



Genvinset[®]

Lactose Intolerance

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro detekci polymorfizmů
C13910T a G22018A v genu MCM6*

Pro in vitro diagnostické užití

Rev. 04 / 2022-06-13



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



www.bdrdiagnostics.com



Kódy výrobku:

GVS-LAC-24

GVS-LAC-48

UDI-DI

8437016942529

8437016942536

Skladování:

od -30°C do -18°C

Genvinset[®]

Lactose Intolerance

Obsah

1 - <i>Bezpečnostní informace</i>	3
2 - <i>Použití</i>	3
3 - <i>Souhrn a vysvětlení</i>	3
4 - <i>Principy testu</i>	4
5 - <i>Obsah soupravy</i>	5
6 - <i>Skladování soupravy</i>	6
7 - <i>Materiál potřebný, který není součástí soupravy</i>	6
8 - <i>Odběr a příprava vzorku</i>	7
9 - <i>Postup</i>	7
10 - <i>Výsledky a interpretace</i>	8
11 - <i>Kontrola kvality</i>	10
12 - <i>Specifické provedení</i>	12
13 - <i>Omezení postupu</i>	13
14 - <i>Průvodce problémy</i>	14
15 - <i>Odkazy</i>	15
16 - <i>Upozornění pro zákazníka</i>	15
17 - <i>Kontrola změn</i>	16
18 - <i>Vysvětlení použitých symbolů na obalech</i>	17

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.

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

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

2 - Použití

Genvinset® Lactose Intolerance je poloautomatická in vitro diagnostická souprava pro kvalitativní detekci polymorfismů -13910 C/T (NCBI dbSNP rs4988235; NM_005915.6: c.1917) a -13910 C/T. +326C>T) a -22018 G/A (NCBI dbSNP rs182549; NM_005915.5: c.1362+117G>A) genu MCM6 (OMIM: 601806) spojeného s perzistencí laktázy v genomové DNA extrahované z plné krve pomocí Real Time PCR s použitím specifické technologie sond TaqMan®.

Pacienti, kteří mohou mít z tohoto stanovení prospěch, jsou pacienti odeslaní specialistou. Výsledky tohoto testu by neměly být jediné, 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 - Souhrn a vysvětlení

Laktóza je disacharid, který se nachází v mléce savců a je hydrolyzován ve střevě enzymem laktázy (také známý jako laktáza-florizin hydrolázový enzym nebo LPH), čímž se získají dva vstřebatelné monosacharidy, glukóza a galaktóza. U většiny dětí je aktivita laktázy na vrcholu během perinatálního období a je nezbytná pro výživu při kojení, ale po několika měsících se její aktivita postupně snižuje na téměř nezjistitelnou hladinu v důsledku přirozené regulace snižování exprese laktázy (primární hypolaktázie) ¹.

Nicméně u některých lidí se udrží aktivita laktázy do dospělosti. Tudiž po 2-12 letech je možné najít skupinu „laktázové neperzistence“ s nízkou laktázovou aktivitou a skupinu „laktázové perzistence“, u které přetrvává schopnost trávit mléko^{2,3}. Frekvence výskytu této perzistence se velmi liší v závislosti na regionu: je vysoká v severoevropských populacích (> 90% ve Švédsku a Dánsku), zatímco směrem na jih Evropy a Středního východu postupně klesá (asi 50% ve Francii, Španělsku a některých arabských populacích), a je velmi nízký v asijských a afrických populacích, i když se běžně vyskytuje u pastevců (přibližně 1% v Číně, 5-20% ve východní Africe)⁴.

Nízká aktivita laktázy v dospělosti vede ke špatnému trávení laktózy, což se projevuje příznaky, jako jsou bolesti břicha a nadýmání, plynatost a průjem¹. Mnoho lidí s nepersistencí laktázy však může tolerovat malé množství laktózy bez příznaků a toleranci lze získat adaptací střevní flóry při pravidelném příjmu laktózy (ačkoli exprese laktázy se nemění)⁵. Proto se u všech pacientů s nedostatkem laktázy nevyvine intolerance laktózy.

Gen pro laktázu (LCT) se nachází na dlouhém raménku 2. chromozomu. S perzistencí laktázy jsou spojeny dva jedno-nukleotidové polymorfismy před LCT:

- **LCT-13910 C/T** se nachází v intronu 13 genu pro udržování minichromozomů typu 6 (MCM6). Dědí se autozomálně dominantně, přičemž pro fenotyp perzistence laktázy stačí jedna alela. Obecně se uznává, že genotypizace polymorfismu -13910 C/T přesně koreluje s perzistencí laktázy v evropských populacích (kde pozitivně koreluje v ~86-98 % případů), a proto by měla být využívána při diagnostice primární hypolaktázie^{6,7}. Tento polymorfismus však není dobrým ukazatelem perzistence laktázy u neevropských obyvatel, protože pastevecké populace Afriky a Asie, ačkoli vykazují vysokou prevalenci perzistence laktázy, vykazují nízkou frekvenci alely -13910T⁸.
- **LCT-22018 G/A** se nachází v intronu 9 MCM6. Tento polymorfismus je lepším indikátorem perzistence laktózy. V severní Číně a v japonské brazilské populaci^{9,10} a ve většině případů se vyskytuje ve spojení s -13910 C/T, až na výjimky^{2,9}.

Polymorfismy spojené s perzistencí laktázy jsou dominantní a aktivita laktázy zůstává zachována s jedinou alelou perzistující laktázy¹¹. Byly však zaznamenány některé minoritní případy pacientů heterozygotních pro polymorfismus -22018 G/A, kteří vykazují nepersistenci laktázy¹²⁻¹⁴.

Polymorphism	Genotype and phenotype		
	-13910 C/T	Lactase persistence	
T/T		C/T	C/C
-22018 G/A	Lactase persistence	Mainly associated with lactase persistence ¹²	Lactase non-persistence (Lactose intolerant)
	A/A	G/A	G/G

4 - Princip metody

Test je založen na metodě PCR v reálném čase a sondách TaqMan®. Každý vzorek se analyzuje ve dvou reakcích prováděných ve dvou různých jamkách (reakce C13910T a reakce G22018A). V každé reakci se analyzují následující polymorfismy:

Reaction	Polymorphism	FAM channel	HEX channel
C13910T	-13910 C/T (rs4988235)	Allele T	Allele C
G22018A	-22018 G/A (rs182549)	Allele A	Allele G

V reakci C13910T se každý vzorek analýzy používá:

- Pár primerů pro amplifikaci fragmentu genu MCM6, kde se nachází polymorfismus -13910 C/T.
- Hydrolýzní sonda specifická pro alelu divokého typu (C v rs4988235) značená na 5' konci fluoroforem HEX a hydrolýzní sonda specifická pro mutantní alelu (T v rs4988235) značená na 5' konci fluoroforem FAM.

V reakci G22018A se každý vzorek analýzy používá:

- Pár primerů pro amplifikaci fragmentu genu MCM6, kde se nachází polymorfismus -22018 G/A.
- Hydrolýzní sonda specifická pro alelu divokého typu (G u rs182549) značená na 5' konci fluoroforem HEX a hydrolýzní sonda specifická pro mutantní alelu (A u rs182549) značená na 5' konci fluoroforem FAM.

Všechny sondy jsou na 3' konci označeny zhášecem (quencher), který potlačuje fluorescenci fluoroforů, když je sonda neporušená.

Jak PCR reakce postupuje, štěpí 5'3'exonukleázová aktivita Taq polymerázy sondy připojené k jejich komplementární sekvenci, čímž se oddělí fluorofor od zhášече (quencheru) a vzniká fluorescenční signál (v reálném čase), který je úměrný množství vzniklého produktu PCR a sleduje se v přístroji pro PCR v reálném čase. Tudíž:

- V případě homozygotních vzorků divokého typu (wt) pro analyzované změny (-13910 C/C nebo -22018 G/G) se sonda specifická pro wt alelu značená HEX naváže na komplementární sekvenci amplifikovaného genu a je pozorována:
 - fluorescenční signál v kanálu HEX (λ_{\max} 556 nm) a
 - žádný nebo slabý signál v kanálu FAM (λ_{\max} 518 nm).
- V případě homozygotních mutantních (mut) vzorků pro analyzované změny (-13910 T/T nebo -22018 A/A) se sonda specifická pro mutovanou alelu značená FAM váže na svou amplifikovanou komplementární sekvenci. V tomto případě se detekuje následující:
 - fluorescenční signál v kanálu FAM a
 - žádný signál nebo slabý signál v kanálu HEX.
- V případě heterozygotních vzorků pro analyzovanou změnu (-13910 C/T nebo -22018 G/A) se obě sondy vážou na amplifikované sekvence DNA a generují:
 - signál v kanálu FAM a
 - signál v kanálu HEX.

5 - Obsah soupravy

→ Reference: GVS-LAC-24 (24 tests)

- GVS-CT139-PM: 1 lahvička x 96 μ L Primer Mix C13910T (PM) -Modrý uzávěr
- GVS-CT139-MM: 1 lahvička x 120 μ L Master Mix C13910T (MM) -Červený uzávěr
- GVS-GA220-PM: 1 lahvička x 96 μ L Primer Mix G22018A (PM) -Modrý uzávěr
- GVS-GA220-MM: 1 lahvička x 120 μ L Master Mix G22018A (MM) -Červený uzávěr

- GVS-LAC-C1: 1 lahvička x 15 µL Control WT (C1). -Zelený uzávěr
- GVS-LAC-C2: 1 lahvička x 15 µL Control MUT (C2). -Zelený uzávěr
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µL Reaction Blank (RB) -Přírodní uzávěr

→ Reference: GVS-LAC-48 (48 tests)

- GVS-CT139-PM: 2 lahvičky x 96 µL Primer Mix C13910T (PM) -Modrý uzávěr
- GVS-CT139-MM: 2 lahvičky x 120 µL Master Mix C13910T (MM) -Červený uzávěr
- GVS-GA220-PM: 2 lahvičky x 96 µL Primer Mix G22018A (PM) -Modrý uzávěr
- GVS-GA220-MM: 2 lahvičky x 120 µL Master Mix G22018A (MM) -Červený uzávěr
- GVS-LAC-C1: 1 lahvička x 15 µL Control WT (C1). -Zelený uzávěr
- GVS-LAC-C2: 1 lahvička x 15 µL Control MUT (C2). -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 -18 až-30 °C. Při této teplotě jsou reagentie 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 provádí běhy s méně vzorky, doporučuje se reagentie alikvotovat a tak zredukovat zmrazovací / rozmrazovací cykly

Z důvodů fotosenzitivity reagentií, zabraňte stálé expozici světlu.

7 - Materiál potřebný, který není součástí soupravy

Obecně

- Rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební materiál

- Filtrační špičky (P1000, P200, P20)
- 1,5 ml autoklávované zkumavky
- RT-PCR reagentie specifické pro přístroj
- (např. když pro Rotor Gene-Q lze použít pouze 0,1 ml zkumavky)

Vybavení

- Vortex-mixer
- Centrifuga
- Pipety (P200, P100 & P10)
- Real-time PCR přístroj s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Následující přístroje byly validovány:
 - StepOne™, 7500 Real-Time PCR System, and QuantStudio™ 5 Dx Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems™
 - LightCycler® 96 System, Roche
 - CFX96, BioRad
 - DT Lite Real-Time PCR System, DNA-Technology

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. Heparin může interferovat s procesem PCR a je třeba se mu vyhnout.

Tato technika je kompatibilní s několika metodami extrakce DNA. Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měl být proveden validační test s takovou extrakční metodou.



POZOR !

Všechny biologické a krevní vzorky musí být považovány za potenciálně infekční. Při manipulaci s nimi dodržujte odpovídající základní a univerzální opatření.

9 - Pracovní postup

→ Příprava PCR



POZOR !

- Definujte pracovní prostory pre- a post- PCR, které by měly být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Připravte PCR v oblasti pre-PCR. Používejte laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Pracujte na ledu nebo nad chladicím blokem. Minimalizujte dobu mezi přípravou a zahájením testu.
- Pro každý test se doporučuje testovat v obou reakcích (C13910T a G22108A) kontrolu kontaminace (slepá reakce) a obě kontroly WT (C1) a kontrolu MUT (C2), které jsou součástí soupravy.

1. Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Injekční lahvičky se směsí primerů silně promíchejte a injekční lahvičky s master směsí pečlivě promíchejte. Krátce odstředte, abyste zachytili objem na dně zkumavek.
2. Pro každou reakci (C13910T a G22018A) připravte reakční směs pro n+1 vzorků s použitím množství uvedených v následující tabulce:

	C13910T reakce Obj. na vzorek (µL)	G22018A reakce Obj. na vzorek (µL)
Primer Mix	4	4
Master Mix	5	5

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

3. Pipetujte 9 µl každé směsi do destiček/zkumavek PCR.
4. Do každé jamky přidejte 1 µl DNA, slepé reakce, kontroly WT nebo kontroly MUT. Protože se jedná o dvě reakce, použijí se dvě jamky pro každý vzorek.
5. Uzavřete destičky/zkumavky pomocí příslušného těsnění a krátce odstředte, abyste odstranili případné bubliny. Ujistěte se, že se veškerý objem usadil na dně jamky.
6. Umístěte destičku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak

je popsáno v následující části.

→ Konfigurace termo-cykleru

1. Nastavte následující čtecí kanály:
 - - FAM kanál pro detekci sondy MUT
 - - HEX/VIC kanál pro detekci sondy WT.
2. Nastavte následující amplifikační program a spusťte běh:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Anylýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly		95	00:15	X
	40	60	01:00	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 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 neznámá neplatnost testu.

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

POZOR !

následujícím způsobem:

Zvolte lineární zobrazení stupnice 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 získanou u negativních vzorků pro alelu detekovanou v tomto kanálu.

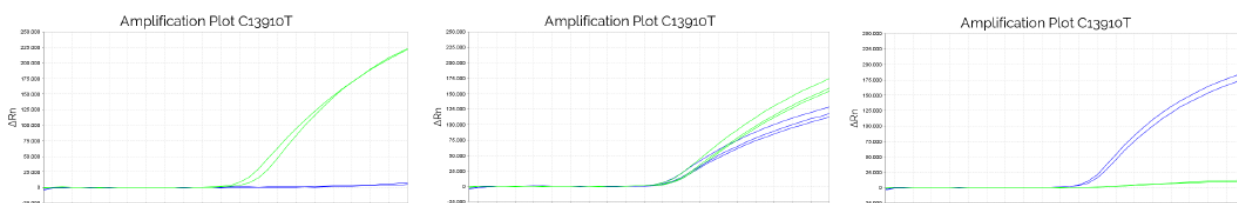
→ Interpretace výsledků

Výsledky získané pomocí této soupravy lze interpretovat vizualizací amplifikačních křivek v kanálech FAM a HEX nebo pomocí grafu rozptylu hodnot intenzity koncového bodu kanálů FAM a HEX.

Amplifikační křivka

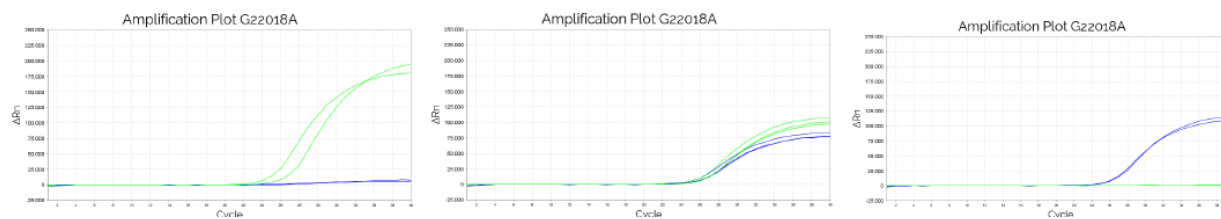
Zvolte "lineární stupnici" a pozorujte nepřítomnost/přítomnost sigmoidních amplifikačních křivek v každém kanálu.

Reakce C13910T



Amplifikační křivky pro homozygotní wt (-13910 C/C) (vlevo), heterozygotní (-13910 C/T) (uprostřed) a homozygotní mut (-13910 T/T) (vpravo) vzorky. Kanál FAM (modrá čára), kanál HEX (zelená čára)

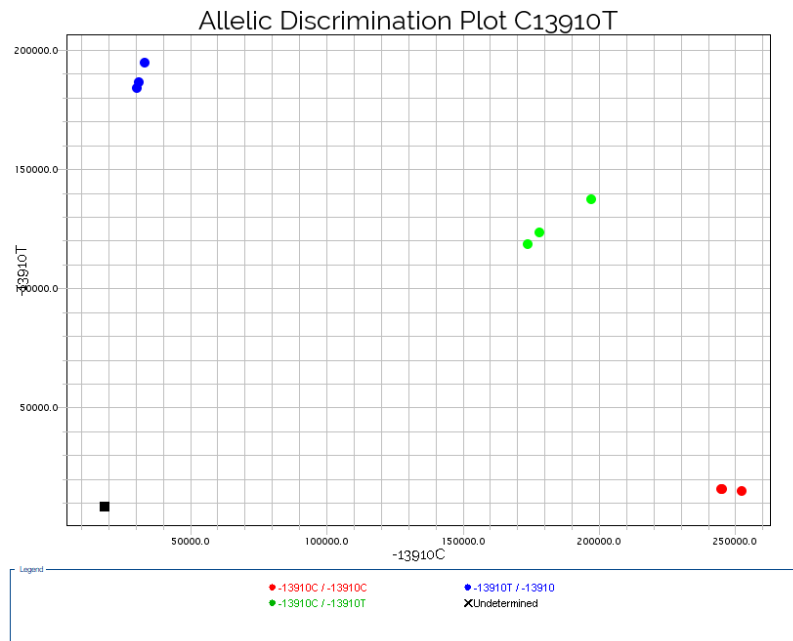
Reakce G22018A



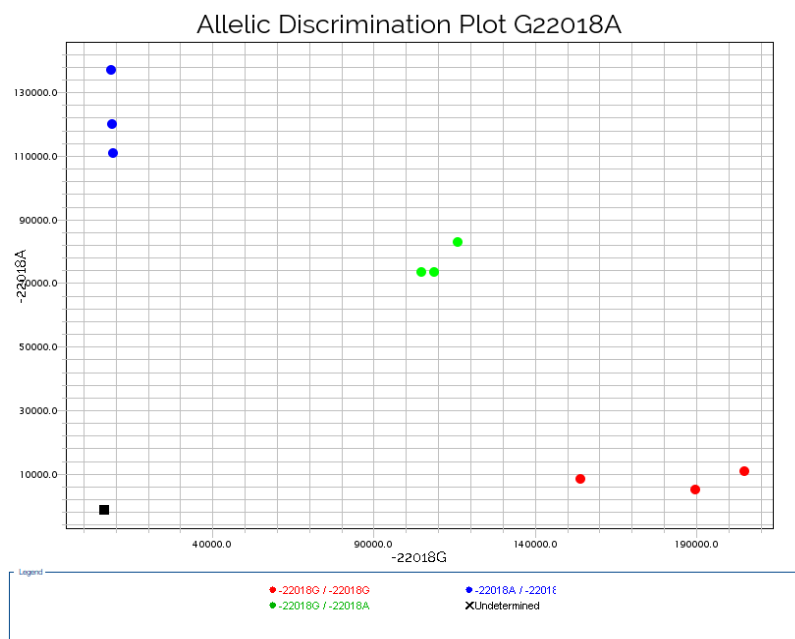
Amplifikační křivky pro homozygotní wt (-22018 G/G) (vlevo), heterozygotní (-22018 G/A) (uprostřed) a homozygotní mut (-22018 A/A) (vpravo) vzorky. Kanál FAM (modrá čára), kanál HEX (zelená čára).

Graf rozptylu

Mnoho softwarových programů pro PCR v reálném čase umožňuje automaticky vykreslit graf intenzity fluorescence jednoho kanálu oproti druhému (alelická diskriminace/genotypizace). V tomto typu znázornění odpovídají datové body umístěné v blízkosti os X a Y homozygotním genotypům pro alelu detekovanou fluoroforem znázorněným na příslušné ose. Body umístěné přibližně uprostřed osy odpovídají heterozygotním genotypům a negativní kontrola (Reaction Blank) by se měla objevit vlevo dole, blízko počátku.



Graf znázorňující heterozygotní (zelené body), homozygotní mutované (modré body) a homozygotní wt (červené body) vzorky pro polymorfismus -13910 C/T a prázdnou reakci (černý čtverec) s použitím soupravy Genvinset® Lactose Intolerance Reaction C13910T.



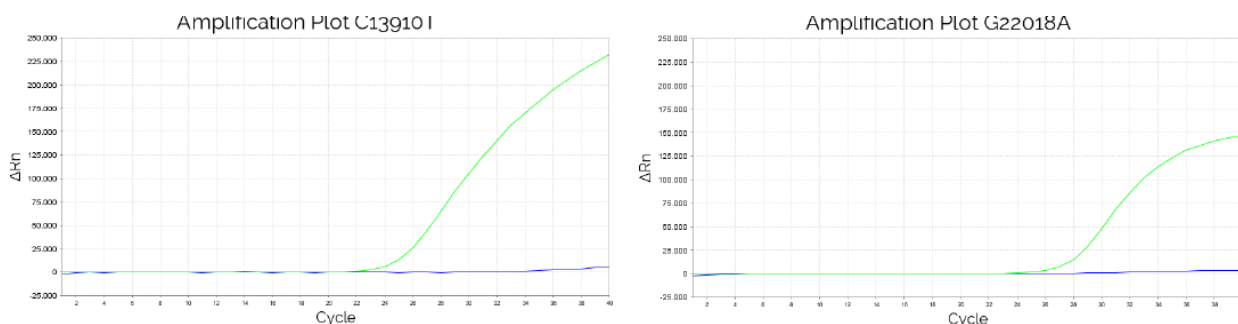
Graf zobrazující heterozygotní (zelené body), homozygotní mutované (modré body) a homozygotní wt (červené body) vzorky pro polymorfismus -22018 G/A a slepou reakci (černý čtverec) s použitím soupravy Genvinset® Lactose Intolerance Reaction G22018A.

11 - Kontrola kvality

Souprava obsahuje Reagneční blank, kontrolu WT (C1) a kontrolu MUT (C2), které musí být testovány v obou reakcích C13910T a G22018A v každém běhu. Odpovídající chování těchto kontrolních vzorků je zárukou správného provedení reakce.

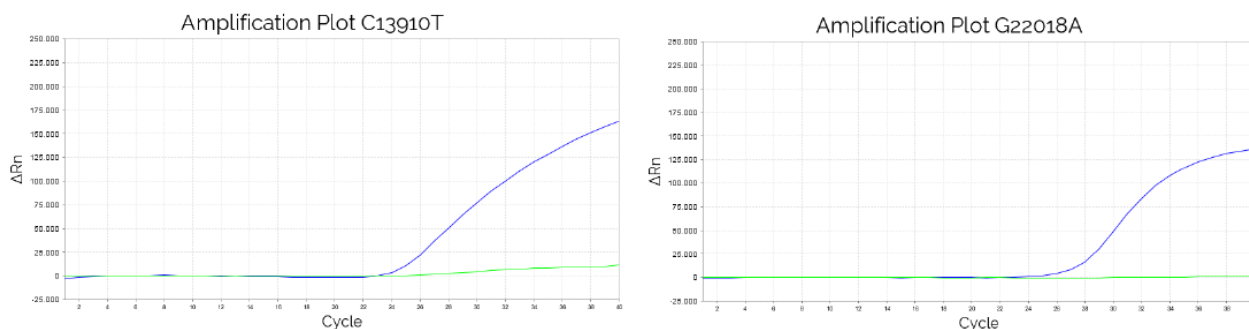
Výsledky se považují za platné, pokud se u kontrolních vzorků získá následující amplifikační vzorec:

Kontrolní WT (C1)



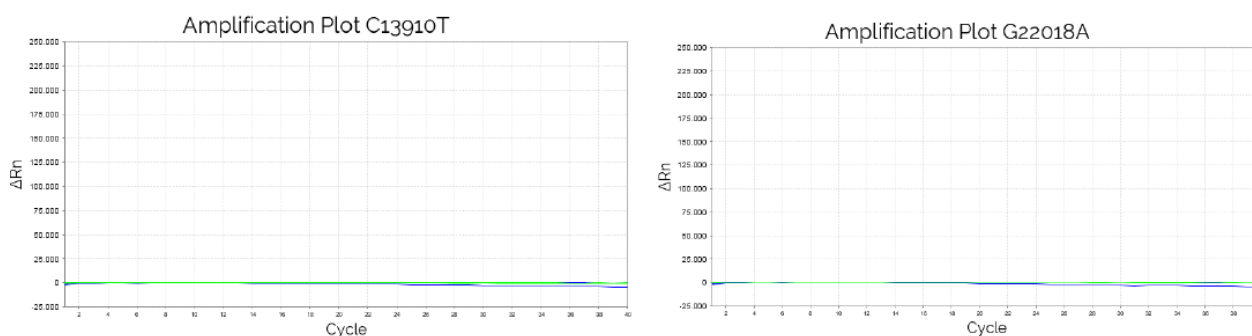
Žádný signál nebo signál s nízkou intenzitou v kanálu FAM (modrá čára) a sigmoidní signál s $Ct < 35$ v kanálu HEX.

Kontrolní MUT (C2)



Zesílení signálu s $Ct < 35$ v kanálu FAM (modrá čára) a žádný signál nebo signál s nízkou intenzitou v kanálu HEX (zelená čára).

Slepá reakce



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

Výsledky se považují za neplatné a měly by se opakovat, pokud:

- v kanálech FAM a/nebo HEX v Reaction Blank je pozorována amplifikační křivka s $Ct < 35$.
- Je pozorován neexponenciální amplifikační signál nebo se objeví amplifikační signál s $Ct > 35$ v jamkách Control WT nebo Control MUT.

Pokud je v pozitivních kontrolních reakcích pozorováno odpovídající chování, pokračujte v interpretaci ostatních vzorků, jak je uvedeno v předchozím oddíle.

12 - Specifická operační data

→ Analytická specifická

Zkřížená reaktivita byla naměřena v nezávislých validačních studiích soupravy Genvinset® Lactose Intolerance, které jsou popsány níže.

Kromě toho bylo in silico ověřeno navázání (alignment) primerů a sond. Navazování sekvencí primerů je specifické. Sondy se vážou specificky na pozice -13910 C/T (NCBI dbSNP rs4988235; NM_005915.6: c.1917+326C>T) a -22018 G/A (NCBI dbSNP rs182549; NM_005915.5: c.1362+117G>A) v genu MCM6 (OMIM: 601806). Nebyly zaznamenány žádné projevy zkřížené reakce s genomovou DNA.

Interference byla studována pomocí bibliografické rešerše. Heparin může inhibovat aktivitu Taq polymerázy a soutěžit s cílovou nukleovou kyselinou, proto musí být odebraná krev ošetřena jinými antikoagulanty, jak je uvedeno v oddíle "Odběr a příprava vzorku". Některé látky v krvi jsou známy jako inhibitory PCR: hemoglobin, hemin, bilirubin, žlučové soli, laktoferin a imunoglobulin G. Polymeráza obsažená v přípravku Genvinset® Lactose Intolerance prokázala vysokou odolnost vůči inhibici a složení Master Mixu je navrženo tak, aby nebyla ovlivněna interferujícími látkami. Nicméně potenciálně inhibiční látky musí být odstraněny během extrakce DNA a purifikačního protokolu. Před poskytnutím výsledků za diagnostickým účelem by měl být proveden validační test pro takovou extrakční metodu.

→ Analytická senzitivita

Test byl proveden s použitím sériových ředění 1:4 tří vzorků DNA, homozygotního divokého typu (-13910 C/C a -22018 G/G), heterozygotního (-13910 C/T a -22018 G/A) a homozygotního mutantu (-13910 T/T a -22018 A/A) pro polymorfismus C13910T i G22018A. Vzorky DNA byly získány pomocí konvenčního automatického extrakčního systému (QIASymphony, Qiagen) v koncentraci 76,9, 93,8 a 100,00 ng/μl. Z hlediska analytické citlivosti při detekci alel divokého typu a mutantů byly získány následující údaje.

- Mez detekce divokého typu a mutantních alel = 1,5 ng/μl (Ct<35)

→ Diagnostická senzitivita a specifická

Bylo analyzováno 151 vzorků DNA získaných z několika laboratoří. Předtím byly genotypizovány jinou soupravou. Byly získány následující výsledky:

Genvinset® Lactose Intolerance									
		C13910T					G22018A		
		Genotype C13910T	C/C	C/T	T/T	Genotype G22018A	G/G	G/A	A/A
Previous method	C/C	51	0	0	Previous method	G/G	48	0	0
	C/T	0	68	0		G/A	0	73	0
	T/T	0	0	32		A/A	0	0	30

Výsledky získané pomocí Genvinset® Lactose Intolerance se 100% shodují s výsledky genotypizace, které byly dříve získány pomocí jiné komerční soupravy.

→ Přesnost

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

Genvinset® Lactose Intolerance vykázal 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožnila odhadnout variabilitu mezi jednotlivými sériemi, šaržemi a operátory. Použité vzorky reprezentují celý rozsah očekávaných analytů, které lze pomocí Genvinset® Lactose Intolerance měřit, tj. homozygotní divoký typ, homozygotní mutant a heterozygot pro oba polymorfismy C13910T a G22018A. Tři operátoři provedli test ve třech různých sériích a testovali tři různé šarže činidel.

Genvinset® Lactose Intolerance vykazoval 100% reprodukovatelnost.

→ Pravdivost

Správnost analytického postupu Genvinset® Lactose Intolerance byla posouzena porovnáním s referenční metodou. Studie byla vypracována jako interní validace činidla, v níž byla prokázána pravdivost se 100% hodnotou. Viz část "Diagnostická citlivost a specifita".

13 - Omezení metody

- Metoda detekuje polymorfismy -13910 C/T (rs4988235) a -22018 G/A (rs182549) v genu MCM6.
- Jsou možné mutace nebo polymorfismy v místech nasedání primerů/sond, což může vést k nedostatečnému vymezení 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.
- Termocycler 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 intoleranci laktózy. 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 přidaných 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 pozitivních kontrolách)***

- Špatná kvalita použité DNA
 - Zkontrolujte poměr absorbance 260/280 a vyřadte nekvalitní vzorky. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů (heparin, hemoglobin, hemin, bilirubin, žlučové soli, laktoferin, imunoglobulin G). Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA
- Nedostatečná koncentrace DNA.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
- 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 směsí primerů/master mixu/reakčního slepého vzorku.
 - Opakujte test s čerstvými alikvoty.
- Prostor pro přípravu PCR je kontaminován.
 - Vyčistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a vyměňte spotřební materiál a reagentie. 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 zkušavek/plotýnek čistá. S destičkami/zkušavkami manipulujte v rukavicích.
- Objem není na dně jamky nebo se v něm vyskytují bublinky.
 - Před vložením do termocykléru destičky/zkušavky odstřed'te.
 - Zkontrolujte, zda se v nich nevyskytují bubliny. Pokud ano, odstraňte je.
- Destička/zkušavky nebyly řádně uzavřeny.
 - Zopakujte analýzu a zkontrolujte, zda byly destičky/zkušavky 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.

15 - Odkazy

- 1) Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N. & Fox, M. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients* **7**, 8020 (2015).
- 2) Troelsen, J. T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta* **1723**, 19–32 (2005).
- 3) Rasinperä, H. *et al.* Transcriptional downregulation of the lactase (LCT) gene during childhood. *Gut* **54**, 1660 (2005).
- 4) Sahi, T. Genetics and Epidemiology of Adult-type Hypolactasia. <http://dx.doi.org/10.3109/00365529409091740> **29**, 7–20 (2009).
- 5) Shaukat, A. *et al.* Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. *Ann Intern Med* **152**, 797–803 (2010).
- 6) Bodlaj, G. *et al.* Genotyping of the Lactase-Phlorizin Hydrolase –13910 Polymorphism by LightCycler PCR and Implications for the Diagnosis of Lactose Intolerance. *Clinical Chemistry* **52**, 148–151 (2006).
- 7) Mattar, R., do Socorro Monteiro, M., Villares, C. A., dos Santos, A. F. & Carrilho, F. J. Single nucleotide polymorphism C/T(-13910), located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: validation for clinical practice. *Clin Biochem* **41**, 628–630 (2008).
- 8) Mulcare, C. A. *et al.* The T Allele of a Single-Nucleotide Polymorphism 13.9 kb Upstream of the Lactase Gene (LCT) (C–13.9kbT) Does Not Predict or Cause the Lactase-Persistence Phenotype in Africans. *The American Journal of Human Genetics* **74**, 1102–1110 (2004).
- 9) Mattar, R., Monteiro, M. do S., da Silva, J. M. K. & Carrilho, F. J. LCT-22018G>A single nucleotide polymorphism is a better predictor of adult-type hypolactasia/lactase persistence in Japanese-Brazilians than LCT-13910C>T. *Clinics* **65**, 1399 (2010).
- 10) Xu, L. *et al.* The -22018A allele matches the lactase persistence phenotype in northern Chinese populations. <https://doi.org/10.3109/00365520903414176> **45**, 168–174 (2010).
- 11) Swallow, D. M. Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143820> **37**, 197–219 (2003).
- 12) Enattah, N. S. *et al.* Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genetics* **2002 30:2 30**, 233–237 (2002).
- 13) Orr, B., Kaczor, T. & Baker, J. Lactose Intolerance Testing. *Textbook of Natural Medicine* 182-186.e2 (2020)
- 14) Matthews, S. B., Waud, J. P. & Roberts, A. G. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* **81**, 167–173 (2005).

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.
- Genvinset® Intolerance laktózy 16
- 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 změny
Rev. 00	První verze
Rev. 01	Přidání CE značky a odstavce " Diagnostická senzitivita a specificita"
Rev. 02	Přidání přístroje CFX96 qPCR do seznamu validovaných přístrojů
Rev ,03	Grafická úprava odstavce "Výsledky"
Rev. 04	Oprava překlepů a překladatelských chyb. Přesnost a pravdivost, Informace pro bezpečnost. Byly přidány informace týkající se určeného uživatele, určeného pacienta a interferencí. Změna objemu injekčních lahvíček. Změna v názvu kontrolního WT a kontrolního MUT. Změny v seznamu validovaných real-time PCR cyklierů. Vložení UDI-DI kódů

18 - Vysvětlení symbolů použitých na štítcích



In vitro diagnostický prostředek



Datum expirace



Katalogové číslo



Obsah stačí pro <n> testů



Číslo šarže



Výrobce



Teplotní omezení



Chraňte před sluncem



Pozitivní kontrola



Prostudujte si elektronický návod k použití



Tento výrobek splňuje požadavky Evropské Direktivy 98/79/EC pro in vitro diagnostické zdravotnické prostředky