



Genvinset®

Lactose Intolerance

NÁVOD K POUŽITÍ

*Kit pro detekci C13910T a G22018A
polymorfismů v genu MCM6*

Pro diagnostické použití in vitro

Rev. 05 / 2024-05-08



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



www.bdrdiagnostics.com

CE 2797

Produktové kódy:

GVS-LAC-24 (24 testů)

GVS-LAC-48 (48 testů)

UDI-DI:

8437016942529

8437016942536

Skladování

od -30°C do -18°C

Genvinset®

Lactose Intolerance

Index

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

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. Budte 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. Manuální bezpečnostní listy (MSDS) jsou zákazníkům k dispozici na vyžádání.

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

2 - Zamýšlené 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+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 pomocí specifické technologie TaqMan® sond.

Pacient odeslaný příslušným zdravotnickým specialistou (gastroenterologem) a s přihlédnutím ke kompatibilitě prezentovaných příznaků – otok nebo distenze břicha, bolest břicha, průjem, nauzea, žaludeční zvuky, zvracení a/nebo jeho rodinná anamnéza (například přímý ascendent s epizodami slučitelnými s intolerancí laktózy) může být předmětem studií polymorfismů v *LCT* genu. 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 tomto dokumentu.

3- Shrnutí a vysvětlení

Laktóza je disacharid nacházející se v mléce savců, který je ve střevě hydrolyzován enzymem laktázou (známým také jako laktáza-filorizin hydroláza nebo LPH) na dva vstřebatelné monosacharidy, glukózu a galaktózu. U většiny dětí je aktivita laktázy na vrcholu během perinatálního období a je nezbytná během kojení. Po několika měsících však jeho aktivita postupně klesá na téměř nedetekovatelnou úroveň v důsledku přirozené regulace exprese laktázy (primární hypolaktázie)¹.

Někteří lidé si však aktivitu laktázy udržují až do dospělosti, a proto lze nalézt dvě skupiny lidí: skupinu "bez laktázy" s nízkou aktivitou laktázy a skupinu "s perzistentní laktázou", která si udržuje schopnost trávit mléko^{2,3}. Frekvence perzistence laktázy se velmi liší v závislosti na regionu: je vysoká v severoevropských populacích (>90 % ve Švédsku a Dánsku), směrem na jih Evropy a na Blízký východ postupně klesá (přibližně 50 % ve Francii, Španělsku a v některých arabských populacích) a je velmi nízká u asijských a afrických populací, i když je běžná u pasteveckých populací (přibližně 1 % v Číně, 5–20 % ve východní Africe)⁴.

Nízká aktivita laktázy v dospělosti vede ke špatnému trávení laktózy, které vyvolává příznaky, jako jsou bolesti a distenze břicha, nadýmání, plynatost a průjem¹. Mnoho lidí s neperzistencí laktázy však může tolerovat malé množství laktózy bez příznaků a toleranci lze získat přizpůsobením střevní flóry pravidelným příjmem laktózy (i když exprese laktázy se nemění)⁵. Proto se u ne všech pacientů s nedostatkem laktázy vyvine intolerance laktózy.

Gen pro laktázu (*LCT*) se nachází na dlouhém raménku chromozomu 2. Dva jednonukleotidové polymorfismy před genem *LCT* byly spojeny s perzistencí laktázy:

LCT-13910 C/T se nachází v intronu 13 genu pro údržbu minichromozomu typu 6 (*MCM6*), dědí se autozomálně dominantním způsobem, přičemž jedna alela postačuje k udělení fenotypu laktázové perzistence. Obecně se uznává, že genotypizace C/T polymorfismu -13910 přesně koreluje s perzistencí laktázy v evropských populacích (kde je pozitivně korelována v ~86%-98% případů), a proto by měla být použita v diagnostice primární hypolaktázie^{6,7}. Tento polymorfismus však není dobrým indikátorem laktázové perzistence u neevropanů, protože pastevecké populace Afriky a Asie, i když vykazují vysokou prevalenci laktázové perzistence, 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 japonské a brazilské populace^{9,10} a ve většině případů se vyskytuje ve spojení s -13910 C/T, s některými výjimkami^{2,9}.

Polymorfismy spojené s laktázovou perzistencí jsou dominantní a aktivita laktázy zůstává s jedinou alelou perzistentní na laktázu¹¹. Byly však hlášeny některé minoritní případy heterozygotních pacientů s polymorfismem -22018 G/A, kteří vykazují nonperzistenci laktázy¹²⁻¹⁴.

Polymorfismus	Genotyp a fenotyp		
	Perzistence laktázy		Neperzistence laktázy (nesnášenlivost laktózy)
-13910 C/T	T/T	C/T	C/C
-22018 G/A	Perzistence laktázy	Souvisí hlavně s perzistencí laktázy ¹²	Neperzistence laktázy (nesnášenlivost laktózy)
	A / A	G/A	G/G

4- Zásady postupu

Test je založen na technologii real-time PCR a hydrolytických sondách. Každý vzorek je analyzován ve dvou reakcích prováděných ve dvou různých jamkách (Reakční C13910T a Reakční G22018A). V každé reakci jsou analyzovány následující polymorfismy:

Reakce	Polymorfismus	FAM kanál	HEX kanál
C13910T	-13910 C/T (rs4988235)	Alela T	Alela C
G22018A	-22018 G/A (rs182549)	Alela A	Alela G

V reakční C13910T je každý vzorek analyzován pomocí:

- páru primerů pro amplifikaci fragmentu genu *MCM6*, kde se nachází C/T polymorfismus -13910.
- hydrolytické sondy specifické pro alelu divokého typu (C na rs4988235) značené na 5' konci fluoroforem HEX a hydrolytické sondy specifické pro mutovanou alelu (T na rs4988235) značená na 5' konci FAM fluoroforem.

V reakční G22018A je každý vzorek analyzován pomocí:

- páru primerů pro amplifikaci fragmentu genu *MCM6*, kde se nachází polymorfismus -22018 G/A.
- hydrolytické sondy specifické pro alelu divokého typu (G na rs182549) značené na 5' konci fluoroforem HEX a hydrolytické sondy specifické pro mutovanou alelu (A na rs182549) značená na 5' konci FAM fluoroforem.

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

Jak PCR reakce pokračuje, aktivita 5' až 3' exonukleázy Taq polymerázy štěpí sondy připojené k jejich komplementární sekvenci, odděluje fluorofor od zhášecí a vytváří fluorescenční signál úměrný množství PCR produktu generovaného a monitorovaného v reálném čase v přístroji pro Real-Time PCR. Tedy:

- v případě homozygotních vzorků divokého typu (wt) pro analyzované varianty (-13910 C/C nebo -22018 G/G) se HEX-značená wt alelově specifická sonda váže na komplementární sekvenci amplifikovaného genu a je pozorováno:
 - fluorescenční signál v HEX kanálu ($\lambda_{\max}$ 556 nm) a
 - žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM ($\lambda_{\max}$ 518 nm).
- v případě vzorků homozygotních mutantů (mut) pro analyzované varianty (-13910 T/T nebo -22018 A/A) se FAM-značená mut alelově specifická sonda váže na svou amplifikovanou komplementární sekvenci. V tomto případě je zjištěno následující:
 - fluorescenční signál v kanálu FAM a
 - žádný signál nebo slabý signál v kanálu HEX.
- v případě heterozygotních vzorků pro analyzované varianty (-13910 C/T nebo -22018 G/A) se obě sondy navážou na amplifikované sekvence DNA generující:
 - fluorescenční signál v kanálu FAM a
 - fluorescenční signál v kanálu HEX.

5- Obsah sady

→ GVS-LAC-24 (24 testů)

- GVS-CT139-PM: 1 injekční lahvička x 96 µl Primer Mix C13910T (PM) - modré víčko
- GVS-CT139-MM: 1 injekční lahvička x 120 µl Master Mix C13910T (MM) - červené víčko
- GVS-GA220-PM: 1 injekční lahvička x 96 µl Primer Mix G22018A (PM) - modré víčko
- GVS-GA220-MM: 1 injekční lahvička x 120 µl Master Mix G22018A (MM) - červené víčko
- GVS-LAC-C1: 1 injekční lahvička x 15 µl Control WT (C1) - zelené víčko
- GVS-LAC-C2: 1 injekční lahvička x 15 µl Control MUT (C2) - zelené víčko s oranžovou nálepkou
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 µl Reaction Blank (RB) - přírodní víčko

→ GVS-LAC-48 (48 testů)

- GVS-CT139-PM: 2 injekční lahvičky x 96 µl Primer Mix C13910T (PM) - modré víčko
- GVS-CT139-MM: 2 lahvičky x 120 µl Master Mix C13910T (MM) - červené víčko
- GVS-GA220-PM: 2 lahvičky x 96 µl Master Mix G22018A (PM) - modré víčko
- GVS-GA220-MM: 2 lahvičky x 120 µl Master Mix G22018A (MM) - červené víčko
- GVS-LAC-C1: 1 injekční lahvička x 15 µl Control WT (C1) - zelené víčko
- GVS-LAC-C2: 1 injekční lahvička x 15 µl Control MUT (C2) - zelené víčko s oranžovou nálepkou
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 µl Reaction 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 jsou stabilní až do data expirace uvedeného na etiketě.

Na lahvičkách soupravy neprovádějte více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení, 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)
- Autoklávané zkumavky o objemu 1,5 ml
- Kompatibilní spotřební materiál pro přístroj pro PCR v reálném čase

Vybavení

- Vírový mixér
- Centrifuga - odstředivka
- Pipety (P200, P100 a P10)

- Přístroj pro PCR v reálném čase s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Validována byla následující zařízení:
 - StepOne™, 7500 a QuantStudio™ 5 Systémy PCR v reálném čase, Applied Biosystems™
 - Systém LightCycler® 96, Roche
 - CFX96 Systém PCR v reálném čase, BioRad
 - Systém DT Lite PCR v reálném čase, technologie DNA
 - Mic qPCR, molekulární systémy
 - qTOWER3 G, Analytik Jena

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 validace těchto systémů.

8- Odběr a příprava vzorku

Vzorky musí být odebrány v souladu s návodem k použití odběrového zařízení (není součástí soupravy) 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.
- Pro každé sezení se doporučuje otestovat reakční slepý pokus (negativní kontrola Reaction Blank) a kontrolu WT (C1) a kontrolu MUT (C2), které jsou součástí sady.

1. Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Vortexujte lahvičky Primer Mix a opatrně promíchejte lahvičky Master Mix. Krátce odstředějte, aby se shromáždil objem na dně zkumavek.
2. Pro každou reakci (C13910T a G22018A) se připraví 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 odstředěte, abyste zajistili, že se veškerý objem usadí na dně zkumavek.

- Napipetujte 9 μl každé směsi do destičky/zkumavek PCR.
- Do každé jamky přidejte 1 μl DNA (doporučená koncentrace mezi 20 a 400 ng/μl), Reaction Blank, Control WT nebo Control MUT. Vzhledem k tomu, že existují dvě reakce, používají se dvě jamky na vzorek.
- Utěsněte destičku/zkumavky pomocí vhodného těsnění, krátce vortexujte 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.
- Umístěte desku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak je popsáno v následující části.

➔ Konfigurace termocykleru

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

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	40	95	00:15	X
		60	01:00	Jednotlivý
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 nástroje real-time PCR a podle návodu k použití výrobce.

Po dokončení běhu vyberte lineární měřítko pro vizualizaci křivek amplifikace. Důrazně se doporučuje zkontrolovat správné chování amplifikačních křivek před tím, než přistoupíte k interpretaci výsledků:

- Amplifikační signál je považován za pozitivní, pokud je pozorován rychlý a pravidelný nárůst hodnot fluorescence (exponenciální 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 ve vzorcích homozygotních pro jednu z alel lze pozorovat slabé nespecifické signály z fluoroforu použitého pro detekci druhé alely. Vzhled těchto signálů neznehodnocuje test.

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



POZOR!

Chcete-li určit hodnotu C_t 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.

Vzorky s anomálními amplifikačními křivkami musí být znovu testovány.

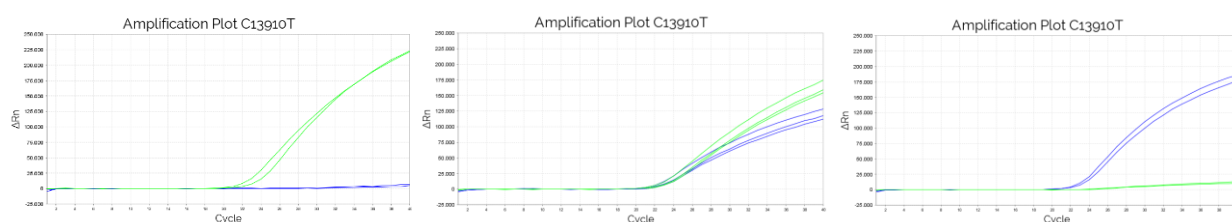
➔ Interpretace výsledků

Po ověření správného tvaru amplifikačních křivek se pro genotypové testy doporučuje interpretace výsledků na základě alelických diskriminačních grafů. Výsledky genotypizace každé reakce jsou získány z FAM a HEX kanálů.

Amplifikační křivka

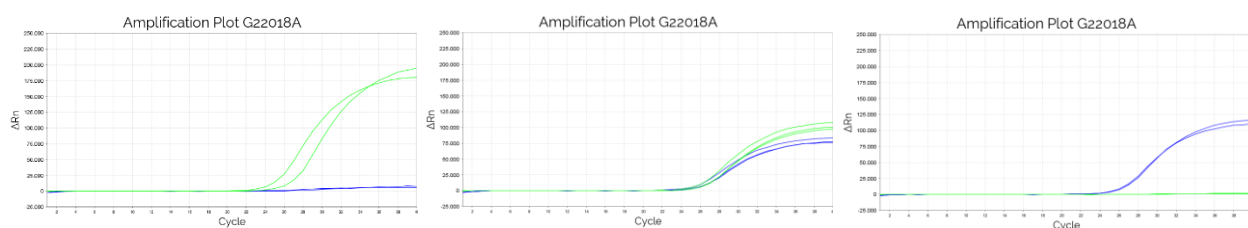
Vyberte "lineární měřítko" a sledujte nepřítomnost/přítomnost vhodných exponenciálních amplifikačních křivek v každém kanálu. Fluorescenční signály z kanálů FAM a HEX jsou vyneseny modře a zeleně.

Reakční C13910T



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

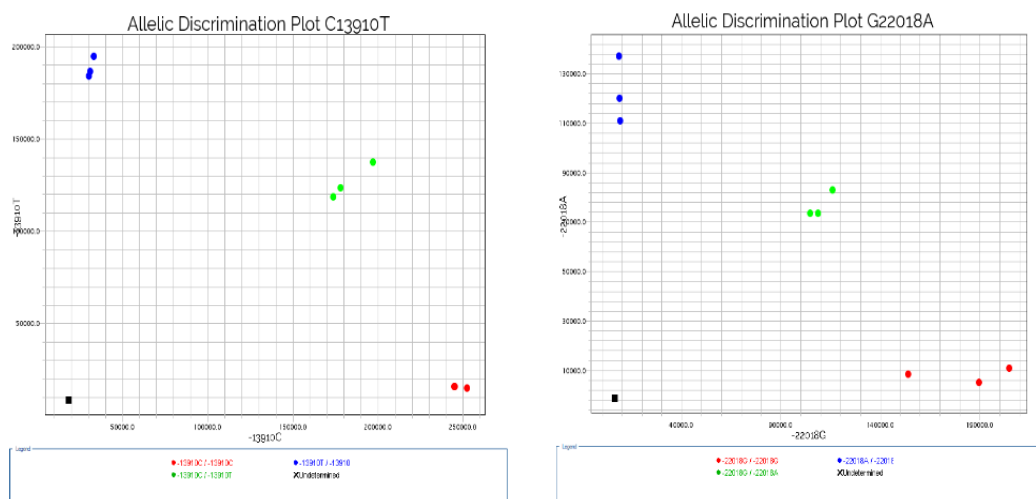
Reakční G22018A



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

Bodový graf

Genotypové výsledky každé reakce jsou získány z FAM a HEX kanálů. Mnoho softwarových programů pro PCR v reálném čase umožňuje automaticky vykreslit data o intenzitě fluorescence jednoho kanálu oproti druhému (alelická diskriminace / genotypizace / rozptylový graf). V tomto typu reprezentace datové body umístěné v blízkosti os X a Y odpovídají homozygotním genotypům pro alelu detekovanou fluoroforem reprezentovaným na odpovídající ose. Body umístěné přibližně uprostřed osy odpovídají heterozygotním genotypům a negativní kontrola (Reaction Blank) by se měla objevit vlevo dole, blízko počátku souřadnic. Tento druh analýzy se důrazně doporučuje k interpretaci výsledků tohoto testu.



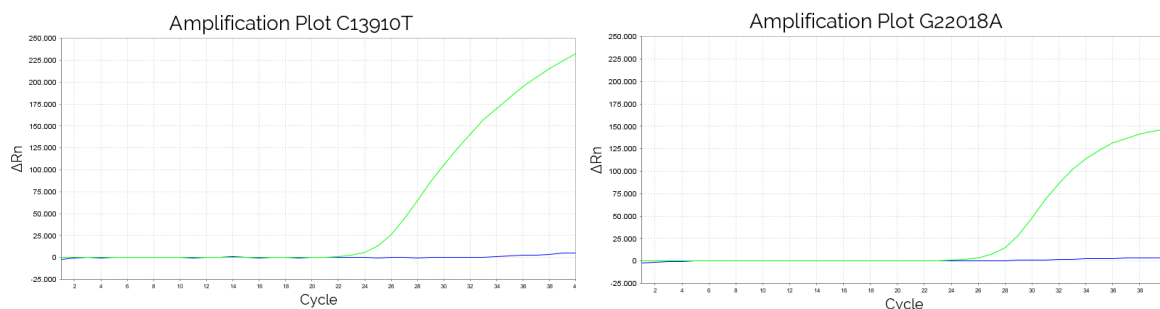
Graf zobrazující homozygotní vzorky wt (červené tečky), homozygotní mut (modré tečky) a heterozygotní (zelené tečky) a reakční blank (černá tečka) pro polymorfismy C13910T (levý graf) a G22018A (pravý graf) pomocí soupravy Genvinset® Lactose Intolerance.

11- Kontrola kvality

Souprava obsahuje reakční slepý vzorek (negativní kontrola), kontrolní WT (C1) a kontrolní MUT (C2), které musí být testovány jak v C13910T, tak v G22018A reakcích v každém testu. Adekvátní chování těchto kontrolních vzorků je zárukou správného provedení reakce.

Výsledky se považují za platné, pokud je v kontrolních vzorcích získán následující amplifikační obrazec:

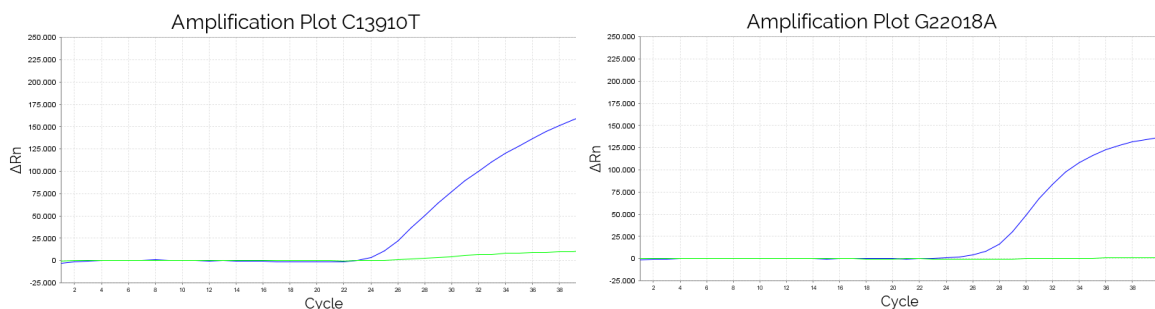
Kontrola WT (C1)



Žádný signál nebo signál nízké intenzity v kanálu FAM (modrá čára) a exponenciální signál s $Ct < 35$ v kanálu HEX (zelená čára)

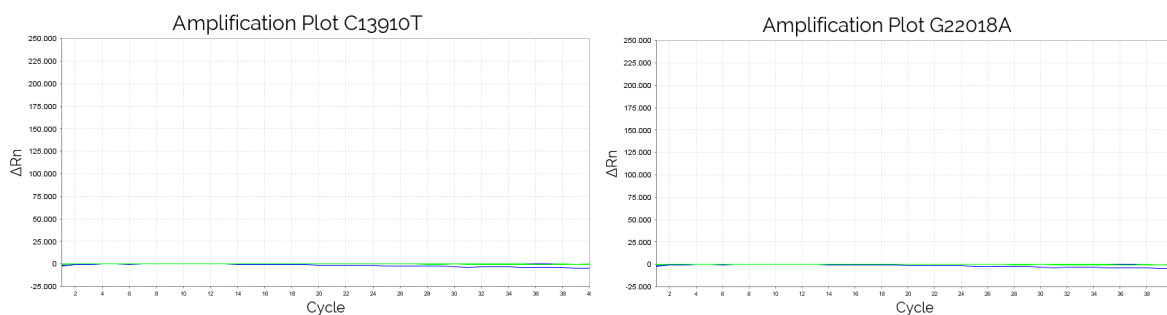
Kontrola MUT (C2)

Reakční blank



Exponenciální zesilovací signál s $C_t < 35$ v kanálu FAM (modrá čára) a žádný signál nebo signál nízké intenzity v kanálu HEX (zelená čára)

Je-li ve výše uvedených kontrolách pozorováno adekvátní chování v obou reakcích, pokračuje se v interpretaci zbývajících vzorků, jak je uvedeno v předchozím oddíle.



Žádný signál v kanálech FAM i HEX nebo zesílení s $C_t > 35$

Výsledky jsou považovány za neplatné a měly by se opakovat, pokud:

- amplifikační křivka s $C_t < 35$ je pozorována v kanálech FAM a/nebo HEX v reakčním slepém čase.
- je pozorován neexponenciální zesilovací signál nebo se objeví zesilovací signál s $C_t > 35$ v jamkách Control WT nebo Control MUT.
- alespoň v jednom z fluoroforů páru FAM/HEX není žádný zesilovací signál. Očekává se zesílení signálu alespoň v jednom z fluoroforů páru FAM/HEX.
- vzorky s exponenciálními amplifikačními křivkami a hodnotami $C_t > 35$ v kanálech FAM a/nebo HEX by měly být považovány za pochybné a měla by být provedena nová analýza z nové extrakce DNA.

12- Specifické provozní údaje

➔ Analytická specifčnost

V rámci stanovení analytické specifity byla na našich pracovištích provedena studie s různými vzorky gDNA, které byly dříve typizovány jinou metodikou genotypizace než Genvinset®. Výsledky soupravy Genvinset® Lactose Intolerance jsou plně v souladu s genotypy dříve získanými jinou technologií. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Genvinset® Lactose Intolerance									
		C13910T					G22018A		
	Genotyp C13910T	C/C	C/T	T/T		Genotyp G22018A	G/G	G/A	A / A
Předchozí metoda	C/C	40	0	0	Předchozí metoda	G/G	38	0	0
	C/T	0	68	0		G/A	0	70	0
	T/T	0	0	24		A / A	0	0	25

Kromě toho bylo provedeno *in-silico* porovnání sekvencí primerů a sond oproti genomové DNA databázi. Sondy se vyrovnávají specificky na -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) pozice v genu *MCM6* (OMIM: 601806). Nebyly hlášeny žádné zkřížené reakce s genomovou DNA.

Přítomnost variant v místech annealing- primeru a/nebo sondy může mít za následek nedostatečnou definici alely. Syntetické DNA plazmidy obsahující následující jednotlivé známé varianty byly testovány třikrát, aby se otestoval jejich účinek na výsledky soupravy Genvinset® Lactose Intolerance: rs4988234, rs536575338, rs41456145, rs4988235 (CàT), rs4988236, rs1347100506, rs867888999, rs541551514, rs1389549421, rs145918931, rs537707375, rs911982026 a rs1269304006. Správné genotypy byly získány v přítomnosti většiny variant s určitými výjimkami (viz bod 13).

Byl analyzován vliv některých exogenních a endogenních potenciálně interferujících látek na výsledky Genvinset® Lactose Intolerance a byly vypočteny hodnoty IC₅₀. Tyto látky byly přidány do gDNA, které byly následně analyzovány pomocí této soupravy. Byly získány následující hodnoty IC₅₀:

Látka	IC ₅₀
Hemoglobin	1,41 g/l
Imunoglobulin G	0,55 g/l
FeCl ₃	0,30 mM
Citrát	12,5 mM
K ₂ -EDTA	11,03 mM
Ethanol	3,24%

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

➔ Analytická citlivost

LoD: Test ředění byl proveden s použitím různých vzorků DNA (homozygotní divoký typ (-13910 C/C a -22018 G/G), heterozygotní (-13910 C/T a -22018 G/A) a homozygotní mutant (-13910 T/T a -22018 A/A) pro polymorfismy C13910T i G22018A). 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 divokých a mutovaných alel = 1,48 ng/μl (Ct<35)

Horní hranice: Vzorky s různými genotypy (C13910 a G22018A homozygotní divoký typ, heterozygotní a homozygotní mutant) byly testovány v trojnásobné sérii ředění v rozmezí od 400 ng do 6,25 ng (**). Výkon testu zůstal přijatelný na všech vstupních úrovních: vhodné exponenciální 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

Různé vzorky gDNA byly analyzovány v různých studiích v externích laboratořích. Tyto vzorky byly dříve typizovány pomocí genotypizační metodiky odlišné od soupravy Genvinset® Lactose Intolerance. Byly získány následující výsledky:

Genvinset® Lactose Intolerance									
		C13910T					G22018A		
	Genotyp C13910T	C/C	C/T	T/T		Genotyp G22018A	G/G	G/A	A / A
Předchozí metoda	C/C	22	0	0	Předchozí metoda	G/G	17	0	0
	C/T	0	19	0		G/A	0	23	0
	T/T	0	0	19		A / A	0	0	16

Existuje 100% shoda ve výsledcích získaných s Genvinset® Lactose Intolerance sadou a genotypizací dříve získanou s jinou komerční sadou.

➔ Přesnost

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

Souprava Genvinset® Lactose Intolerance vykazovala 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi běhy, šaržemi a operátory. Použité vzorky představují celou škálu očekávaných analytů, které lze měřit s Genvinset® Lactose Intolerance, tj. homozygotní divoký typ, homozygotní mutant a heterozygot pro C13910T i G22018A polymorfismy. Tři operátoři provedli test ve třech různých sériích a testovali tři různé šarže reagentů.

Souprava Genvinset® Lactose Intolerance prokázala 100% reprodukovatelnost.

➔ Pravdivost

Pravdivost analytického postupu Genvinset® Lactose Intolerance byla 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 polymorfismy -13910 C/T (rs4988235) a -22018 G/A (rs182549) v genu *MCM6*.
- Mutace nebo polymorfismy v místech nasedání primerů/sond jsou možné a mohou vést k nedostatečné definici alely. K vyřešení typizace mohou být zapotřebí další technologie. C13910T heterozygotní vzorky budou nesprávně typizovány jako vzorky C13910T mutantů v přítomnosti variant rs4988235 (CàT) nebo rs4988236. Z homozygotních vzorků rs4988235 (CàG) *nebudou získány žádné výsledky genotypu*. G22018A heterozygotní vzorky budou nesprávně typizovány jako homozygotní mutace v přítomnosti variant rs145918931 nebo rs537707375. U vzorků homozygotních mutantů se důrazně doporučuje potvrdit jinou metodikou.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli výkony, 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.
- PCR Realk-Time termocykler být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán v souladu s pokyny výrobce.
- Interpretace dat a výsledků by měla být revidována kvalifikovaným personálem.
- Tento produkt je pomocným nástrojem pro diagnostiku pacientů s podezřením na intoleranci laktózy. 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 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 na listu se neshodují s pozicemi, ve kterých byly umístěny v 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 jej po uplynutí doby použitelnosti.
- Uvedená množství každého z činidel nebyla přidána do reakční směsi.
 - Zkontrolujte objemy každé složky přidané 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 u pozitivních kontrol)**

- Špatná kvalita použité DNA.
 - Zkontrolujte poměr absorbance 260/280 a zlikvidujte nekvalitní vzorky. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakovaný odběr vzorků a extrakce 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, jako je EDTA nebo citrát.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
 - Opakujte test a ujistěte se, že vzorky 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.
 - Čistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a vyměňujte spotřební materiál a činidla. Opakujte test.

→ **Intenzita fluorescence se u jednotlivých vzorků liší nebo jsou detekovány abnormální amplifikační křivky**

- Nečistoty mimo reakční zkumavku narušují detekci fluorescence.
 - Zařízení důkladně vyčistěte. Zkontrolujte, zda je vnější strana zkumavek/desky čistá. S deskami/zkumavkami zacházejte v rukavicích.
- Objem není na dně studny nebo jsou tam nějaké bubliny.
 - Před vložením do termocyklu destičky/zkumavky odstředte.
 - Zkontrolujte, zda nejsou bubliny. Pokud ano, proveďte krátkou centrifugaci, abyste je odstranili.
- Mírné snížení objemu v některých jamkách, které je důsledkem variability procesu, způsobuje, že reakce není adekvátně detekována v těch termocyklech, kde se objem PCR shoduje se spodní hranicí přípustného objemového rozsahu.
 - Přidejte 2 µl DNA do PCR jamky místo 1 µl, udržujte doporučenou koncentraci v reakci (mezi 20 a 400 ng).
- Destička/zkumavky nebyly správně utěsněny.
 - Opakujte test a zkontrolujte, zda jsou destičky/zkumavky 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 adrese customersupport@bdrdiagnostics.com.
- Přítomnost interferujících látek.
 - Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte test s novým odběrem vzorků a extrakcí DNA.

15- Odkazy

- 1) Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N. & Fox, M. Nesnášenlivost laktózy u dospělých: biologický mechanismus a dietní management. *Živiny* **7**, 8020 (2015).
- 2) Troelsen, J. T. Hypolaktázie dospělého typu a regulace exprese laktázy. *Biophys Acta* **1723**, 19–32 (2005).
- 3) Rasinperä, H. a další. Transkripční downregulace genu pro laktázu (LCT) v dětství. *Gut* **54**, 1660 (2005).
- 4) Sahi, T. Genetika a epidemiologie hypolaktázie dospělého typu. <http://dx.doi.org/10.3109/00365529409091740> **29**, 7–20 (2009).
- 5) Shaukat, A. a další. Systematický přehled: účinné strategie řízení intolerance laktózy. *Ann Intern Med* **152**, 797–803 (2010).
- 6) Bodlaj, G. a další. Genotypizace polymorfismu laktáza-filorizin-hydroláza –13910 pomocí LightCycler PCR a důsledky pro diagnostiku laktózové intolerance. *Klinická chemie* **52**, 148–151 (2006).
- 7) Mattar, R., do Socorro Monteiro, M., Villares, C. A., dos Santos, A. F. & Carrilho, F. J. Jednonukleotidový polymorfismus C/T(-13910), který se nachází před genem pro laktázu, je spojen s hypolaktázií dospělého typu: validace pro klinickou praxi. *Clin Biochem* **41**, 628–630 (2008).
- 8) Mulcare, C. A. a další. Alela T jednonukleotidového polymorfismu 13,9 kb proti proudu genu pro laktázu (LCT) (C-13,9 kbT) nepředpovídá ani nezpůsobuje fenotyp laktázy u Afričanů. *Americký časopis lidské genetiky* **74**, 1102–1110 (2004).
- 9) Mattar, R., Monteiro, M. do S., da Silva, J. M. K. & Carrilho, F. J. LCT-22018G>Jednonukleotidový polymorfismus je lepším prediktorem hypolaktázie/peristence laktázy dospělého typu u japonských Brazilců než LCT-13910C>T. *Klinika* **65**, 1399 (2010).
- 10) Xu, L. a další. Alela -22018A odpovídá fenotypu peristence laktázy v severočínských populacích. <https://doi.org/10.3109/00365520903414176> **45**, 168–174 (2010).
- 11) Polykat, DM Genetika peristence laktázy a intolerance laktózy. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143820> **37**, 197–219 (2003).
- 12) Enattah, N. S. a další. Identifikace varianty spojené s hypolaktázií dospělého typu. *Nature Genetics* **2002** 30:2 **30**, 233–237 (2002).
- 13) Orr, B., Kaczor, T. & Baker, J. Testování intolerance laktózy. *Učebnice přírodní medicíny* 182–186.e2 (2020)
- 14) Matthews, S. B., Waud, J. P. & Roberts, A. G. Systémová intolerance laktózy: nový pohled na starý problém. *Postgraduální med J* **81**, 167–173 (2005).

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 závažný incident výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušným orgánům 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 výkonu (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný uživatelům soupravy (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).
- 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 nenese 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 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, nepřenositelná práva.
- TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.
- Genvinset® je registrovaná ochranná známka společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.

17- Řízení změn

Verze	Popis modifikace
Rev. 00	První verze
Rev. 01	Přidání značky CE a oddílu "Diagnostická senzitivita a specifita"
Rev. 02	Přidání přístroje CFX96 real-time PCR do seznamu validovaných termocyklerů
Rev. 03	Sekce "Výsledky": oprava grafů
Rev. 04	Oprava překlepů a chyb v překladu. Nové sekce: <i>Přesnost a pravdivost, Informace pro bezpečnost</i> . Byly přidány informace týkající se zamýšleného uživatele, zamýšleného pacienta a interferencí. Změna objemu lahvíček. Změna názvu Control WT a Control MUT. Změny v seznamu validovaných cyklerů PCR v reálném čase. Vkládání UDI-DI kódů.
Zjevení 05	Označení CE spolu s číslem NB, které potvrzuje podle IVDR. Aktualizujte zamýšlené použití. Úvod v části 14 možnosti použití 2 µl vzorku DNA. Další informace jsou uvedeny v oddílech 12 a 13. Změna názvu Control WT a Control MUT. Úprava v seznamu validovaných real-time PCR zařízení. Cílová populace a interference. Zahrnutí skutečnosti, že SSP je nahrán do EUDAMED a je přístupný uživatelům.

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

	Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 o <i>diagnostickém zdravotnickém prostředku</i> in vitro		Prostudujte si elektronický dokument Návod k použití
---	--	---	---