



Genvinset®

HLA B27v5

NÁVOD K POUŽITÍ

*Kit pro detekci skupin alel HLA-B*27*

Pro diagnostické použití in vitro

Rev.08 / 2024-05-20



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



www.bdrdiagnostics.com



Kód produktu:

GVS-B2705-24 (24 testů)

GVS-B2705-48 (48 testů)

UDI-DI:

8437016942635

8437016942642

Skladujte

při teplotě -30°C až -18°C

Genvinset®

HLA B27v5

Index

1- Informace pro bezpečnost.....	3
2 - Zamýšlené použití	3
3- Shrnutí a vysvětlení	3
4- Zásady postupu.....	4
5- Obsah sady.....	4
6- Skladování sady	5
7- Materiály požadované, ale nedodávané.....	5
8- Odběr a příprava vzorku	6
9- Postupy použití	6
10- Výsledky	7
11- Kontrola kvality.....	9
12- Specifické provozní údaje.....	10
13- Omezení postupu.....	11
14- Průvodce odstraňováním problémů.....	12
15- Odkazy.....	13
16- Oznámení kupujícímu.....	14
17- Řízení změn.....	14
18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích.....	15

1- Informace pro bezpečnost

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

Soupravu diagnostických zdravotnických prostředků in vitro mohou používat odborníci s rozsáhlými zkušenostmi s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

V případě pochybností týkajících se popisu metody testu se poradte s výrobcem. Kontaktujte nás telefonicky +34 976 094 603 nebo e-mailem customersupport@bdrdiagnostics.com.

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

Kontaminace vzorku nebo činidla může vést k nesprávným výsledkům. Buďte opatrní při extrakci DNA a manipulaci se vzorkem a činidly.

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

Zajistěte, aby bylo s odpadem nakládáno v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s odpady může mít za následek kontaminaci životního prostředí.

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

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

2 - Zamýšlené použití

Genvinset® HLA B27v5 je poloautomatizovaná in vitro diagnostická souprava pro kvalitativní detekci skupiny alel HLA-B*27 v genomové DNA extrahované z plné krve, spojených s predispozicí ankylozující spondylitidy, pomocí real-time PCR s využitím technologie sond TaqMan®.

Pacienti, kteří mohou mít prospěch z tohoto stanovení, jsou ti, kteří jsou odesláni specialistou s klinickými příznaky kompatibilními s revmatoidními onemocněními, jako je ankylozující spondylitida, reaktivní artritida, psoriatická artritida nebo artritida související s juvenilní entezitidou a akutní přední uveitida. 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.

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

3- Shrnutí a vysvětlení

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC) je genetická oblast, která obsahuje nejvíce polymorfních lokusů lidského genomu. Podílí se na mechanismu prezentace antigenu a jako takový definuje obecnou imunologickou odpověď¹.

V rámci MHC je alelická rodina HLA-B*27 součástí lokusu HLA-B. Četnost jedinců nesoucích HLA-B*27 se v jednotlivých populacích značně liší, u bělochů je to přibližně 7–9 %².

V roce 1972 byla objevena první asociace haplotypu leukocytárního antigenu (HLA) s lidským zánětlivým onemocněním, která koreluje HLA-B*27 s ankylozující spondylitidou (AS)³. To zůstává jedním z nejsilnějších známých vztahů mezi hlavním antigenem histokompatibilního komplexu a onemocněním. Alely HLA-B*27 jsou přítomny až u 90 % pacientů ve většině etnických skupin, které trpí AS⁴.

Podobným způsobem byla prokázána vysoká prevalence tohoto antigenu u dalších poruch spojených s HLA-B*27, včetně reaktivní artritidy (dříve označované jako Reiterův syndrom) (60–70 %)^{5,6}, psoriatické artritidy (14–40 %)⁷, artritidy související s juvenilní entezitidou (60–90 %)^{8,9} a akutní přední uveitidy (50 %)¹⁰.

Navzdory uznávané asociaci HLA-B*27 s těmito poruchami není příspěvek HLA-B*27 k patogenezi onemocnění zcela jasný a bylo navrženo několik teorií, protože mechanismus, kterým k onemocnění dochází, zůstává nezcela pochopen¹¹.

4- Zásady postupu

Test je založen na technologii PCR v reálném čase s hydrolytickými sondami. Každý vzorek pomáhá analyzovat:

- Pár primerů pro amplifikaci alel HLA-B*27 a pár primerů pro amplifikaci fragmentu genu *HBB* (β-globinu), který slouží jako vnitřní pozitivní kontrola (IPC).
- Hydrolytická sonda pro detekci alel HLA-B*27 značených na 5' konci FAM fluoroforem a hydrolytická sonda pro detekci amplifikovaného fragmentu genu *HBB* (IPC) značený na 5' konci HEX fluoroforem. Obě sondy jsou na 3' konci označeny zhášečem, který inhibuje fluorescenční emisi, když je sonda neporušená.

Jak PCR reakce pokračuje, 5'→3'exonukleázová aktivita Taq polymerázy štěpí sondy hybridizované na jejich komplementární sekvenci, odděluje fluorofor od zhášeče a produkuje fluorescenční signál úměrný množství generovaného PCR produktu, který je monitorován v reálném čase v přístroji pro real-time PCR. Tedy:

- V případě vzorků s jednou nebo dvěma kopiemi alel HLA-B*27 (HLA-B*27 pozitivní) se FAM-značená sonda váže na své komplementární sekvence DNA, HEX-značená sonda se váže na svou komplementární sekvenci DNA na IPC a je pozorováno následující:
 - Fluorescenční signál v kanálu FAM (λ_{\max} 518 nm) a
 - Fluorescenční signál v HEX kanálu (λ_{\max} 556 nm).
- V přítomnosti vzorků bez kopií alel HLA-B*27 (HLA-B*27 negativní) se sonda značená HEX váže na svou komplementární sekvenci DNA na IPC a je pozorováno následující:
 - Žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM a
 - Fluorescenční signál v HEX kanálu.

5- Obsah sady

→ GVS-B2705-24 (24 testů)

- GVS-B27v5-PM: 1 injekční lahvička x 192 µl Primer Mix (PM) – modré víčko
- GVS-B27v5-MM: 1 injekční lahvička x 240 µl Master Mix (MM) – červené víčko
- GVS-B27v5-C+: 1 injekční lahvička x 15 µl Pozitivní kontrola (C+) – zelené víčko
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 µl Reakční blank (RB) – přírodní víčko

→ GVS-B2705-48 (48 testů)

- GVS-B27v5-PM: 2 lahvičky x 192 µl Primer Mix (PM) – modré víčko
- GVS-B27v5-MM: 2 lahvičky x 240 µl Master Mix (MM) – červené víčko
- GVS-B27v5-C+: 1 injekční lahvička x 15 µl Pozitivní kontrola (C+) – zelené víčko
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 µl Reakční blank (RB) – přírodní víčko

6- Skladování sady

Všechny součásti soupravy musí být při příjmu skladovány při teplotě -30°C až -18°C. Za těchto podmínek si souprava zachovává svou funkčnost až do data expirace uvedeného na štítku.

Neprovádějte více než 3 cykly zmrazování/rozmrazování lahviček soupravy, protože to může snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Pokud mají být testy prováděny s malým počtem vzorků, doporučuje se použít alikvoty činidel, aby nedošlo k překročení doporučeného počtu cyklů zmrazování/rozmrazování.

Vzhledem k fotosenzitivní povaze Primer Mixu se vyhněte trvalému vystavení světlu.

7- Materiály požadované, ale nedodávané

Obecné

- Jednorázové rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební zboží

- Filtrační špičky (P200, P20 a P10)
- Autoklávované zkumavky o objemu 1,5 ml
- Kompatibilní spotřební materiál pro každý přístroj pro PCR v reálném čase

Vybavení

- Vírový mixer/Vortex
- Centrifuga / Odstředivka
- Mikropipety (P200, P20 a P10)
- Přístroj pro PCR v reálném čase s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Validována byla následující zařízení:
 - 7500, QuantStudio™ 5 a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems™
 - Systémy LightCycler® 96 a LightCycler® 480, Roche.
 - Rotor-Gen® Q, Qiagen®.
 - DT Lite Real-Time PCR System, DNA Technology.
 - qTOWER3G, Analytik Jena.
 - CFX96 Real-Time PCR, BioRad.
 - Mic qPCR, Molecular Systems

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

8- Odběr a příprava vzorku

Vzorky musí být odebrány v souladu s návodem k použití odběrového zařízení (není součástí sady) a podle národních a mezinárodních směrnic.

Tento test by měl být proveden pouze s DNA extrahovanou ze vzorků plné krve konzervovaných antikoagulačními látkami, jako je EDTA nebo citrát (podrobnosti viz bod 12).

Tato technika je kompatibilní s několika metodami extrakce DNA. Byly testovány některé interferující látky, které by mohly ovlivnit výsledek (viz bod 12). Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měl být proveden validační test s takovou extrakční metodou.

POZOR!



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

9- Postupy použití

→ Nastavení PCR

POZOR!



- Definujte pracovní oblasti před a po 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 na chladném bloku. Minimalizujte dobu mezi přípravou a začátkem testu.
- U každého testu se doporučuje otestovat negativní kontrolu (RB) a pozitivní kontrolu (C+) dodávanou se soupravou.

1. Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Nalijte lahvičku Primer Mix a opatrně promíchejte lahvičku Master Mix. Krátce odstředějte, aby se shromáždil objem na dně zkumavek.
2. Připraví se reakční směs pro n+1 vzorků s použitím množství uvedených v této tabulce:

	Objem na vzorek (μl)
Master Mix	10
Primer Mix	8

Jemně promíchejte a odstředěte, abyste zajistili, že se veškerý objem usadí na dně zkumavky.

3. Napipetujte 18 μl této směsi do destičky/zkumavek PCR.
4. Do každé jamky se přidá 2 μl DNA (doporučená koncentrace mezi 10 a 200 ng/μl), Reaction Blank nebo Positive Control (C+).
5. Utěsněte destičku/zkumavky pomocí vhodného těsnění, krátce vírujte a krátce odstředěte, abyste zajistili, že se veškerý objem usadí na dně jamky. Pokud je to možné, ujistěte se, že v jamkách nejsou žádné bubliny.

6. Umístěte destičku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak je popsáno v následující části.

→ Konfigurace termocykleru

- Nastavte následující čtecí kanály:
 - FAM kanál pro detekci sondy značené FAM.
 - HEX/VIC kanál pro detekci sondy značené HEX.
- Nastavte příslušný profil zesílení* a spusťte běh:

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

(*) Pro tepelné cykly PCR v reálném čase Rotor-Gene® (Qiagen) i DT-Lite (DNA-Technology) nastavte následující program amplifikace:

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

→ Likvidace

S odpadními produkty musí být nakládáno v souladu s místními předpisy.

10- Výsledky

→ Vizualizace výsledků

Analýza výsledků se provádí pomocí specifického softwaru používaného přístroje real-time PCR a podle návodu k použití výrobce.

Po dokončení běhu vyberte lineární měřítko pro vizualizaci křivek amplifikace. Před interpretací výsledků se doporučuje zkontrolovat správné chování získaných amplifikačních křivek:

- Amplifikační signál je považován za pozitivní, pokud je pozorován rychlý a pravidelný nárůst hodnot fluorescence (exponenciální zesílení) s $Ct < 35$.
- Slabý fluorescenční, lineární nebo exponenciální signál pozadí s $Ct > 35$ by neměl být považován za pozitivní amplifikaci. Tento test umožňuje detekovat některé alely zařazené do skupiny vysoce polymorfních HLA alel, mezi nimiž byly popsány malé rozdíly v jejich sekvencích. Proto mohou být v kanálu FAM pozorovány slabé nespecifické signály z jiných podobných sekvencí, ale nedetekovaných HLA alel. Vzhled těchto signálů neznehodnocuje test.

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

Vzorky s anomálními amplifikačními křivkami musí být znovu testovány.



POZOR!

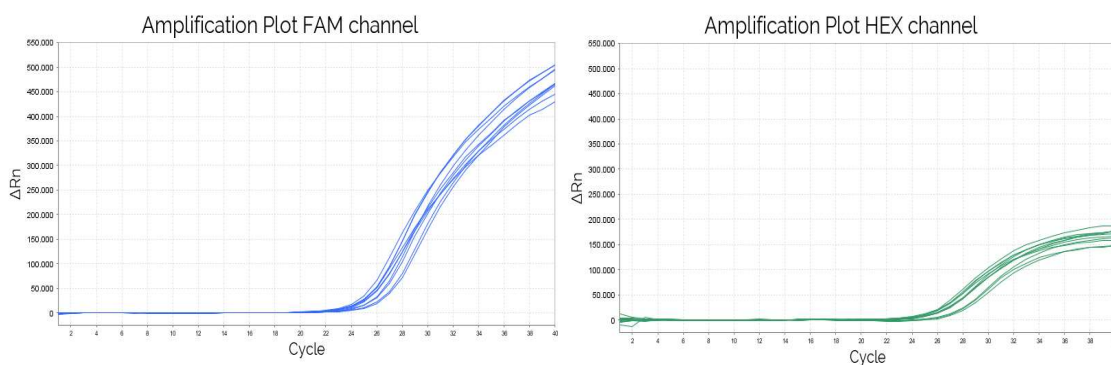
Chcete-li určit hodnotu Ct v každém kanálu, upravte prahovou čáru následujícím způsobem:

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

→ Interpretace výsledků

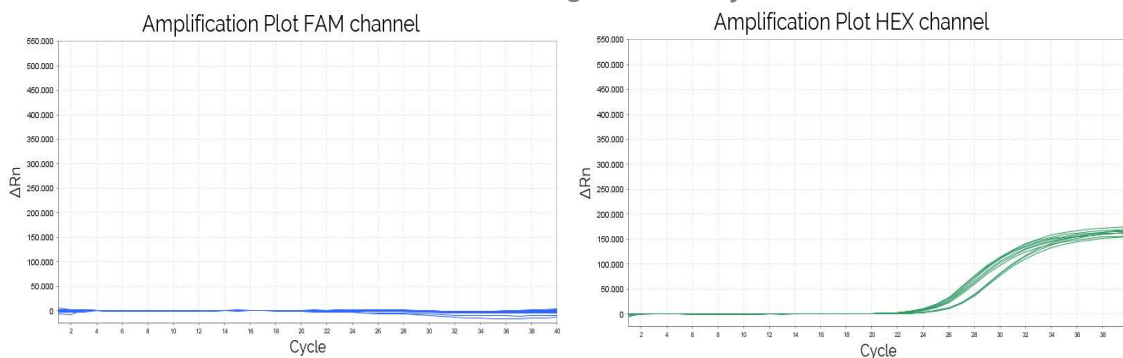
Výsledky získané pomocí této sady musí být interpretovány vizualizací amplifikačních křivek v obou FAM a HEX kanálech. Vyberte "lineární měřítka" a určete nepřítomnost/přítomnost vhodného zesílení v každém kanálu.

HLA-B*27 pozitivních vzorků



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

HLA-B*27 negativní vzorky



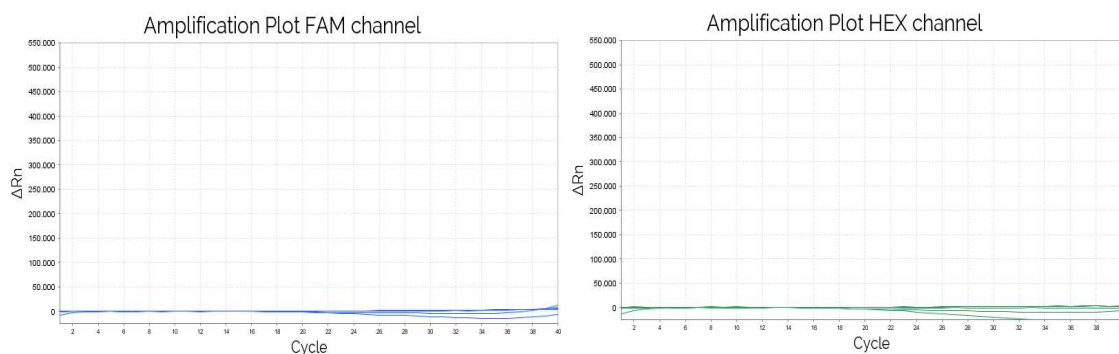
Žádný signál nebo signál nízké intenzity v kanálu FAM a exponenciální zesílení v kanálu HEX ($Ct < 35$)

11- Kontrola kvality

Tato souprava obsahuje reakční slepý vzorek Reaction Blank (negativní kontrola) a pozitivní kontrolní vzorek (C+), které musí být testovány v každém testu. Adekvátní chování kontrolních vzorků je zárukou správného provedení testu.

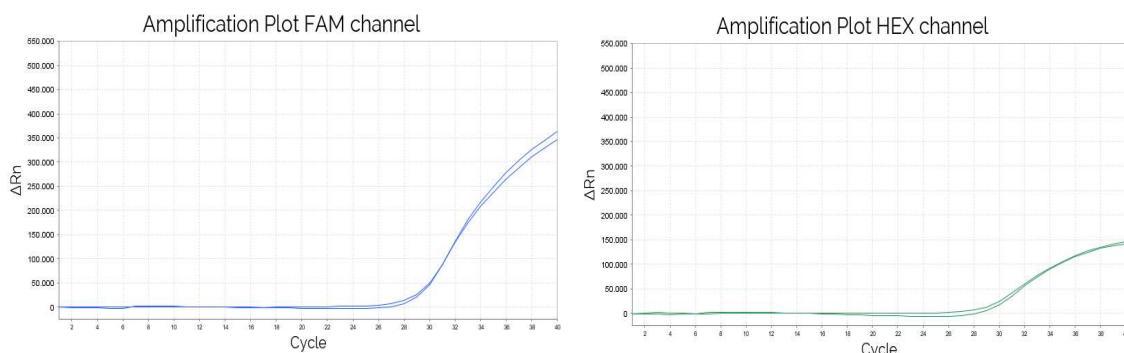
Tets se považuje za platný, pokud je v kontrolních vzorcích pozorován následující vzor amplifikace:

Reakční blank (RB)



Žádný signál nebo signál nízké intenzity ($Ct > 35$) v kanálech FAM i HEX

Pozitivní kontrola (C+)



Exponenciální zesílení s hodnotou $Ct < 35$ v kanálech FAM i HEX.

IPC je detekován v HEX kanálu a použit jako interní pozitivní kontrola pro každý analyzovaný vzorek. Proto je výsledek vzorku považován za platný, pokud je v HEX kanálu alespoň exponenciální amplifikace s $Ct < 35$.

Pokud je u výše uvedených kontrol pozorováno adekvátní chování, pokračujte v interpretaci vzorků, jak je uvedeno v předchozí části.

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

- Amplifikační křivka s $Ct < 35$ je pozorována v kanálech FAM a/nebo HEX v reakčním blamku.
- Je pozorován neexponenciální amplifikační signál nebo se v pozitivní kontrole objeví amplifikační signál s $Ct > 35$.
- Vzorky DNA s amplifikačními křivkami s $Ct > 35$ v FAM a/nebo HEX kanálech musí být považovány za pochybné a měly by být znovu testovány s použitím nové extrakce DNA.

12- Specifické provozní údaje

→ Analytická specifickat

Pro zjištění analytické specifickat Genvinset® HLA B27v5 kitu byly použity ::

- Výsledky získané při interní validaci této soupravy, kdy byla v našich zařízeních analyzována studie s různými vzorky gDNA dříve typizovanými alternativní metodou. Výsledky kitu Genvinset® HLA B27v5 jsou plně v souladu s genotypy získanými jinou technologií. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Genvinset® stavebnice HLA B27v5	
Předchozí metoda	HLA-B*27 pozitivní	HLA-B*27 negativní
HLA-B*27 pozitivní	36	0
HLA-B*27 negativní	0	57

- Zarovnání sekvence primerů a sond s databází genomové DNA. Nebyly hlášeny žádné zkřížené reakce s jinými oblastmi DNA.
- Zarovnání sekvence primerů a sond s databází IPD-IMGT/HLA. Je možné, že intronové oblasti některých méně častých alel ještě nebyly sekvenovány, takže *in silico* zarovnání primerů a sond v těchto oblastech není známo. Byla vygenerována zpráva se seznamem detekovaných alel a netestovaných alel s možným signálem nízké intenzity. Tato zpráva je aktualizována každý rok a je k dispozici na adrese www.bdrdiagnostics.com.

Byl analyzován vliv některých exogenních a endogenních potenciálně interferujících látek na výsledky Genvinset® HLA B27v5 kitu a byly vypočteny hodnoty IC₅₀. Tyto látky byly přidány do gDNA, které byly následně analyzovány pomocí Genvinset® HLA B27v5 kit. Hodnoty IC₅₀ jsou zobrazeny v následující tabulce:

Látka	IC ₅₀
Imunoglobulin G	0,50 g/l
FeCl ₃	0,74 mM
Hemoglobin	1,77 g/l
K ₂ -EDTA	18,47 mM
Citrát	12,5 mM
Ethanol	38,94 % (v/v)
Naproxen	29,83 g/l
Ibuprofen	12,24 g/l

Přítomnost potenciálně inhibičních látek musí být vyloučena během extrakce a purifikace DNA. Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měl být proveden validační test s takovou extrakční metodou.

→ Analytická citlivost

LoD: Test ředění byl proveden pomocí dvou vzorků DNA (HLA-B*27 pozitivní a HLA-B*27 negativní). Testované vstupní hladiny DNA se pohybovaly od 40 ng do 0,016 ng (***) v

trojnásobné ředící sérii. Každá úroveň byla testována ve třech vyhotoveních. Byly získány následující údaje:

- Detekční limit = 1,48 ng (Ct<35)

Horní hranice: Dva vzorky (HLA-B*27 pozitivní a negativní) byly testovány ve dvojitěm ředění v rozmezí od 400 ng do 6,25 ng (**). Výkon testu zůstal přijatelný na všech vstupních úrovních: vhodné sigmoidální amplifikační křivky a genotypizační volání byly přesně provedeny na všech úrovních (s hodnotami Ct<35).

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

→ Diagnostická senzitivita a specifita

V rámci validace této soupravy byly v externích laboratořích analyzovány různé vzorky gDNA, které byly dříve typizovány pomocí genotypizační metodiky odlišné od Genvinset® HLA B27v5 kitu. Byly získány následující výsledky:

		Genvinset® stavebnice HLA B27v5	
		HLA-B*27 pozitivní	HLA-B*27 negativní
Předchozí metoda	HLA-B*27 pozitivní	13	0
	HLA-B*27 negativní	0	41

Existuje 100% shoda ve výsledcích získaných pomocí soupravy Genvinset® HLA B27v5 a genotypů dříve získaných jinou metodou typizace.

→ Přesnost

Studie opakovatelnosti spočívá v měření variability v rámci série prostřednictvím analýzy replik všech druhů vzorků, které lze soupravou měřit (HLA-B*27 pozitivní a negativní vzorky). Každý vzorek byl analyzován dvakrát.

Souprava Genvinset® HLA B27v5 vykazovala 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi běhy, šaržemi, termálními cykly a operátory v reálném čase. Použité vzorky představují celou škálu očekávaných analytů, které lze měřit pomocí soupravy Genvinset® HLA B27 v5, tj. HLA-B*27 pozitivních a negativních vzorků. Tři různé šarže ve třech termocyklerech v reálném čase byly testovány různými operátory.

Souprava Genvinset® HLA B27v5 vykazovala 100% reprodukovatelnost.

→ Pravdivost

Pravdivost analytického postupu soupravy Genvinset® HLA B27v5 je hodnocena porovnáním s referenční metodou. Studie byla vyvinuta jako interní validace činidla, ve které byla prokázána pravost se 100% hodnotou. Viz část "Analytická specifita".

13- Omezení postupu

- Souprava detekuje alely HLA-B*27 obsažené v "HLA alleles detected_GVS-B27v5" na www.bdrdiagnostics.com. Vzhledem k vysoce polymorfní povaze HLA alel se mohou objevit slabé signály z jiných alel podobných sekvencí.
- Mutace nebo polymorfismy v místech nasedání primeru/sondy mohou vést k nedostatečné definici alely. K vyřešení typizace mohou být zapotřebí další technologie.

- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli úkony, které nesplňují tyto indikace, mohou vést ke špatným výsledkům.
- Soupravu nepoužívejte, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození externí krabice nebo jakoukoli jinou událost, která by mohla ovlivnit výkon soupravy.
- Veškeré manipulace s činidly 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. Prošlá činidla zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Termocykler PCR v reálném čase musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán v souladu s pokyny výrobce.
- Data a interpretace výsledků musí být revidována kvalifikovaným personálem.
- Slouží jako pomocný nástroj pro diagnostiku pacientů s podezřením na poruchy spojené s HLA-B*27. Použijte tyto výsledky ve spojení s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených na pacientovi.

14- Průvodce odstraňováním problémů

→ V žádném vzorku není detekován žádný amplifikační signál (ani v kladných kontrolách) nebo je intenzita velmi nízká

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

→ V klinických vzorcích nebyl detekován žádný signál (signál se objeví v pozitivní kontrole)

- Špatná kvalita použité DNA.
 - Zkontrolujte poměr absorbance 260/280 a zlikvidujte nekvalitní vzorky. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Nedostatečná koncentrace DNA.
 - Upravte koncentraci DNA na doporučený rozsah koncentrace.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
- Inhibice amplifikace.
 - Odebírejte plnou krev do zkumavek s EDTA nebo citrátem.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
 - Opakujte test a ujistěte se, že samples byly přidány.

→ Signál detekovaný v negativní kontrole

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

→ Intenzita fluorescence se liší mezi vzorky nebo se objeví abnormální amplifikační křivky

- Nečistoty mimo reakční zkumavku narušují detekci fluorescence.
 - Zařízení důkladně vyčistěte. Zkontrolujte, zda je vnější strana zkumavek/destičky čistá. S destičkou/zkumavkou manipulujte v rukavicích.
- Objem není na dně studny nebo jsou tam nějaké bubliny.
 - Před vložením zkumavek/destiček do termocyklu odstředte
 - Zkontrolujte, zda nejsou nějaké bubliny. Pokud ano, proveďte krátké stočení, abyste je odstranili.
- Destička/zkumavky nebyly správně uzavřeny.
 - Opakujte test a zkontrolujte, zda jsou zkumavky/destičky správně utěsněny.
- Byly použity DNA s různými koncentracemi nebo použitý vzorek obsahuje inhibitor reakce.
 - Opakujte odběr a extrakci DNA.
- Přítomnost polymorfismů nebo mutací ve vazebných místech sondy/primeru.
 - Kontaktujte naše oddělení technické podpory na customersupport@bdrdiagnostics.com
- Přítomnost rušivých látek:
 - Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte test s novým odběrem vzorků a extrakcí DNA.

15- Odkazy

- 1) E. T. Abualrous, J. Sticht a C. Freund, "Proteiny třídy I a třídy II hlavního histokompatibilního komplexu (MHC): dopad polymorfismu na prezentaci antigenu", *Current Opinion in Immunology*, sv. 70, str. 95–104, červen 2021
- 2) R. L. Roberts *et al.*, "Prevalence HLA-B27 v populaci Nového Zélandu: Vliv věku a etnického původu", *Arthritis Research and Therapy*, sv. 15, č. 5, s. 1–7, říjen 2013.
- 3) D. A. Brewerton, F. D. Hart, A. Nicholls, M. Caffrey, D. C. O. James a R. D. Sturrock, "Ankylozující spondylitida a HLA-A27", *Lancet*, sv. 1, č. 7809, str. 904–907, duben 1973.
- 4) W. Zhu *et al.*, "Ankylozující spondylitida: etiologie, patogeneze a léčba", *Bone Research* 2019 7:1, roč. 7, č. 1, s. 1–16, srpen 2019
- 5) S. Bănicioiu-Covei, A. F. Vreju, A. Rosu a P. L. Ciurea, "Význam HLA-B27 v evoluci reaktivní artritidy", *Current Health Sciences Journal*, sv. 45, č. 4, s. 345, 2019
- 6) I. Bentaleb, K. ben Abdelghani, S. Rostom, B. Amine, A. Laatar a R. Bahiri, "Reactive Arthritis: Update", *Current Clinical Microbiology Reports*, sv. 7, č. 4, s. 124–132, prosinec 2020
- 7) P. J. Mease *et al.*, "Léčebné odpovědi u pacientů s axiálním onemocněním psoriatické artritidy podle stavu lidského leukocytárního antigenu-B27: Analýza z registru psoriatické artritidy/spondyloartritidy CorEvitas", *ACR Open Rheumatology*, únor 2022
- 8) R. Srivastava, S. Phatak, A. Yadav, P. Bajpai a A. Aggarwal, "HLA B27 typing in 511 children with juvenile idiopathic arthritis from India", *Rheumatology International*, sv. 36, č. 10, s. 1407–1411, říjen 2016
- 9) S. Vilaiyuk, B. Lerkvaleekul a D. Thammanichanond, "Asociace mezi podtypy HLA-B27 a výsledky u thajských dětí s artritidou související s entezitidou", *Clinical Rheumatology* 2021 41:1, roč. 41, č. 1, s. 203–212, srpen 2021.

10) J. T. Rosenbaum a M. Asquith, "Mikrobiom a akutní přední uveitida spojená s HLA-B27", *Nature Reviews Rheumatology*, sv. 14, č. 12, s. 704–713, prosinec 2018.

11) A. Sharip a J. Kunz, "Porozumění patogenezí spondyloartritidy", *Biomolecules*, sv. 10, č. 10, s. 1–20, říjen 2020.

16- Oznámení kupujícímu












- Tento produkt byl vyvinut pro *diagnostické účely in vitro*.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie, musí uživatel nahlásit závažnou nežádoucí příhodu výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo země pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být prováděno v souladu s místními požadavky pro každou zemi.
- Souhrn bezpečnosti a funkční způsobilosti (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home> a je přístupný uživatelům soupravy.
- Produkty Blackhills Diagnostic Resources, SLU by neměly být dále prodávány, upravovány pro další prodej nebo používány k výrobě jiných komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources, SLU.
- Všechny informace obsažené v tomto dokumentu mohou být změněny bez předchozího upozornění. Blackhills Diagnostic Resources, SLU nepřebírá žádnou odpovědnost za případné chyby v dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době jeho zveřejnění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, SLU v žádném případě nenesou odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo odvozené škody způsobené použitím tohoto dokumentu.
- Zakoupením tohoto produktu udělujete kupujícímu práva na základě určitých patentů společnosti Roche, které se používají pouze k poskytování *diagnostických služeb in vitro*. Neuděluje žádný generický patent ani žádné jiné patenty zaměřené na jakékoli jiné použití než to, které je uvedeno.
- FAM™ a HEX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- FAM™ a HEX™ mohou být kryty jedním nebo více patenty vlastněnými společností 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- Řízení změn

Verze	Popis modifikace
Rev. 01	První verze dokumentu.
Rev. 02	Aktualizace validovaných termocyklerů PCR v reálném čase.
Rev. 03	Přidání loga "CE" a zmínky "Pro <i>diagnostické použití in vitro</i> "
Rev. 04	Modifikace programu teplotních cyklů. Změna objemů pozitivní kontroly, směsi primerů a hlavní směsi. Změna v seznamu validovaných termocyklerů PCR v reálném čase. Vkládání UDI-DI kódů. Nové sekce: Přesnost a Pravdivost. Byly přidány informace týkající se zamýšleného uživatele, zamýšleného pacienta a interferencí. Oprava překlepů a chyb v překladu.
Rev.05	Aktualizace zamýšleného použití. Změna v seznamu validovaných termocyklerů PCR v reálném čase. Aktualizace počtu vzorků analyzovaných při validaci sady. Zahrnutí skutečnosti, že SSP je nahrán do EUDAMED a je přístupný uživatelům.

Rev. 06	Informace o zkoušených interferujících látkách se doplňují v oddílech 12 a 8. Doplnění podrobností o zkřížené reaktivitě v oddíle 12. Soulad s platnými evropskými předpisy v části 18.
Rev. 07	Označení CE spolu s číslem notifikované osoby (NB), které potvrzuje certifikaci podle IVDR. Změny v informacích uvedených v části 8. Přidány nové informace o analytické specifitě v oddíle 12. Změny v počtu vzorků zahrnutých do diagnostické senzitivity a specifity v oddíle 12.
Rev. 08	Změny v LoD. V oddílu 12 byla přidána nová interferenční látka. Zákonný výrobce je uveden na obalu.

18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro		Datum vypršení
	Katalogové číslo		Obsah dostatečný pro testy <n>
	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní limit		Chraňte před slunečním zářením
	Pozitivní kontrola		Prostudujte si elektronický dokument Návod k použití
	Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 o <i>diagnostickém zdravotnickém prostředku in vitro</i>		