



Genvinset[®]

HLA Behçet v5

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro detekci skupiny alel HLA-
B*51/52 Pro diagnostické použití in vitro*

Rev.05 / 2023-09-13



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



www.bdrdiagnostics.com



Kód produktu:

GVS-B505-24 (24 testů)

GVS-B505-48 (48 testů)

UDI-DI:

8437016942659

8437016942666

Skladování

od -30 °C do -18 °C

Genvinset®

HLA Behçet v5

Obsah

1- Informace o bezpečnosti.....	3
2- Zamýšlené použití	3
3- Shrnutí a vysvětlení na	3
4- Postup a principy.....	4
5- Obsah sady	4
6- Skladování soupravy.....	5
7- Potřebné materiály, které nejsou dodávány	5
8- Odběr vzorků a příprava	6
9- Postup použití	6
10- Výsledky	7
11- Kontrola kvality	9
12- Specifická operační data	10
13- Omezení postupu	12
14- Řešení problémů - průvodce	12
15- Odkazy	13
16- Upozornění zákazníka.....	14
17- Změny ovládání.....	14
18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích.....	15

1- Informace o bezpečnosti

Přečtěte si prosím kompletně tento návod k použití a dodržujte jej při používání této IVD soupravy.

Soupravu IVD mohou používat odborníci, kteří mají velké zkušenosti s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

V případě pochybnosti ohledně popisu metody stanovení se obraťte na výrobce. Kontaktujte na telefonním čísle +34 976 094 603 nebo na e-mailové adrese customersupport@bdrdiagnostics.com.

Souprava IVD má omezenou dobu použitelnosti. Před použitím soupravy se ujistěte, že doba použitelnosti neuplynula. Reagencie ze soupravy by mohly být po uplynutí doby použitelnosti znehodnoceny, což by mohlo zhoršit výsledky. Reagencie s prošlou dobou použitelnosti zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.

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

Tato sada se může při přepravě nebo skladování poškodit. V případě podezření na poškození během přepravy soupravu nepoužívejte. Pečlivě dodržujte podmínky skladování popsané na štítku a v Návodu pro použití (IFU).

Zajistěte, aby bylo s odpadem nakládáno v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s odpadem může vést ke kontaminaci životního prostředí.

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

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

2- Zamýšlené použití

Genvinset® HLA Behçet v5 je poloautomatická diagnostická souprava *in vitro* pro kvalitativní detekci skupiny alel HLA-B*51/52 v genomové DNA extrahované z plné krve, která souvisí s predispozicí k Behçetově chorobě, pomocí PCR v reálném čase s využitím technologie sond TaqMan®.

U pacienta, kterého doporučí příslušný odborný lékař (gastroenterolog), a s přihlédnutím ke kompatibilitě prezentovaných příznaků; několik typů kožních lézí, zánět kloubů (artritida), střevní zánět s průjmem a zánět nervového systému, a to jak centrálního (mozek, mozeček, mozkový kmen, mícha, mozkové blány), tak periferních nervů (ruce a nohy) a/nebo jeho rodinné anamnézy (například přímý příbuzný s diagnózou Behçetovy choroby), může být provedeno stanovení skupiny alel HLA-B5. Výsledky tohoto testu by neměly být jediné, na nichž je založeno terapeutické rozhodnutí, a měly by být použity jako pomůcka při diagnostice spolu s výsledky dalších markerů onemocnění.

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

3- Shrnutí a vysvětlení na

Behçetova choroba (BD) je forma vaskulitidy, která se projevuje vředy v ústech, urogenitálními vředy, uveitidou, zánětem kůže, enterokolitidou a zánětem dalších orgánů ^{1,2}. Navzdory tomu, že se jedná o

celosvětově rozšířené onemocnění, se nejčastěji vyskytuje v oblasti, která se rozprostírá od východní Asie po Středomoří (hedvábná stezka), s nejvyšším výskytem v Turecku^{1,3}. Relativně časté je také v zemích, jako je Japonsko a Írán^{1,2}.

Podle různých vědeckých studií existuje několik genetických faktorů, které částečně určují náchylnost k rozvoji onemocnění^{1,3,4}. Konkrétně je známo, že BD je spojena s antigenem HLA-B5, který patří do hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a je kódován skupinou alel HLA-B*51/52⁴. Antigen HLA-B5 je tedy rizikovým faktorem silně spojeným s BD^{4,5}.

Povaha klinických projevů BD vedla k otázce, zda antigen HLA-B5 může mít modulační účinek na projevy onemocnění. Výsledky různých studií naznačují, že u HLA-B5 pozitivních pacientů se častěji objevují příznaky, které postihují centrální nervový systém nebo orgány, jako je oko^{4,6}, zatímco u HLA-B5 negativních pacientů se častěji objevuje tromboflebitida⁴.

4- Postup a principy

Test je založen na technologii PCR v reálném čase s hydrolyzními sondami. Každý vzorek je analyzován pomocí:

- Páru primerů pro amplifikaci alel HLA-B*51/52 a páru primerů pro amplifikaci fragmentu genu β -globinu (*HBB*), který slouží jako vnitřní pozitivní kontrola (IPC).
- Hydrolyzní sondy pro detekci alel HLA-B*51/52 značená na 5' konci fluoroforem FAM a hydrolyzní sonda pro detekci IPC (β -globin; gen *HBB*) značená na 5' konci fluoroforem HEX. Obě sondy jsou na 3' konci označeny zhasěčem, který inhibuje emisi fluorescence, když je sonda neporušená.

V průběhu PCR reakce štěpí 5' a 3' exonukleázová aktivita Taq polymerázy sondy hybridizované s jejich komplementární sekvencí, čímž dochází k oddělení fluoroforu od zhasědla a vzniku fluorescenčního signálu úměrného množství vzniklého PCR produktu, který je monitorován v reálném čase v přístroji pro PCR v reálném čase. Takto:

- V případě vzorků s jednou nebo dvěma kopiemi alel HLA-B*51/52 (HLA-B*51/52 pozitivní) se sonda značená FAM váže na své komplementární sekvence DNA, sonda značená HEX se váže na své komplementární sekvence DNA v IPC a je pozorována následující situace:
 - Fluorescenční signál v kanálu FAM ($\lambda_{\max}$ 518 nm) a
 - Fluorescenční signál v kanálu HEX ($\lambda_{\max}$ 556 nm).
- V přítomnosti vzorků bez kopií alel HLA-B*51/52 (HLA-B*51/52 negativní) se sonda značená HEX váže na svou komplementární sekvenci DNA v IPC a je pozorována následující situace:
 - Žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM a
 - Fluorescenční signál v kanálu HEX.

5- Obsah sady

→ GVS-B505-24 (24 testů)

- GVS-B5v5-PM: Modrý uzávěr: 1 lahvička x 192 μ l Primer Mix (PM) - modrý uzávěr
- GVS-B5v5-MM: 1 lahvička x 240 μ l Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-B5v5-C+: 1 lahvička x 15 μ l Pozitivní kontrola (C+) - zelený uzávěr
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 μ l Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

➔ GVS-B505-48 (48 testů)

- GVS-B5v5-PM: 2 lahvičky x 192 µl Primer Mix (PM) - modrý uzávěr
- GVS-B5v5-MM: 2 lahvičky x 240 µl Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-B5v5-C+: 1 lahvička x 15 µl Pozitivní kontrola (C+) - zelený uzávěr
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

6- Skladování soupravy

Všechny součásti sady musí být po obdržení skladovány při teplotě od -30 °C do -18 °C. Za těchto podmínek jsou stabilní až do data expirace uvedeného na štítku.

Neprovádějte více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení lahviček soupravy, protože to může snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Pokud se mají testy provádět s malým počtem vzorků, doporučuje se použít alikvotní části činidel, aby se nepřekročil doporučený počet cyklů zmrazení/rozmrazení.

Vzhledem k fotocitlivé povaze Primeru se vyvarujte trvalého vystavení světlu.

7- Potřebné materiály, které nejsou dodávané

Obecné

- Jednorázové rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební materiál

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

Vybavení

- Virový mixér
- Odstředivka
- Mikropipety (P200, P20 a P10)
- Přístroj pro PCR v reálném čase s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Byly ověřeny následující přístroje:
 - 7500, QuantStudio™ 5 a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems™.
 - Systémy LightCycler® 96 a LightCycler® 480, Roche.
 - Rotor-Gene® Q, Qiagen®.
 - DT Lite Real-Time PCR System, DNA-Technology.
 - qTOWER3 Analytik Jena.
 - CFX 96 Real-Time PCR, BioRad.
 - Mic qPCR, Molecular Systems.

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

8- Odběr vzorků a příprava

Vzorky musí být odebírány v souladu s návodem k použití zařízení pro odběr vzorků (není součástí soupravy) a podle národních a mezinárodních pokynů.

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

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

POZOR!

Se všemi biologickými a krevními vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními. Při manipulaci s nimi dodržujte odpovídající základní a univerzální bezpečnostní opatření.

9- Postup použití

→ Nastavení PCR

POZOR!

- Definujte pracovní prostory před a po provedení PCR, které by měly být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Připravte PCR v oblasti před PCR.
- Používejte laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Pracujte na ledu nebo nad chladným blokem. Zkraťte dobu mezi přípravou a zahájením testu na minimum.
- Pro každý test se doporučuje testovat negativní kontrolu (Reaction Blank) a pozitivní kontrolu (C+) dodanou se sadou.

Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Vortexujte lahvičku se směsí primerů a pečlivě promíchejte lahvičku s master mixem. Krátce odstředte, abyste zachytili objem na dně zkumavek.

Připravte reakční směs pro n+1 vzorků s použitím množství uvedených v následující tabulce:

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

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

Pipetujte 18 μl této směsi do PCR destiček/zkumavek.

Do každé jamky přidejte 2 μl DNA (doporučená koncentrace mezi 10 a 200 ng/μl), slepou reakci nebo pozitivní kontrolu (C+).

Uzavřete destičku/zkumavku pomocí vhodného těsnícího prostředku, krátce vortexujte a krátce centrifugujte, aby se veškerý objem usadil na dně jamky. Pokud je to možné, ujistěte se, že v jamkách nejsou žádné bubliny.

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

➔ Konfigurace termocykleru

1. Nastavte následující čtecí kanály:
 - Kanál FAM pro detekci sond značených FAM.
 - Kanál HEX/VIC pro detekci sond s označením HEX.
2. Nastavte příslušný profil amplifikace* a spusťte běh:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	40	95	00:10	X
		66	00:30 (*)	Single
Chlazení	1	15	∞	X

(*) U termálních cyklérů Rotor-Gene® (Qiagen) a DT-Lite (DNA-Technology) pro PCR v reálném čase nastavte následující amplifikační program:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	40	95	00:10	X
		66	00:25	Single
Chlazení	1	15	∞	X

➔ Likvidace

S odpadními produkty se nakládá v souladu s místními předpisy.

10- Výsledky

➔ Vizualizace výsledků

Analýza výsledků se provádí pomocí specifického softwaru použitého přístroje pro PCR v reálném čase a podle pokynů výrobce.

Po dokončení běhu vyberte lineární stupnici pro vizualizaci amplifikačních křivek. Před pokračováním v interpretaci 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 amplifikace) s $Ct < 35$.
- Slabý fluorescenční, lineární nebo exponenciální signál na pozadí s $Ct > 35$ by neměl být považován za pozitivní amplifikaci. Tento test umožňuje detekci některých alel zahrnutých do skupiny vysoce polymorfních alel HLA, mezi nimiž byly popsány malé rozdíly v jejich sekvencích. Proto lze v kanálu FAM pozorovat slabé nespecifické signály od jiných sekvencně podobných, ale nedetekovaných alel HLA. Výskyt těchto signálů neznamená neplatnost testu.

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

Vzorky s anomálními amplifikačními křivkami musí být znovu testovány.



POZOR!

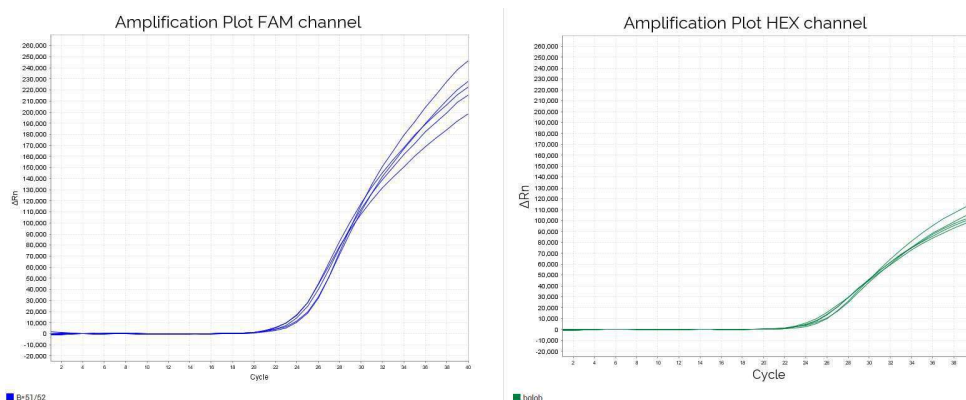
Chcete-li určit hodnotu Ct v každém kanálu, nastavte prahovou čáru následujícím způsobem:

Zvolte lineární zobrazení a vyberte oblast, kde je fluorescenční signál stabilní před exponenciálním zesílením. Umístěte prahovou čáru nad tento signál pozadí tak, aby procházela blízko inflexního bodu amplifikační křivky. Tato čára by měla mírně přesahovat hodnotu nejvyšší fluorescence získané s negativními vzorky pro alelu detekovanou v tomto kanálu.

→ Interpretace výsledků

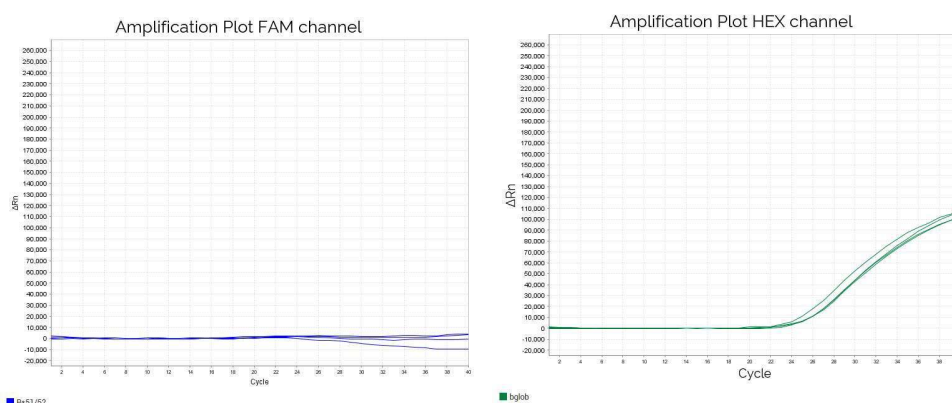
Výsledky získané s touto sadou je třeba interpretovat pomocí vizualizace amplifikačních křivek v kanálech FAM i HEX. Zvolte "lineární stupnici" a určete nepřítomnost/přítomnost sigmoidální amplifikace v každém kanálu.

HLA-B*51/52 pozitivní vzorky



Exponenciální amplifikační křivky s $Ct < 35$ v kanálech FAM a HEX

HLA-B*51/52 negativní vzorky



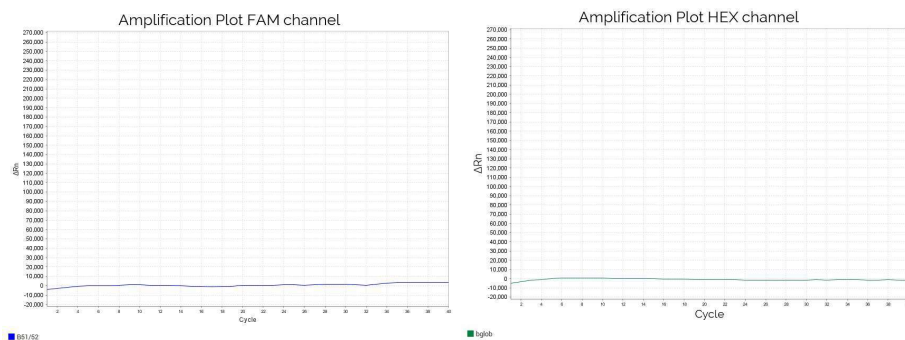
Žádný signál nebo signál s nízkou intenzitou v kanálu FAM a exponenciální zesílení v kanálu HEX ($Ct < 35$).

11- Kontrola kvality

Tato sada obsahuje slepou reakci a pozitivní kontrolu (C+), které je třeba testovat v každém testu. Odpovídající chování kontrolních vzorků je zárukou správného fungování soupravy.

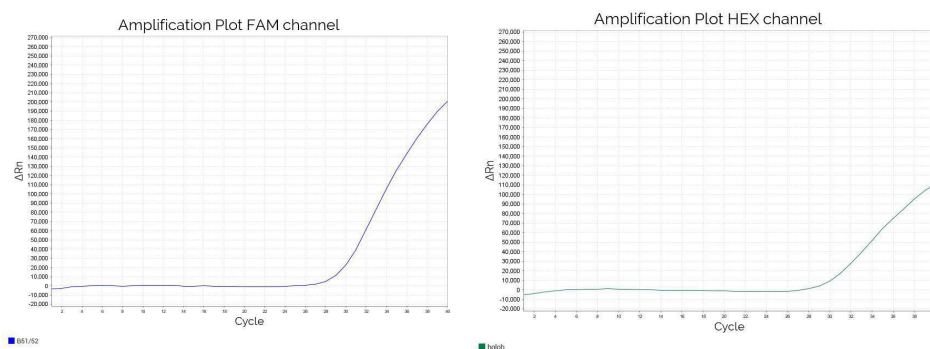
Test je považován za platný, pokud je u kontrolních vzorků pozorován následující amplifikační vzorec:

Rakční Blank



Žádný signál nebo signál s nízkou intenzitou ($C_t > 35$) v kanálech FAM i HEX.

Pozitivní kontrola (C+)



Exponenciální amplifikace s hodnotou $C_t < 35$ v kanálech FAM i HEX.

IPC se detekuje v kanálu HEX a používá se jako vnitřní pozitivní kontrola pro každý analyzovaný vzorek. Proto je výsledek vzorku považován za platný, pokud je v kanálu HEX alespoň sigmoidní amplifikace s $C_t < 35$.

Pokud je u výše uvedených kontrol zjištěno odpovídající chování, pokračujte v interpretaci vzorků, jak je uvedeno v předchozím oddíle.

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

- Amplifikační křivka s $C_t < 35$ je pozorována v kanálu FAM a/nebo HEX v Reakčním Blanku.
- V pozitivní kontrole je pozorován neexponenciální amplifikační signál nebo se objeví amplifikační signál s $C_t > 35$.
- Vzorky DNA s amplifikačními křivkami s $C_t > 35$ v kanálech FAM a/nebo HEX musí být považovány za pochybné a měly by být znovu testovány provedením nové extrakce DNA

12- Specifická operační data

→ Analytická specifita

Analytická specifita soupravy Genvinset® HLA Behçet v5 byla analyzována na základě:

- Výsledků získaných při interní validaci této soupravy, kdy byly v našich zařízeních analyzovány studie s různými vzorky gDNA, které byly dříve typizovány alternativní metodou. Výsledky soupravy Genvinset® HLA Behçet v5 se plně shodují s výsledky genotypizace získanými alternativní metodou. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Předchozí metoda	Souprava Genvinset® HLA Behçet v5	
	B1*51/52 pozitivní	B1*51/52 negativní
HLA-B*51/52 pozitivní	35	0
HLA-B*51/52 negativní	0	92

- Zarovnání sekvence primerů a sond s databází genomové DNA. Nebyly zaznamenány žádné jevy zkřížené reakce s jinými oblastmi DNA.
- Zarovnání sekvence primerů a sond s databází IPD-IMGT/HLA. Je možné, že intronické oblasti některých nefrekventovaných alel nebyly dosud sekvenovány, takže zarovnání in silico primerů a sond v těchto oblastech není známo. Vytvoří se zpráva se seznamem zjištěných alel a bez testovaných alel s možnou nízkou intenzitou signálu. Tato zpráva je každoročně aktualizována a lze ji nalézt na adrese www.bdrdiagnostics.com.

Byl analyzován vliv některých exogenních a endogenních potenciálně interferujících látek na výsledky soupravy Genvinset® HLA Behçet v5 a byly vypočteny hodnoty IC₅₀. Tyto látky byly přidány ke gDNA, které byly následně analyzovány soupravou Genvinset® HLA Behçet v5. Hodnoty IC₅₀ jsou zobrazeny v následující tabulce:

Interference	IC ₅₀
Hemoglobin	6,10 g/l
Imunoglobulin G	2,52 g/l
FeCl ₃	0,036 mM
Dakortin	0,7 g/l
Citrát	5,2mM
K ₂ -EDTA	19,10 mM
Ethanol	12,37%

Přítomnost potenciálně inhibičních látek musí být při extrakci DNA a purifikačních protokolech eliminována. Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška s takovou extrakční metodou.

→ Analytická citlivost

LoD: Byl proveden diluční test s použitím dvou vzorků DNA (HLA-B*51/52 pozitivní a HLA-B*51/52 negativní). Testované vstupní hladiny DNA se pohybovaly od 40 ng do 0,016 ng (**) v trojnásobné ředící sérii. Každá úroveň byla testována ve třech opakováních. Byly získány následující údaje:

- Mez detekce = 1,48 ng (Ct<35)

Horní mez: Dva vzorky s různými genotypy (HLA-B*51/52 pozitivní a negativní) byly vyšetřeny v sérii dvojnásobného ředění v rozmezí 800 ng až 6,25 ng (**). Výkonnost testu zůstala přijatelná při všech vstupních úrovních: vhodné sigmoidální amplifikační křivky a genotypové volání bylo přesně provedeno při všech úrovních (s hodnotami Ct<35).

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

→ Diagnostická citlivost a specifičnost

Různé vzorky DNA byly analyzovány v různých laboratořích. Tyto vzorky byly dříve typizovány pomocí genotypové metodiky odlišné od Genvinset®. Byly získány následující výsledky:

		Souprava Genvinset® HLA Behçet v5	
		HLA-B*51/52 Pozitivní	HLA-B*51/52 Negativní
Předchozí metoda	HLA-B*51/52 Pozitivní	22	0
	HLA-B*51/52 Negativní	0	72

Výsledky získané pomocí soupravy Genvinset® HLA Behçet v5 a genotypy dříve získané jinou typizační metodou se shodují na 100 %.

→ Opakovatelnost

Studie opakovatelnosti spočívají v měření variability v rámci série prostřednictvím analýzy replik všech druhů vzorků, které lze soupravou měřit (HLA-B*51/52 pozitivní a negativní vzorky). Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních.

Souprava Genvinset® HLA Behçet v5 vykazovala 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi jednotlivými sériemi, šaržemi a termálními cykly v reálném čase. Použité vzorky představují celý rozsah očekávaných analytů, které lze měřit pomocí soupravy Genvinset® HLA Behçet v5, tj. pozitivní a negativní vzorky HLA-B*51/52. Tři různé šarže ve třech termálních cyklech reálného času byly testovány různými operátory.

Souprava Genvinset® HLA Behçet v5 vykazovala 100% reprodukovatelnost.

→ Pravdivost

Správnost analytického postupu soupravy Genvinset® HLA Behçet v5 se posuzuje porovnáním s referenční metodou. Studie byla vypracována jako interní validace činidla, v níž byla prokázána správnost se 100% hodnotou. Viz oddíl "Analytická specifičnost".

13- Omezení postupu

- Souprava detekuje alely HLA B*51/52 zahrnuté v "HLA alleles detected_GVS-B505" na adrese www.bdrdiagnostics.com. Vzhledem k vysoce polymorfní povaze alel HLA se mohou objevit slabé signály z jiných alel podobných sekvencí.
- Mutace nebo polymorfismy v místech žíhání primerů/sond mohou mít za následek nedostatečnou definici alel. K vyřešení typizace může být nutné použít jiné technologie.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli výkony, které těmto pokynům neodpovídají, mohou vést ke špatným výsledkům.
- Nepoužívejte soupravu, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnějšího boxu nebo jakýkoli jiný případ, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Veškerá manipulace s činidly Genvinset® musí být prováděna v souladu se správnou laboratorní praxí a přizpůsobena místním předpisům.
- Nemíchejte komponenty z jiných sad nebo čísel šarží.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti. Prošlé reagencie zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Termocykler pro PCR v reálném čase musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán v souladu s pokyny výrobce.
- Vzhledem ke složitosti typizace HLA musí údaje a interpretaci výsledků revidovat kvalifikovaný personál.
- Slouží jako pomocný nástroj pro diagnostiku pacientů s podezřením na poruchy spojené s HLA-B*51/52. Tyto výsledky používejte ve spojení s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených u pacienta.

14- Řešení problémů - průvodce

→ V žádném vzorku není detekován amplifikační signál (ani v pozitivních kontrolách) nebo je jeho 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 byl přístroj správně naprogramován.
- Pozice vzorků a kontrol uvedených při přípravě testu neodpovídají pozicím, ve kterých byly umístěny v přístroji.
 - Správně přiřadte polohu vzorků.
- Činidlo nefunguje správně.
 - Zajistěte, aby byla souprava skladována při vhodné teplotě (mezi -30°C a -18°C) a chráněna před světlem. Vyhněte se zbytečným cyklům zmrazování a rozmrazování. Nepoužívejte ji po uplynutí doby použitelnosti.
- Uvedená množství jednotlivých činidel nebyla do reakční směsi přidána.
 - Zkontrolujte objem jednotlivých složek přidaných do směsi.
- Použitý spotřební materiál není kompatibilní s používaným zařízením.
 - Ujistěte se, že byl použit správný spotřební materiál (kompatibilní s použitým PCR přístrojem).

→ V klinických vzorcích není detekován žádný signál (signál se objevuje v pozitivní kontrole).

- Špatná kvalita použité DNA.
 - Zkontrolujte poměr absorbance 260/280 a vyřadte nekvalitní vzorky. Vyvarujte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.

- Nedostatečná koncentrace DNA.
 - Upravte koncentraci DNA na doporučené rozmezí.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
- Inhibice amplifikace.
 - Odeberte plnou krev do zkumavek s EDTA nebo citrátem.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
 - Opakujte test a ujistěte se, že byly přidány všechny vzorky.

➔ Signál detekovaný v negativní kontrole

- Chyba při pipetování.
 - Při každém přidání DNA do jamky vyměňte špičku pipety.
 - Zkontrolujte, zda vzorek přidáný do jamky odpovídá tomu, co je napsáno v pracovním listu.
- Kontaminace injekční lahvičky Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank.
 - Test opakujte s čerstvými alikvoty.
- Prostor pro přípravu PCR je kontaminovaný.
 - Čistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a vyměňujte spotřební materiál a reagenty. Zopakujte analýzu.

➔ Intenzita fluorescence se u jednotlivých vzorků liší nebo se liší abnormální amplifikační křivky.

- Znečištění vně reakční zkumavky ruší detekci fluorescence.
 - Zařízení důkladně vyčistěte. Zkontrolujte, zda je vnější strana zkumavek/desek čistá. S destičkou/zkumavkou manipulujte v rukavicích.
- Objem není na dně jamky nebo se v něm vyskytují bubliny.
 - Před vložením do termokycleru zkumavky/plotny odstředte.
 - Zkontrolujte, zda se neobjevují bubliny. Pokud ano, krátkým otáčením je odstraňte.
- Deska/trubky nebyly správně uzavřeny.
 - Zopakujte test a zkontrolujte, zda byly zkumavky/plotny správně uzavřeny.
- Byly použity DNA o různých koncentracích nebo použitý vzorek obsahuje inhibitor reakce.
 - Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Přítomnost polymorfismů nebo mutací na vazebných místech sondy/primeru.
 - Kontaktujte naše oddělení technické podpory na adrese customersupport@bdrdiagnostics.com.
- Přítomnost rušivých látek:
 - Vyhnete se přítomnosti inhibitorů. Test opakujte s novým odběrem vzorků a extrakcí DNA.

15- Odkazy

- 1) Nair, J. R. & Moots, R. J. Behcetova choroba. *Clinical Medicine* **17**, 71 (2017).
- 2) Bulur, I. & Onder, M. Behcetova choroba: M.: Nové aspekty. *Clin Dermatol* **35**, 421-434 (2017).
- 3) Yurdakul, S. Epidemiologie Behcetova syndromu a regionální rozdíly v projevech onemocnění. *Behçetův syndrom* 21-35 (2019) doi:10.1007/978-3-030-24131-5_3.
- 4) Maldini, C., LaValley, M. P., Cheminant, M., de menthon, M. & Mahr, A. Vztah genotypu HLA-B51 nebo B5 ke klinickým charakteristikám Behçetovy choroby: systematický přehled a metaanalýza observačních studií. *Rheumatology* **51**, 887-900 (2012).
- 5) de Menthon, M., LaValley, M. P., Maldini, C., Guillevin, L. & Mahr, A. HLA-B51/B5 a riziko Behçetovy choroby: Systematický přehled a metaanalýza genetických asociačních studií případů a kontrol. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **61**, 1287-1296 (2009).
- 6) Shenavandeh, S., Jahanshahi, K. A., Aflaki, E. & Tavassoli, A. Frekvence HLA-B5, HLA-B51 a HLA-B27 u pacientů s idiopatickou uveitidou a Behçetovou chorobou: studie případů a kontrol. *Reumatologia/Rheumatology* **56**, 67- 72 (2018).

16- Upozornění zákazníka

- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely *in vitro*.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie, musí uživatel v případě, že dojde k závažné události týkající se použití soupravy, tuto skutečnost nahlásit výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo země pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být provedeno v souladu s místními požadavky pro každou zemi.
- Souhrn bezpečnosti a výkonnosti (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný uživatelům soupravy (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).
- Produkty společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. by neměly být dále prodávány, upravovány za účelem dalšího prodeje nebo používány k výrobě jiných komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.
- Veškeré informace obsažené v tomto dokumentu mohou doznat změn bez předchozího upozornění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. nenese žádnou odpovědnost za případné chyby v dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době jeho zveřejnění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. v žádném případě nenese odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo odvozené škody vzniklé v důsledku použití tohoto dokumentu.
- Nákupem tohoto produktu získává kupující práva na některé patenty 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 kromě uvedeného.
- FAM™ a HEX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- Na FAM™ a HEX™ se může vztahovat jeden nebo více patentů společnosti Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto produktu zahrnuje omezená, nepřenositelná práva.
- Taqman® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.
- Genvinset® je ochranná známka společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.

17- Změny ovládání

Verze	Popis úpravy
Rev. 00	První verze dokumentu.
Rev. 01	Výrazové a pravopisné opravy
Rev. 02	Aktualizace validovaných termocyklerů qPCR
Rev. 03	Přidání loga "CE" a poznámky "Pro diagnostické použití <i>in vitro</i> ".
Rev. 04	Úprava programu termocykleru. Změna objemů pozitivní kontroly, směsí primerů a master mixu uvedených v popiscích. Změna složení směsí primerů a masterů. Změna v seznamu validovaných termocyklérů pro PCR v reálném čase. Aktualizace vzorků analyzovaných při validaci soupravy. Nové oddíly: <i>Přesnost a pravdivost</i> . Byly přidány informace týkající se určeného uživatele, určeného pacienta a interferencí. Oprava překlepů a chyb v překladu. Zařazení informací o SSP do databáze EUDAMED a její zpřístupnění všem uživatelům. Vložení Kódy UDI-DI

Rev.05	Označení CE doplněné číslem NB, které osvědčuje podle IVDR. Aktualizujte zamýšlené použití. Změna v seznamu validovaných termálních cyklů pro PCR v reálném čase. Změny v části "Analytická citlivost". sekce.
Rev.06	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 <i>in vitro</i>		Datum expirace
	Katalogové číslo		Obsah dostačující pro <n> testů
	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní limit		Chraňte před slunečním zářením
	Pozitivní kontrola		Nahlédněte do elektronického návodu k použití
	Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 o <i>in vitro</i> testech. diagnostický zdravotnický prostředek		