 pozitivní.
Těchto 8 bylo správně identifikováno testem CeliacStrip (senzitivita detekce haplotypu > 99,9 %).
Zjištěné haplotypy odpovídaly následujícím vzorkům:
 - - 6 vzorků mělo A*0201+B*0201+DR7/A*0501+B*0301+DR11.
 - - 1 vzorek měl A*0201+B*0202+DR7/A*0505+B*0301+DR11.
 - - 1 vzorek měl A*0201+B*0201+DR7/A*0501+B*0301+DR12.
- 52 vzorků bylo DQ2.2 pozitivních, z nichž 50 jich bylo DR7 pozitivních a 2 negativní.
Těchto 52 bylo správně identifikováno testem CeliacStrip (senzitivita detekce haplotypu > 99,9 %).
Z 52 vzorků jich 13 mělo B1*0202 a zbytek B1*0201.
- 73 vzorků bylo DQ7.5 pozitivní, z čehož 15 nemělo DR11/DR12 (8 jich mělo DR13, 1 DR16 a 6 DR14).
Těchto 73 vzorků bylo správně identifikováno jako DQA1*05 (senzitivita detekce alely > 99,9 %). Z nich bylo 58 řádně identifikováno testem CeliacStrip jako DQ7.5 (senzitivita detekce haplotypu = 79,5 %), ostatních 15 vyžadovalo pro potvrzení genotypizaci s větším rozlišením.
2 z 15, které neměly DR11/DR12, měly alely A1*0503 (místo A1*0501 nebo A1*0505). Pokud by tyto nebyly považovány za DQ7.5 (protože nejde o A1*0501 nebo A1*0505), šlo by o 71 DQ7.5 pozitivních vzorků, z nichž 13 nemělo DR11/DR11, a senzitivita detekce haplotypu testem CeliacStrip by činila 81,7%.
- 93 vzorků bylo DQ8 pozitivních, z čehož 92 bylo DR4 pozitivních a 1 negativní.
92 jich bylo správně identifikováno testem CeliacStrip (senzitivita detekce haplotypu = 98,9 %) a 1 vyžadoval k potvrzení genotypizaci s větším rozlišením. Ze všech vzorků měl 1 A1*0302, pouze v 17 byla zjištěna A1*03 a ve zbytku A1*0301.

HOOK EFFECT

Byl posuzován vliv koncentrace DNA (až 1,500 ng) na výsledky CeliacStrip souprav. Nebyl zjištěn vliv na intenzitu zbarvení a nebyly zaznamenány zkřížené reakce. Neprojevuje se HOOK EFEKT

INTRA-ASSAY PRECISION

Byla posuzována spolehlivost stanovení CeliacStrip mezi jednotlivými sériemi analýz. Bylo použito pěti replik tří DNA vzorků na třech různých šaržích. Analýzy byly prováděny jednou osobou a výsledky byly identické ve všech případech. To představuje vysokou spolehlivost mezi sériemi analýz.

PŘESNOST MEZI DNY

Vzorky DNA byly analyzovány v dubletech třemi šaržemi v 5 po sobě následujících dnech. Analýza byla prováděna jednou osobou a získané výsledky byly identické ve všech případech., což dokazuje vysokou spolehlivost analýzy mezi dny.

PŘESNOST MEZI OPERÁTORY / MEZILABORATORNÍ PŘESNOST

Tři lidé analyzovali 3 vzorky DNA v dubletech pomocí CeliacStrip soupravy téže šarže. Analýza byla prováděna ve stejný den; získané výsledky byly identické, což dokazuje vysokou spolehlivost v rámci zastupitelnosti personálu

PŘESNOST MEZI ŠARŽEMI:

Tři vzorky DNA byly analyzovány v tripletech různými šaržemi CeliacStrip soupravy. Analýza byla prováděna stejnou osobou v jeden den a byly získány identické výsledky, nezávislé na šarži, což dokazuje vysokou spolehlivost provedení nezávisle na šarži.

ZMĚNY OPROTÍ PŘEDCHOZÍ VERZI TOHOTO DOKUMENTU

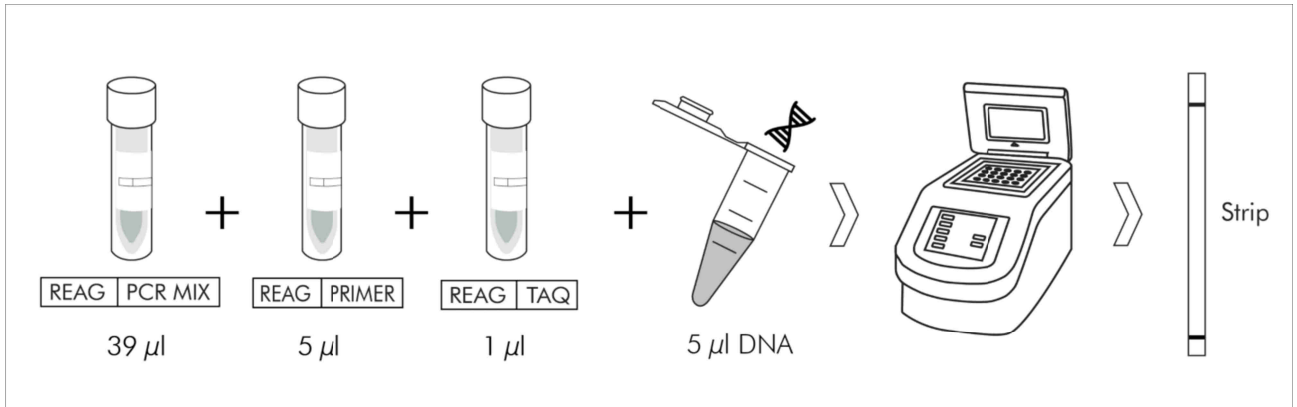
Nebyly provedeny žádné změny, které by ovlivnily provozní parametry výrobku. Struktura obecných informací uvedených na začátku pokynů byla vylepšena rozdělením jednotlivých bodů tak, aby byly v souladu s požadavky nařízení IVDR. Interpretace výsledků je uvedena do souladu s nejnovějšími publikovanými pokyny pro diagnostickou genetiku. Viz vysvětlení uvedené v návodu k použití výrobku. Dokument

LITERATURA

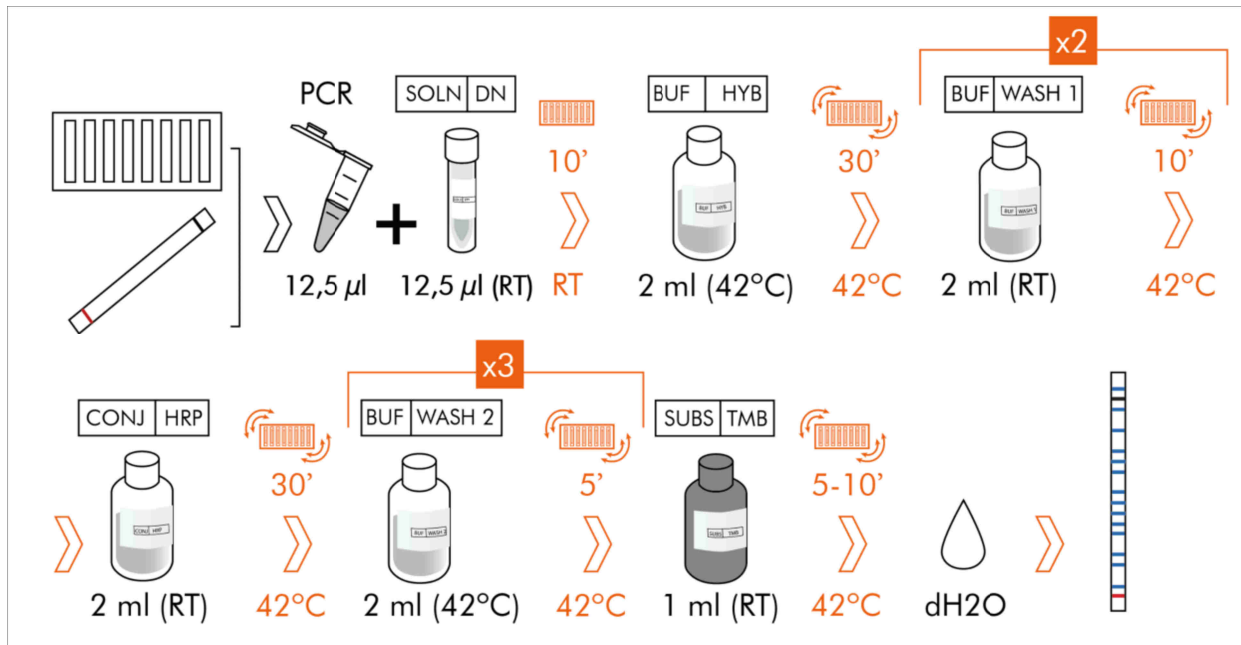
1. Petronzelly F. et al. "Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease". *Ann Hum Genet* (1997); 61:307-317.
2. Louka A.S. et al. "HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder". *Tissue Antigens* (2003); 61: 105-117.
3. Louka A.S. et al. "A collaborative European search for non-DQA1*05-DQB1*02 celiac disease loci on HLA-DR3 haplotypes: Analysis of transmission from homozygous parents". *Hum Immunol* (2003); 64: 350-358.
4. Kipatány A. et al. "Diagnostic significance of HA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone". *Aliment Pharmacol Ther* (2006); 24 (9): 1395-1402.
5. Murray J. et al. "HLA DQ gene dosage effect and risk and severity of celiac disease". *Clin Gastroenterol Hepatol* (2007); 5 (12): 1406-1412.
6. Ferrer A et al. "Overview on HLA and DNA typing methods". *Biotechnología aplicada* (2005); 22: 91-101.
7. Martínez-Ojinaga E et al. "HLA-DQ distribution and risk assessment of celiac disease in a Spanish center". *Rev Esp Enfermedades Dig* (2018); 110(7):421-6.
8. J.A. Tye Din et al. "Appropriate clinical use of human leukocyte antigen typing for coeliac disease: an Australasian perspective". *Int Med J* (2015). Vol 45: 441-450. Doi: 10.1111/imj.12716.

PŘÍLOHA

Diagram přípravy PCR.



Vývoj stripu





Expirace



Šarže



Pro *in vitro* diagnostiku



Tento výrobek splňuje požadavky směrnice 98/79/ES



Katalogové číslo



Čtěte prosím příbalový leták



Výrobce



Určeno pro <n> vyšetření



Skladujte při



Opatrnost



Žíravina

Tento dokument je k dispozici také na našich webových stránkách.

www.operondx.com



DO-09051008 Rev.9 – 12-06-2023

OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – SPAIN

34 976 503597