



Genvinset[®]

HLA Celiac Plus

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro detekci alel spojených
s celiakií*

Pro diagnostické použití in vitro

Rev.04 / 2022-10-20



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



www.bdrdiagnostics.com



Referenční číslo

GVS-DQP-24 (24 testů)

GVS-DQP-48 (48 testů)

UDI-DI.

8437016942505

8437016942512

Skladování

od -30 °C do -18 °C

Genvinset®

HLA Celiac Plus

Obsah

1- Informace pro bezpečnost.....	3
2 - Zamýšlené použití	3
3- Shrnutí a vysvětlení	3
4 – Princip metody	5
5- Obsah soupravy	6
6 – Skladování soupravy	6
7 - Potřebný materiál, který není v soupravě	7
8- Odběr a příprava vzorků	7
9- Pracovní postup	8
10- Výsledky	9
11- Kontrola kvality	12
12- Specifická operační data	13
13- Omezení postupu	15
14 - Průvodce řešením problémů	15
15- Odkazy	16
16- Oznámení zákazníkovi	17
17- Řízení změn	18
18- Vysvětlení symbolů použitých na etiketách	18

1- Informace pro bezpečnost

Přečtěte si prosím celý tento návod k použití a dodržujte je při používání aktuální IVD sady.

Soupravu diagnostických zdravotnických prostředků *in vitro* je určena pro použití odborníky se zkušenostmi s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

Poradte se s výrobcem, pokud existují pochybnosti týkající se popisu testovací metody.

Kontaktujte telefonicky +34 976 094 603 nebo e-mailovou adresou

customersupport@bdrdiagnostics.com.

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

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

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

Zajistěte, aby se s odpadem nakládalo v souladu s místními předpisy. Nesprávným nakládáním s odpady může dojít ke kontaminaci životního prostředí.

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

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

2 - Zamýšlené použití

Genvinset® HLA Celiac Plus je poloautomatizovaná *in vitro* diagnostická souprava pro kvalitativní detekci alel HLA-DQB1*02, DQB1*03:02, DQA1*05 a DQA1*03 v genomové DNA extrahované z plné krve a následné stanovení antigenů DQ2 a DQ8 spojených s celiakií. Kit je schopen určit stav homozygotnosti nebo heterozygotnosti pro alely DQB1*02. Analýza je založena na technologii Real-Time PCR s využitím sond TaqMan®.

Pacienti, kteří mohou mít prospěch z tohoto stanovení, jsou ti, kteří jsou doporučeni odborníkem. Výsledky tohoto testu by neměly být jediné, na kterých je založeno terapeutické rozhodnutí a měly by být použity jako pomůcka při diagnostice spolu s výsledky dalších markerů onemocnění.

Předpokládaným uživatelem soupravy je technický personál vyškolený k provádění pracovního postupu a interpretaci výsledků popsaných v tomto dokumentu.

3- Shrnutí a vysvětlení

Celiakie (CeD) je imunitně zprostředkovaná enteropatie vyvolaná požitím lepku u geneticky predisponovaných jedinců¹.

CeD je jedním z nejčastějších onemocnění v kavkazské populaci, s prevalencí mezi 1:100 a 1:500 v Evropě a severní Americe², a postihuje všechny věkové skupiny, včetně starších osob.

Zatímco CeD je běžná po celém světě a její prevalence v mnoha populacích stoupá, v klinické praxi³ často není zjištěna. V současné době je jedinou léčbou celiakie celoživotní, přísná bezlepková dieta vedoucí ke zlepšení kvality života, zmírnění příznaků a prevenci výskytu refrakterní celiakie, ulcerózní jejunoileitidy a adenokarcinomu tenkého střeva a lymfomu⁴.

Zatímco faktory prostředí jsou důležité pro vývoj CeD, pozoruhodným rysem onemocnění je jeho vysoká dědičnost a silná asociace se dvěma sadami HLA alel⁵: DQA1*05-DQB1*02 a DQA1*03-DQB1*03:02, které kódují MHC DQ2 a DQ8 molekuly třídy II, resp. ^{6,7,8}. Výskyt CeD v nepřítomnosti těchto rizikových faktorů DQ je extrémně vzácný. Přítomnost těchto molekul nepředpovídá vývoj CeD, protože jsou přítomny u 25 až 50% obecné populace, takže drtivá většina těchto jedinců nikdy nevyvine onemocnění⁹.

90% pacientů kavkazské populace s CeD má HLA-DQ2.5 haplotyp (kódovaný alelami DQA1*05:01 a DQB1*02:01) buď v cis (častější ve střední a severní Evropě) nebo trans (častější ve středomořských zemích). HLA-DQB1*02:01 je vysoce spojena se zvýšeným rizikem onemocnění; protože pacienti nesoucí dvě kopie HLA-DQB1*02:01 vykazují pětinasobné riziko rozvoje onemocnění ve srovnání s heterozygoty. Dávka DQA1*05:01 se zdá být méně úzce spojena s rozvojem celiakie¹⁰.

Zbytek pacientů (5-10%) obvykle buď nese druhý heterodimer, HLA-DQ8 (nejběžnější u jihoamerických indiánských pacientů), kódovaný alelami DQA1*03:01 a DQB1*03:02, nebo nese některou z alel kódujících HLA-DQ2 heterodimer samostatně (DQA1*05 nebo DQB1*02)¹¹.

Následující tabulka ukazuje HLA haplotypy, které tvoří antigeny HLA-DQ2 a HLA-DQ8: alely DQB1 a DQA1 kódující α a β řetězce HLA antigenu a přidružená alela DRB1 jsou zobrazeny^{7,8}.

HLA-DQ	Sérologický ekvivalent	Genotyp						Frekvence u pacientů s celiakií
		Haplotyp 1			Haplotyp 2			
		DQB1*	DQA1*	DRB1*	DQB1*	DQA1*	DRB1*	
DQ2	DQ2.5 cis heterozygot	02:01	05:01	03	-	-	-	Více než 90% pacientů s celiakií
	DQ2.5 cis homozygot	02:01	05:01	03	02:01	05:01	03	
	DQ2.5 cis + DQ2.2	02:01	05:01	03	02:02	02:01	07	
	DQ2.5 trans	03:01	05:05	(11)	02:02	02:01	07	
	DQX.5	03:01	05:05	(11)	-	-	-	
	DQ2.2	02:02	02:01	07	-	-	-	
DQ8	DQ8	03:02	03:01	(0,4)	-	-	-	2-10% pacientů

Méně než 1% pacientů s CD postrádá tyto HLA haplotypy¹¹, takže jejich absence může pomoci v klinickém prostředí vyloučit diagnózu onemocnění. Nicméně více než 70 kandidátních genů ve více než 40 non-HLA lokusech se podílelo na dědičnosti CeD^{12,13,14,15}. Význam těchto dodatečných genů při vyvozování genetického rizika pro CeD je spíše omezený, ale mohou vést k objevu klíčových cest potenciálně zapojených do patogeneze onemocnění⁴.

HLA molekulární typizace pro CeD je tedy genetickým testem s vysokou negativní prediktivní hodnotou. Navíc se jedná o důležitý nástroj schopný rozlišovat jedince geneticky náchylné k CeD, zejména v rizikových skupinách, jako jsou příbuzní prvního stupně (rodiče, sourozenci a potomci) pacientů a v přítomnosti autoimunitních onemocnění (diabetes 1. typu, tyreoiditida, roztroušená skleróza) nebo specifických genetických poruch (Downův, Turnerův nebo Williamsův syndrom)¹⁶.

4 – Princip metody

Test je založen na metodě real-time PCR se sondami TaqMan®. Každý vzorek je analyzován ve 4 reakcích. Následující alely/geny jsou analyzovány v každé reakci:

Reakce	HLA detekované alely	Kontrolní gen
1	DQB1*02 a NE DQB1*02	N/A
2	DQA1*05	<i>HBB</i> (β-globin, IPC)
3	DQB1*03:02	<i>HBB</i> (β-globin, IPC)
4	DQA1*03	<i>HBB</i> (β-globin, IPC)

V reakci **1** jsou vzorky analyzovány pomocí:

- páru primerů pro amplifikaci alel HLA-DQB1.
- hydrolyzační sondy specifické pro alely HLA-DQB1*02 označené na 5' konci FAM fluoroforem a hydrolyzační sondy specifické pro alely odlišné od HLA-DQB1*02 (non-HLA-DQB1*02) označené na 5' konci HEX fluoroforem. Tato reakce umožňuje stanovení zygosity alel HLA-DQB1*02.

V reakcích **2, 3 a 4** jsou vzorky analyzovány pomocí:

- páru primerů pro amplifikaci alel HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*03:02 a HLA-DQA1*03 v reakcích 2, 3 a 4 a páru primerů pro amplifikaci genu β-globinu (*HBB*), který slouží jako vnitřní pozitivní kontrola (IPC).
- hydrolyzační sondy specifické pro analyzované HLA alely (HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*03:02 a DQA1*03, pro reakce 2, 3 a 4) značené na 5' konci FAM fluoroforem a hydrolyzační sondy specifické pro IPC značené na 5' konci HEX fluoroforem.

Všechny sondy jsou označeny na 3' konci zhasědlem (quencher), který inhibuje fluorescenční emise, když je sonda neporušená.

Jak PCR reakce pokračuje, aktivita 5'→3' exonukleázy Taq polymerázy štěpí sondy připojené k jejich komplementární sekvenci, odděluje fluorofor od zhasědla a vytváří fluorescenční signál (real-time), který je úměrný množství produktu PCR generovaného a monitorovaného v real-time PCR. Tedy:

V reakci **1**:

- V případě homozygotních vzorků pro alely HLA-DQB1*02 se specifická FAM značená sonda váže na svou komplementární sekvenci DNA a je pozorováno následující:
 - Fluorescenční signál v kanálu FAM (λ_{\max} 518 nm) a
 - Žádný signál nebo slabý signál v HEX kanálu (λ_{\max} 556 nm).
- V případě heterozygotních vzorků pro alely HLA-DQB1*02 (jedna kopie alely HLA-DQB1*02) se FAM i HEX sondy musí vázat na své komplementární sekvence DNA generující:
 - Signál FAM kanálu a
 - Signál v HEX kanálu.
- V případě HLA-DQB1*02 negativních vzorků (bez kopie alely HLA-DQB1*02 se specifická HEX-značená sonda váže na svou komplementární sekvenci DNA a je pozorováno následující:
 - Žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM a
 - Fluorescenční signál v HEX kanálu.

V reakcích **2, 3 a 4**:

- V případě vzorků s jednou nebo dvěma kopiemi analyzovaných HLA alel (HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*03:02 nebo HLA-DQA1*03 pro reakci 2, 3 a 4) se specifické FAM značené sondy vážou na své komplementární sekvence DNA, IPC specifická HEX-značená sonda se váže na svou komplementární sekvenci DNA a je pozorováno následující:
 - Fluorescenční signál v kanálu FAM (λ_{\max} 518 nm) a
 - Fluorescenční signál v HEX kanálu (λ_{\max} 556 nm).
- V případě vzorků bez kopií analyzovaných HLA alel (HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*03:02 nebo HLA-DQA1*03 pro reakce 2, 3 a 4) se IPC specifická HEX-značená sonda váže na svou komplementární DNA a je pozorováno následující:
 - Žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM a
 - Fluorescenční signál v HEX kanálu.

5- Obsah soupravy

Referenční číslo	Lahvička	Barva	GVS-DQP-24 (24 testů)	GVS-DQP-48 (48 testů)
GVS-DQ-PM1	Primer Mix 1 (PM1)	Modrý kryt	1 x 192 μ l	2 x 192 μ l
GVS-DQ-PM2	Primer Mix 2 (PM2)	Modrý kryt	1 x 192 μ l	2 x 192 μ l
GVS-DQ-PM3	Primer Mix 3 (PM3)	Modrý kryt	1 x 192 μ l	2 x 192 μ l
GVS-DQ-PM4	Primer Mix 4 (PM4)	Modrý kryt	1 x 192 μ l	2 x 192 μ l
GVS-DQ-MM1	Master Mix 1 (MM1)	Červený kryt	1 x 240 μ l	2 x 240 μ l
GVS-DQ-MM2	Master Mix 2 (MM2)	Červený kryt	1 x 240 μ l	2 x 240 μ l
GVS-DQ-MM3	Master Mix 3 (MM3)	Červený kryt	1 x 240 μ l	2 x 240 μ l
GVS-DQ-MM4	Master Mix 4 (MM4)	Červený kryt	1 x 240 μ l	2 x 240 μ l
GVS-DQ-C+	Pozitivní kontrola (C+)	Zelený kryt	1 x 30 μ l	1 x 30 μ l
GVS-RB	Slepá reakce (RB)	Přírodní kryt	1 x 100 μ l	1 x 100 μ l

6 – Skladování soupravy

Všechny součásti soupravy musí být při příjmu skladovány při teplotě -30°C až -18°C . Za těchto podmínek jsou stabilní až do data použitelnosti uvedeného na etiketě.

Neprovádějte více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení do injekčních lahviček soupravy, protože to může snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Mají-li být běhy prováděny s malým počtem vzorků, doporučuje se použít alikvoty činidel, aby nedošlo k překročení doporučeného počtu cyklů zmrazení/rozmrazení.

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

7 - Potřebný materiál, který není v soupravě

Obecné

- Jednorázové rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební zboží

- Filtrační špičky (P200, P20 a P10)
- 1,5 ml autoklávované zkušavky
- Kompatibilní spotřební materiál pro každý nástroj PCR real-time

Vybavení

- Vírový mixér
- Odstředivka
- Mikropipety (P200, P20 a P10)
- real-time PCR přístroj s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Byla ověřena následující zařízení:
 - 7500, QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR systémy, Applied Biosystems™
 - Systémy LightCycler 96 a LightCycler® 480, Roche.
 - Rotor-gen® Q, Qiagen®.
 - Systém DT Lite Real-Time PCR, technologie DNA.
 - CFX 96 Real-Time PCR, BioRad.
 - Mic qPCR, Bio Molecular Systonky.

8- Odběr a příprava vzorků

Vzorky musí být odebrány v souladu s návodem k použití odběrového zařízení (který není součástí soupravy) a podle vnitrostátních a mezinárodních pokynů.

Tento test by měl být proveden pouze s 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 dodáním výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška touto extrakční metodou.



POZOR !

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

9- Pracovní postup

→ Nastavení PCR



POZOR!

- Definujte pracovní prostory před a po PCR, které by měly být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Připravte PCR v oblasti před PCR. Používejte laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Práce na ledu nebo nad chladným blokem. Minimalizujte dobu mezi přípravou destičky a začátkem analýzy.
- Pro každou relaci se doporučuje zahrnout kontrolu kontaminace (Reaction Blank) a pozitivní kontroly (C +) dodávaných se soupravou.

1. Před zahájením testu rozmrazte všechny složky soupravy. Vortexujte lahvičku Primer Mixu a opatrně promíchejte lahvičku Master Mixu. Krátce odstředte, aby se objem usadil na dně zkumavek.
2. Pro vzorky n+1 připravte následující 4 směsi podle objemů uvedených v následující tabulce:

	R1 mix	R2 mix	R3 mix	Směs R4	Obj. na vzorek (μl)
Master Mix	MM1	MM2	MM3	MM4	10
Primer Mix	PM1	PM2	PM3	PM4	8

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

3. Do PCR destičky/zkumavek se pipetou odpipetuje 18 μl směsí (směs R1, směs R2, směs R3 a směs R4).
4. Pro každou ze čtyř reakcí přidejte do každé jamky 2 μl DNA (doporučená koncentrace mezi 10 a 200 ng/μl), pozitivní kontrola nebo reakční blank. Protože jsou čtyři reakce (R1, R2, R3 a R4), musí být použity čtyři jamky na vzorek.
5. Destička/zkumavky se uzavřou vhodným těsnicím prostředkem a krátce odstředí, aby se veškerý objem usadil na dně jamky. Pokud je to možné, ujistěte se, že v jamkách nejsou žádné bubliny.
6. Umístěte destičku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program, jak je popsáno v následující části.

→ Konfigurace termocykleru

1. Nastavte následující kanály čtení:
 - FAM kanál pro detekci sond značených FAM.
 - HEX/VIC kanál pro detekci HEX-značené sondy.
2. Nastavte příslušný profil amplifikace* a spusťte běh (*):

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

(*) Pro termocyklery Rotor-Gene® Q (Qiagen) a DT-Lite (DNA-Technology) real-time PCR nastavte následující amplifikační program:

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

→ Likvidace

S odpadními produkty se nakládá podle místních předpisů.

10- Výsledky

→ Vizualizace výsledků

Analýza výsledků se provádí pomocí specifického softwaru použitého přístroje real-time PCR a podle návodu k použití 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 fluorescenčních hodnot (exponenciální) (sigmoidální amplifikace) s Ct<35.
- Slabý fluorescenční, lineární nebo exponenciální signál pozadí s Ct>35 by neměl být považován za pozitivní zesílení. Tento test umožňuje detekci některých alel zařazených do skupiny vysoce polymorfních HLA alel, mezi nimiž byly popsány malé rozdíly v jejich sekvencích. Proto lze v kanálu FAM pozorovat slabé nespecifické signály z jiných podobných sekvencích, ale nedetekovaných HLA alel. Výskyt těchto signálů neruší platnost testu.

Vzorek je považován za pozitivní, pokud je detekována exponenciální amplifikace s Ct<35. Vzorek je považován za negativní, pokud je detekováno neexponenciální amplifikace s nízkou intenzitou nebo exponenciální amplifikace s hodnotou Ct >35.

POZOR!

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

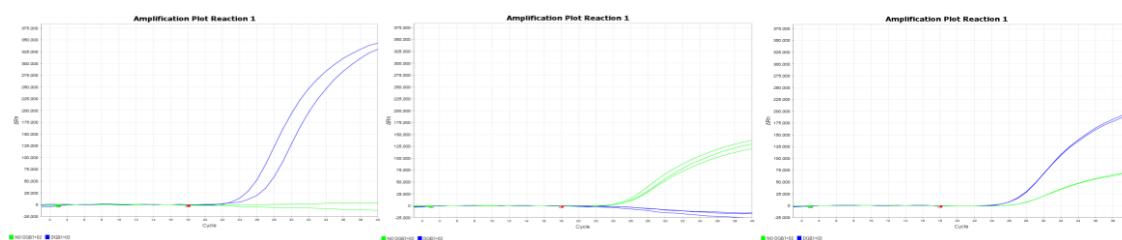
Vyberte zobrazení lineárního měřítka a zvolte oblast, kde je fluorescenční signál stabilní před exponenciálním zesílením. Umístěte prahovou čáru nad tento signál pozadí tak, aby protínal inflexní bod zesilovací křivky. Tato čára by měla mírně překročit hodnotu nejvyšší fluorescence získané s negativními vzorky pro alelu detekovanou v tomto kanálu.

→ Interpretace výsledků

Přítomnost alel spojených s celiakií bude určena pozitivitou nebo negativitou čtyř různých reakcí.

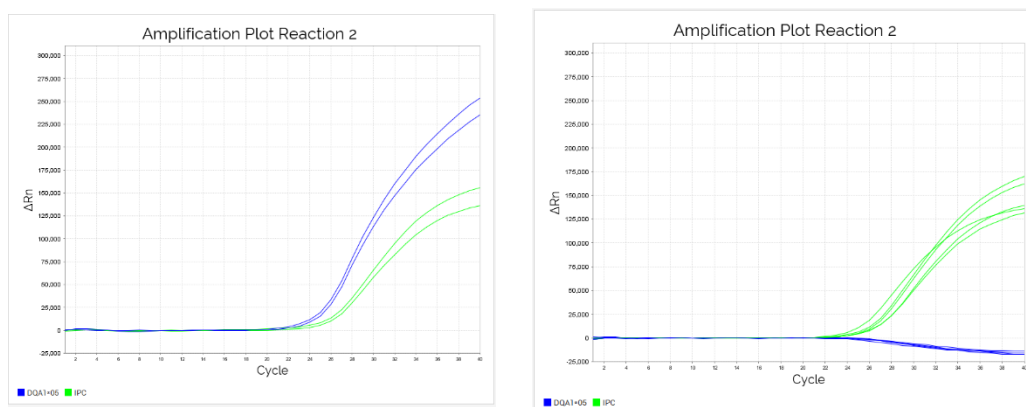
Výsledky získané s touto soupravou musí být interpretovány vizualizací amplifikačních křivek v kanálech FAM a HEX. Vyberte "lineární stupnici" a určete nepřítomnost/přítomnost sigmoidální amplifikace v každém kanálu.

V reakci **1** se vzorky s pouze amplifikační křivkou v kanálu FAM považují za homozygotní HLA-DQB1*02. Pokud se v HEX kanálu objeví pouze jedna amplifikační křivka, vzorek se považuje za negativní HLA-DQB1*02. Pokud je detekována amplifikační křivka v FAM i HEX kanálech, vzorek se považuje za HLA-DQB1*02 heterozygotní (jedna HLA-DQB1*02 alela a jakákoli jiná HLA-DQB1 alela odlišná od DQB1*02).



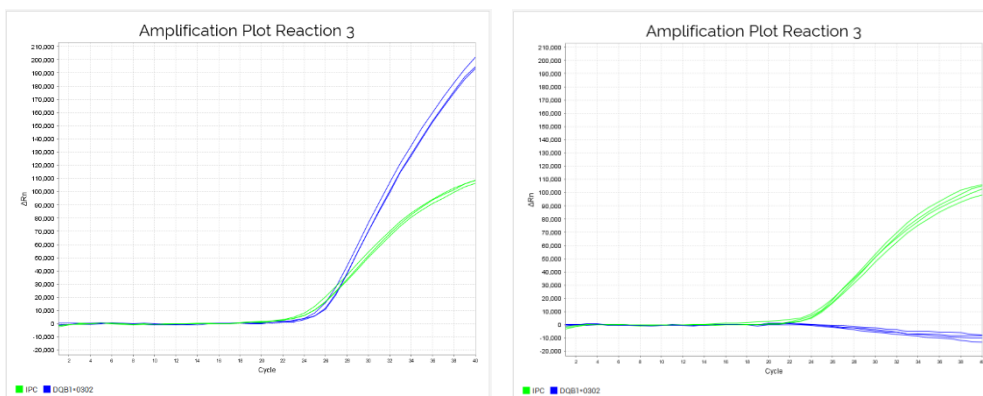
Reakce 1: Amplifikační křivky z homozygotních (vlevo) homozygotních vzorků HLA-DQB1*02, negativní (uprostřed) a DQB1*02 heterozygotních vzorků (vpravo). FAM kanál (modrý), HEX kanál

V reakci **2** se používá β -globin (*HBB*) gen jako vnitřní kontrola (IPC). Proto všechny pozitivní a negativní vzorky musí generovat amplifikační křivku v HEX kanálu aby byl výsledek považován za platný, podle kritérií stanovených v oddíle "11 - Kontrola jakosti". Tyto vzorky s amplifikační křivkou v obou FAM a HEX kanálech je třeba považovat za HLA-DQA1*05 pozitivní (alespoň jedna alela je HLA-DQA1*05 v analyzovaném vzorku). Vzorky s amplifikační křivkou pouze v HEX kanálu jsou pokládány za HLA-DQA1*05 negativní.



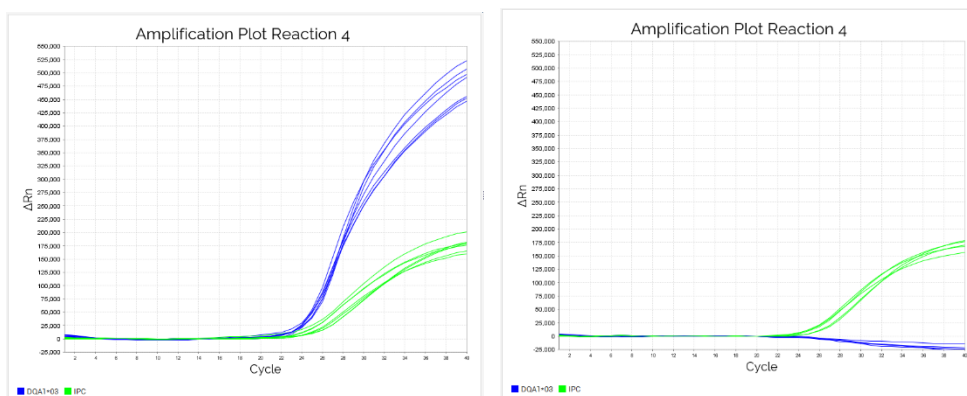
Reakce 2: Amplifikační křivky z HLA-DQA1*05 pozitivní (vlevo) a DQA1*05 negativní (vpravo). FAM kanál (modrý), HEX kanál (zelený)

V reakci **3** se gen β -globinu (*HBB*) používá jako vnitřní kontrola (IPC). Proto musí všechny pozitivní a negativní vzorky generovat amplifikační křivku v HEX kanálu, aby byly považovány za platné, podle kritérií stanovených v části "11 - Kontrola kvality". Vzorky s amplifikační křivkou jak ve FAM, tak v HEX kanálu se považují za HLA-DQB1*03:02 pozitivní (alespoň jedna alela je HLA-DQB1*03:02 v analyzovaném vzorku). Vzorky, které generují amplifikační křivku pouze v HEX kanálu, jsou považovány za HLA-DQB1*03:02 negativní.



Reakce 3: Amplifikační křivky z HLA-DQB1*03:02 pozitivní (vlevo) a DQB1*03:02 negativní (vpravo). FAM kanál (modrý), HEX kanál (zelený)

V reakci 4, se β -globin (*HBB*) se používá jako vnitřní kontrola (IPC). Proto musí všechny pozitivní a negativní vzorky generovat amplifikační křivku v kanálu HEX, aby byly považovány za platné, podle kritérií stanovených v části "11- Kontrola kvality". Vzorky s amplifikační křivkou v obou FAM a HEX kanálech je třeba považovat za HLA-DQA1*03 pozitivní (alespoň jedna alela je HLA-DQA1*03 v analyzovaném vzorku). Vzorky amplifikační křivkou pouze v HEX kanálu je třeba považovat za HLA-DQA1*03 negativní.



Reakce 4: Amplifikační křivky z DQA1*03 pozitivních (vlevo) a DQA1*03 negativních (vpravo) vzorků. FAM kanál (modrý), HEX kanál (zelený)

Očekávané výsledky pro různé možné genotypy jsou uvedeny v následující tabulce:

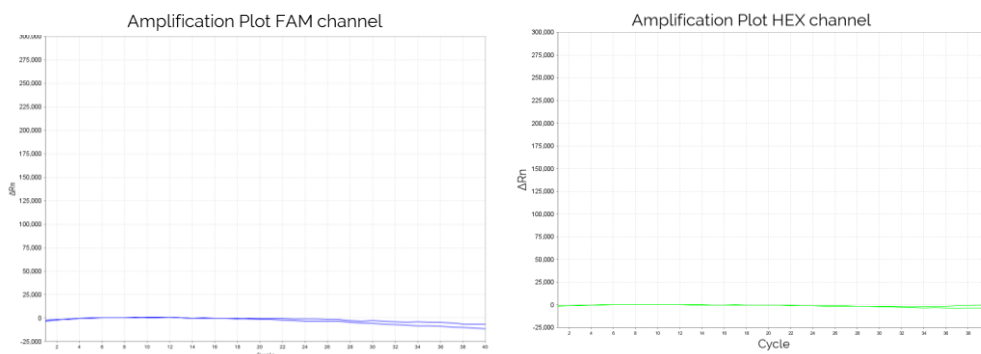
Genotyp	Reakce 1		Reakce 2		Reakce 3		Reakce 4	
DQ2.5 heterozygot + DQ8	Heterozygotní		Pozitivní		Pozitivní		Pozitivní	
	FAM+	HEX+	FAM+	HEX+	FAM+	HEX+	FAM+	HEX+
DQ2.5 homozygot	Homozygot DQB1*02		Pozitivní		Negativní		Negativní	
	FAM+	HEX+	FAM+	HEX+	FAM-	HEX+	FAM-	HEX+
DQ8 pozitivní	Homozygotní č. DQB1*02		Negativní		Pozitivní		Pozitivní	
	FAM-	HEX+	FAM-	HEX+	FAM+	HEX+	FAM+	HEX+
DQ2.x heterozygot	Heterozygotní		Negativní		Negativní		Negativní	
	FAM+	HEX+	FAM-	HEX+	FAM-	HEX+	FAM-	HEX+
DQ2/DQ8 negativní	Homozygotní č. DQB1*02		Negativní		Negativní		Negativní	
	FAM-	HEX+	FAM-	HEX+	FAM-	HEX+	FAM-	HEX+

11- Kontrola kvality

Souprava obsahuje reakční slepý vzorek (RB) a pozitivní kontrolu (C+). Tyto kontroly musí být nasazeny v každém běhu pro každou reakci testu. Přiměřené chování těchto kontrolních vzorků je zárukou správného výkonu soupravy.

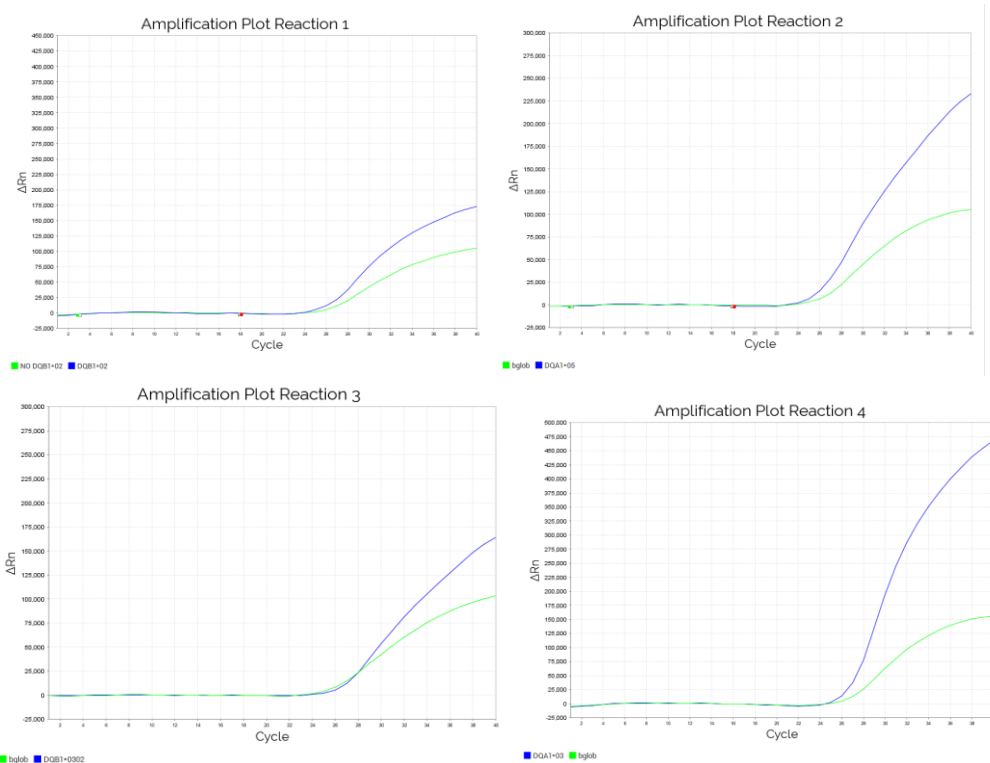
Výsledek každé reakce se považuje za platný, pokud je získán následující amplifikační vzorec:

Slepá reakce (RB)



Žádná amplifikace ve FAM nebo HEX kanálech.

Pozitivní kontrola (C+)



Sigmoidální amplifikace s hodnotou Ct<35 v FAM (modrá) i HEX (zelená) kanál

IPC je detekován v HEX kanálu a používá se jako vnitřní kontrola v reakcích 2, 3 a 4. Proto je výsledek vzorku považován za platný, pokud je v těchto reakcích detekována alespoň sigmoidální amplifikace s Ct<35 v HEX kanálu.

Výsledek každé reakce je třeba považovat za neplatný a měl by se opakovat, pokud:

- Amplifikační křivka s Ct<35 je pozorována ve FAM a/nebo HEX kanálech ve slepé reakci (Reaction Blank).
- Je pozorován neexponenciální amplifikační signál nebo se v pozitivní kontrole objeví amplifikační signál s Ct>35.
- V HEX kanálu v reakci 2, 3 a/nebo 4 není v HEX kanálu žádná amplifikační křivka (Ct<35).
- Vzorky DNA s amplifikačními křivkami s Ct>35 ve FAM a/nebo HEX kanálech musí být považovány za pochybné a měly by být znovu testovány při provádění nové extrakce DNA.

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

12- Specifická operační data

→ Analytická specifita

Zkřížená reaktivita byla hodnocena ve třech nezávislých validačních studiích soupravy Genvinset® HLA Celiac Plus, jak je uvedeno v bodě "Diagnostická citlivost a specifita".

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

Interference byla studována pomocí bibliografického vyhledávání. Heparin může inhibovat aktivitu Taq polymerázy a soutěžit s cílovou nukleovou kyselinou, takže odebraná krev musí být ošetřena jinými antikoagulačními činidly, jak je uvedeno v části "Odběr a příprava vzorků". Některé látky nalezené v krvi jsou známé jako inhibitory PCR: haemoglobin, hemin, bilirubin, žlučové soli, laktoferin, imunoglobulin G. Polymeráza obsažená v sadě Genvinset® HLA Celiac Plus prokázala vysokou odolnost vůči inhibici a složení Master Mix je navrženo tak, aby se vypořádalo s interferenčními látkami. Nicméně přítomnost potenciálně inhibičních látek musí být eliminována během extrakčních a purifikačních protokolů DNA. Před dodáním výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška touto extrakční metodou.

→ Analytická citlivost

LoD: Test ředění byl proveden s použitím různých vzorků DNA (pozitivních a negativních pro alely testované v tomto testu). Testované vstupní hladiny DNA se pohybovaly od 40 ng do 0,016 ng (**) v trojnásobné řadě ředění. Každá úroveň byla testována třikrát. Byly získány následující údaje:

	Reakce 1 DQB1*02	Reakce 2 DQA1*05	Reakce 3 DQB1*03:02	Reakce 4 DQA1*03
Detekční limit (ng)	0.16 ks	0.49 ks	0.49 ks	0.49 ks

- Detekční limit = 0.49 ng (Ct<35)

Horní mez: Vzorky s různými genotypy (pozitivní a negativní pro analyzované alely) byly testovány ve dvojnásobné řadě ředění v rozmezí od 400 ng do 6,25 ng (**). Výkon testu zůstal přijatelný na všech vstupních úrovních: na všech úrovních byly detekovány odpovídající sigmoidální amplifikační křivky a genotypové odezvy (s hodnotami Ct<35).

(**). Koncentrace DNA byla měřena spektrofotometrem Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

→ Diagnostická senzitivita a specifita

149, 168, 156 a 159 vzorků DNA bylo analyzováno v různých laboratořích na reakce 1, 2, 3 a 4. Tyto vzorky byly dříve typizovány pro lokusy HLA-DQB1 a HLA-DQA1 odlišnou metodikou. Byly získány následující výsledky:

		Genvinset® HLA CeliacPlusReaction 1			
		DQB1*02	Homozygotní	Heterozygotní	Negativní
Předchozí informace	Homozygotní		33	0	0
	Heterozygotní		0	52	0
	Negativní		0	0	64

		Genvinset® HLA Celiac PlusReactions 2, 3 a 4						
		Reakce 2 DQA1*05		Reakce 3 DQB1*03:02		Reakce 4 DQA1*03		
		Genotyp	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Předchozí informace	Pozitivní		71	0	58	0	57	0
	Negativní		0	97	0	98	0	102

Dišlo ke 100% shodě ve výsledcích získaných s přípravkem Genvinset® HLA Celiac Plus a genotypy dříve získanými jinou metodikou.

→ Přesnost

Studie opakovatelnosti spočívají v měření variability v rámci jednoho cyklu prostřednictvím analýzy replik každého druhu vzorku, který lze stanovit pomocí soupravy. Každý vzorek byl analyzován v duplikátu.

Genvinset® HLA Celiac Plus vykazoval 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti regencie. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi běhy, šaržemi a operátory. Tři různé soubory byly analyzovány ve třech různých přístrojích:

Genvinset® HLA Celiac Plus prokázal 100% reprodukovatelnost.

→ Pravdivost

Pravdivost analytického postupu přípravku Genvinset® HLA Celiac Plus se hodnotí porovnáním s referenční metodou. Studie byla vyvinuta jako interní validace reagentie, ve které byla prokázána pravdivost se 100% hodnotou. Viz část "Diagnostická citlivost a specifita".

13- Omezení postupu

- Metoda detekuje HLA-DQB1*02/03:02 a DQA1*05/03 obsažené v dokumentu "HLA alely detected_GVS-DQP" nahraném na www.bdrdiagnostics.com. Vzhledem k vysoce polymorfni povaze HLA alel se v kanálu FAM mohou objevit slabé signály z jiných alel podobných sekvencí, ale nedetekovaných .
- Mutace nebo polymorfismy na místech nasedání primerů/sond jsou možné a mohou vést k nedostatečné definici alel. K vyřešení typizace mohou být zapotřebí další technologie.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli postupy, které nesplňují tyto parametry, mohou vést ke špatným výsledkům.
- Nepoužívejte soupravu, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnějšího boxu nebo jakékoli jiného incidentu, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Všechny manipulace s čidly Genvinset® musí být prováděny v souladu se správnou laboratorní praxí a musí být přizpůsobeny místním předpisům.
- Nemíchejte komponenty z jiných sad nebo čísel šarží.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti. Čidla, jejichž trvanlivost prošla, zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Real-time PCR termocykler musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán podle pokynů výrobce.
- Vzhledem ke složitosti typizace HLA musí být interpretace dat a výsledků hodnocena kvalifikovaným personálem.
- To slouží jako pomocný nástroj pro diagnostiku pacientů s podezřením na celiakii. Použijte tyto výsledky ve spojení s klinickými údaji a výsledky dalších testů pacienta.

14 - Průvodce řešením problémů

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

- Real-time PCR přístroj není správně naprogramován. Tepelný profil není správný / čtecí kanály nejsou správně nakonfigurovány / vybrané fluorofory nejsou vhodné.
 - Zkontrolujte, zda byl přístroj správně naprogramován.
- Polohy vzorků a kontrol uvedené během přípravy testu neodpovídají polohám, ve kterých byly umístěny do přístroje.
 - Správně přiřadte polohu vzorků.
- Čidlo nefunguje správně.
 - Ujistěte se, že souprava je skladována při vhodné teplotě (mezi -30 ° C a -18° C) a chráněna před světlem. Vyhněte se zbytečným cyklům zmrazení/rozmrazení. Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti.
- Potřebná množství každého z čidel nebyla přidána do reakční směsi.
 - Zkontrolujte objem každé složky přidané do směsi.
- Použitý spotřební materiál není kompatibilní s používaným vybavením.
 - Ujistěte se, že byl použit správný spotřební materiál (kompatibilní s použitým přístrojem PCR).

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

- Špatná kvalita použité DNA.
 - Zkontrolujte poměr absorpce 260/280 a nekvalitní vzorky zlikvidujte. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů (heparin, hemoglobin, hemin, bilirubin, žlučové soli, laktoferin, imunoglobulin G). Zopakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Nedostatečná koncentrace DNA.
 - Upravte koncentraci DNA na doporučený rozsah koncentrací.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
- Inhibice amplifikace.
 - Odeberte plnou krev do zkumavek EDTA nebo citrátu.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
 - Test zopakujte a ujistěte se, že byly přidány vzorky.

→ Signál detekovaný v negativní kontrole

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

→ Intenzita fluorescence se liší mezi vzorky nebo abnormální amplifikační křivky

- Nečistoty vně reakční zkumavky interferují s detekcí fluorescence.
 - Zařízení důkladně vyčistěte. Zkontrolujte, zda je vnější strana zkumavek/destičky čistá. Manipulujte s destičkou/zkumavkou v rukavicích.
- Objem není na dně jamky nebo jsou v jamce bubliny.
 - Před vložením zkumavek/destiček do termocykleru odstředěte.
 - Zkontrolujte, zda nejsou uvnitř bubliny. Pokud ano, proveďte krátké odstředění, abyste je odstranili.
- Destička/zkumavky nebyly správně uzavřeny.
 - Test zopakujte a kontroluje, zda byly zkumavky/destičky správně utěsněny.
- Byly použity DNA s různými koncentracemi nebo použitý vzorek obsahuje inhibitor reakce.
 - Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Přítomnost polymorfismů nebo mutací na vazebných místech sondy/primeru.
 - Kontaktujte naše oddělení technické podpory na adrese *customersupport@bdrdiagnostics.com*

15- Odkazy

- 1) Hujoel IA, Reilly NR, Rubio-Tapia A. Celiac Disease: Clinical Features and Diagnosis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2019 Mar;48(1):19-37.
- 2) Louka AS and Sollid LM. HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* 2003; 61: 105-117.
- 3) Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, et al. Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* (2018) 16:823–36.e2.
- 4) Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med.* 2019 Jul 23;17(1):142.

- 5) Kuja-Halkola R, Lebowohl B, Halfvarson J, Wijmenga C, Magnusson PK, Ludvigsson JF. Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: a population-based study in 107 000 twins. *Gut* (2016) 65:1793–8.
- 6) Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 53–81
- 7) Louka AS and Sollid LM. HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* 2003; 61: 105–117.
- 8) Dubois PC and van Heel DA. Translational Mini-Review Series on the Immunogenetics of Gut Disease: Immunogenetics of coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2008; 153(2):162–73.
- 9) Sollid L. M., Lie B. A. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005;3(9):843–851.
- 10) Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, Spaenij L, Koning F. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12390–5.
- 11) Karelk K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European genetics cluster on celiac disease. *Human Immunol*. (2003) 64:469–77.
- 12) Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*. (2010) 42:295–302.
- 13) van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet*. (2007) 39:827–9.
- 14) Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet*. (2008) 40:395–402.
- 15) Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet*. (2011) 43:1193–201.
- 16) Megiorni, F., Pizzuti, A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 19, 88 (2012).












16- Oznámení zákazníkovi

- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely *in vitro*.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie, musí uživatel v případě vážného incidentu v souvislosti s používáním soupravy tuto skutečnost oznámit výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo země pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být prováděno podle místních požadavků pro každou zemi.
- Souhrn bezpečnosti a výkonnosti (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný uživatelům sady (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>)
- Produkty Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. nesmí být dále prodávány, upravovány pro další prodej nebo používány k výrobě jiných komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.
- Veškeré informace obsažené v tomto dokumentu mohou být bez předchozího upozornění upraveny. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. nepřebírá žádnou odpovědnost za případné chyby v dokumentu. Tento dokument je v době zveřejnění považován za úplný a přesný. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. nebude v žádném případě odpovědná za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo odvozené škody způsobené použitím tohoto dokumentu.
- Zakoupením tohoto produktu získává kupující práva na určité patenty společnosti Roche, které se používají pouze k poskytování diagnostických služeb *in vitro*. Neuděluje se žádný generický patent ani žádné jiné patenty zaměřené na jiné použití kromě toho, které je specifikováno.
- FAM™ a HEX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- FAM™ a HEX™ mohou být pokryty jedním nebo více patenty vlastněnými společností Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto produktu zahrnuje omezená, nepřevoditelná práva.
- TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.
- Genvinset® je ochranná známka společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.

17- Řízení změn

Verze	Popis modifikace
Rev. 00	První verze dokumentu.
Rev. 01	Aktualizace verze databáze IMGT-HLA a přidání loga CE.
Rev. 02	Přidání přístroje CFX96 real-time PCR do seznamu ověřených tepelných cyklérů.
Rev. 03	Změna reakčního objemu. Změna protokolu amplifikace termocykleru. Změna složení Primer a Master Mix.
Rev. 04	Oprava překlepů a chyb v překladu. Přidáno telefonní číslo a e-mail BDR. Změna odezvy pozitivní kontroly. Přidání kódů UDI-DI. Změna validovaných cyklérů PCR v reálném čase. Poznámka, že Souhrn bezpečnosti a výkonnosti (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný uživatelům soupravy.

18- Vysvětlení symbolů použitých na etiketách

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Datum expirace
	Katalogové číslo		Předpokládaný počet testů <n>
	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní limit		Chraňte před slunečním zářením
	Pozitivní kontrola		Nahlédněte do elektronického dokumentu Návod k použití
	Tento výrobek splňuje požadavky směrnice 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích <i>in vitro</i>		