



EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4)

REF

90048-RT (pro 50 stanovení)

Složení soupravy:

5 x 180 µl CELI-DQ2 Mix
5 x 180 µl CELI-DQ8 Mix
5 x 180 µl CELI-DR4 Mix
2 x 50 µl PC CELI
Návod k použití

Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

Účel použití

Souprava EliGene® Coeliac RT slouží ke genotypizaci HLA-DQ2, HLA-DQ8 a HLA-DR4 genů z izolované DNA.

Princip metody

Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR. Pro detekci alel genů pro DQ2, DQ8 a DR4 a interní kontroly jsou použity primery a značené sondy (FAM a JOE).

Obecný úvod

Celiakie patří mezi jedno z nejčastějších entero-patogenních onemocnění a je charakterizovaná celoživotní přecitlivělostí k lepku, proteinu obsaženém v pšenici, žitě, ovsu a ječmeni. Celiakie nepatří mezi alergická onemocnění, ale je charakterizovaná intolerancí ke gliadinu tvořícím část lepku. Imunologická nesnášenlivost k lepku vede v raném dětství ke chronické zánětlivé odpovědi u sliznice tenkého střeva s následnou špatnou absorpcí vyznačující se chronickým průjmem, tukovitou stolicí a špatným růstem. Celá řada dospělých pacientů poté může pociťovat jiné atypické příznaky jako nadýmání, hubnutí, únavu, problémy s pokožkou a klouby nebo migrény. Naopak celá řada lidí nemusí pociťovat vůbec žádné příznaky. Neléčená celiakie poté zvyšuje riziko NHL (non-Hodgkinovského lymfomu) a zřejmě i riziko rakoviny tenkého střeva.

Do dnešní doby byla celiakie vnímána jako relativně vzácné onemocnění s mírou prevalence 1:1000 až 1:4000. Avšak nově dostupnost sérologických testů vedla k pozorování, že celiakie je daleko častější onemocnění, než bylo dříve předpokládáno, postihující v Evropě zhruba 1 ze 100–400 osob. Většina diagnostikovaných pacientů vykazovala minimální klinické příznaky. Poslední výsledky navíc ukazují na silnou genetickou vazbu ve spojení s rozvojem celiakie.

Celiakie je multifaktoriální onemocnění asociované s alelami HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) nebo DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302), která je asociována v haplotypu s alelou HLA-DR4 (DRB1*04). HLA DQ2 alela je exprimována u většiny osob trpících celiakií (> 90 %), DQ8 alela poté asi u 8 %. **Exprese zmíněných alel je nezbytná, ne však dostatečná, k propuknutí celiakie.** V současné době se předpokládá pouze asi 50% vliv genetické složky na vznik celiakie. U osob trpících celiakií je výskyt HLA-DQ2 alely asi 95 %, zatímco u běžné populace je výskyt této alely pouze 20 %. Z malé skupiny osob trpících celiakií a negativních pro HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) alelu, je drtivá většina pozitivní na HLA-DQ8 alelu. **Z tohoto pohledu je absence zmíněných alel velmi dobře využitelná pro vyloučení celiakie.**



Souprava EliGene[®] Coeliac RT detekuje alely HLA-DQ2 (DQA1*05, DQB1*02), HLA-DQ8 (DQA1*03, DQB1*0302) a HLA-DR4 (DRB1*04). Jako vnitřní kontrola je použit lidský gen SYPL2 (synaptophysin-like 2).

Odběr vzorku, zpracování a uchovávání

Klinický materiál:	Doporučená izolace DNA:
Krev	Manuální: EliGene Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) Automatická: ZEPHYRUS Magneto (ELISABETH PHARMACON) Prepito NA Body Fluid Kit (Chemagen-PerkinElmer)
Stěry	Manuální: EliGene Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) Automatická: ZEPHYRUS Magneto (ELISABETH PHARMACON) Prepito NA Body Fluid Kit (Chemagen-PerkinElmer)

Krev (odebírejte do zkumavek s EDTA):

Manuální izolace:

Ke vzorku přidejte 10 µl Proteinázy K a poté pokračujte dle standardního izolačního protokolu kitu EliGene Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) pro izolaci DNA z nesrážlivé krve. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší než jeden týden zamrazte na -20 °C.

Automatická izolace:

Izolujte DNA ze vzorku pomocí MAGNETO **BodyFluid DNA/RNA isolation kitu** dle protokolu pro vzorky krve s elucí do 50 µl elučního pufru.

Bukální stěry:

Tyto vzorky odebírejte dle standardního protokolu do sterilních zkumavek. Vzorky je nutno uchovávat a přepravovat při 4 °C. Pro diagnostické účely je nezbytné vzorek zpracovat v den odběru.

Manuální izolace:

1. Do 2,0 ml zkumavky napipetujte 400 µl roztoku MI3 a 20 µl Proteinázy K.
2. Stěrovku vložte do připravené 2 ml zkumavky a sterilními nůžkami odstříhnete štěteček – stříhejte zhruba 0,5 cm nad štětečkem. Zkumavku uzavřete.
3. Inkubujte 20 min při 56 °C v termotřepačce při 1000 otáčkách. Poté zkumavku krátce stočte.
4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a k lyzátu přidejte 330 µl roztoku MI4. Jemně zvortexujeme a stočte.
5. Poté pokračujte dle standardního izolačního protokolu kitu EliGene Urine Isolation Kit. Izolovanou DNA použijte ihned k detekci nebo skladujte několik hodin až jeden týden při 4 °C. Pro skladování po dobu delší, než jeden týden zamrazte na -20 °C.

Automatická izolace:

1. Do 2,0 ml zkumavky napipetujte 450 µl lyzačního pufru, 200 µl PCR vody a 10 µl Proteinázy K.
2. Stěrovku vložte do připravené 2 ml zkumavky a sterilními nůžkami odstříhnete štěteček – stříhejte zhruba 0,5 cm nad štětečkem. Zkumavku uzavřete.
3. Inkubujte 20 min při 56 °C v termotřepačce při 1000 otáčkách. Poté zkumavku krátce stočte.



4. Sterilní pinzetou vyjměte štěteček a zkumavku krátce stočte.
5. Napipetujte celý objem vzorku do pozice H na Deep well destičce z Magneto Body fluid kitu.
6. Izolujte DNA ze vzorku pomocí Magneto Body fluid kitu dle protokolu pro vzorky plasmy s elucí do 50 µl elučního pufru.

Doporučená koncentrace analyzované DNA je 10–50 ng/µl. Nedoporučuje se testovat vzorky o koncentraci nižší než 5 ng/µl.

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Sterilní automatická pipeta 5–20 µl a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- Sterilní stojánek pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro Real Time – souprava je optimalizována pro přístroje LightCycler® 480 (Roche), QuantStudio 3 a 5 Real-Time PCR system (ThermoFisher Scientific), ABI7500FAST (Applied Biosystems), Rotor-Gene Q (Qiagen) a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad). qPCR využívá detekci pomocí TaqMan technologie (FAM a JOE značené sondy) a může být použita i na dalších real-time PCR termocyklérech umožňující detekci v kanálech FAM a HEX.
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodné pro daný Real Time přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

Konfigurace RealTime PCR přístroje

- Pro detekci DQA1*05, DRB1*04 a DQB1*0302 alel je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci DQA1*03, DQB1*02 a SYPL2 (interní kontrola) alel je použita sonda značená JOE barvou (exc. 520 nm – emise 548 nm)
- Reakční Mix obsahuje pasivní referenční barvu High-ROX pro normalizaci signálu

LightCycler® 480 (Roche):

Pro reakci používejte pouze bílé destičky. Použití průhledných destiček může vést k poklesu citlivosti kitu. Nepoužívejte destičky opakovaně; při manipulaci s destičkou může dojít ke kontaminaci laboratoře PCR produkty.

V možnosti Detection format zvolte “Dual Color Hydrolysis probe”.

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Analysis mode “None”, 1 Cycle

95°C	3 min	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode “None”
------	-------	---------------------	-------------------------

Step 2 - Analysis mode “Quantification”, 40 Cycles

95°C	15 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode “None”
60°C	40 s	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode “Single”

Step 3 - Analysis mode “None”, 1 Cycle

40°C	20 s	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode “None”
------	------	---------------------	-------------------------

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template “EliGene_CELI_RT_LC480_v03.ixi”. Run Template může být importován do softwaru v menu “Navigator” kliknutím na ikonu “Import” z CD přiloženého v kitu.



Real-Time PCR Systémy QuantStudio 3 a 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, "Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard".

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 3 min Ramp rate (1.6°C/s)

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 40 cyklů

95°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s)

60°C 40 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON

Post-Read Stage

40°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s)

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 60 °C.

Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene_CELI_RT_QS3_v00.edt" nebo "EliGene_CELI_RT_QS5_v00". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

RealTime systém ABI7500FAST (Applied Biosystems)

Použijte programový modul pro absolutní kvantifikaci ("Quantitation-Standard Curve" experiment) a "7500 (96wells)" instrument type.

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 3 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 40 cyklů

95°C 15 s

60°C 40 s Data collection ON

Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 20 s

Odečet emisního signálu ve druhém kroku při 60 °C.

Rotor-Gene Q (Qiagen):

V okně "New Run" vyberte volbu "Three Step".

Vyberte příslušný typ rotoru "Rotor Type" a klikněte na tlačítko "Next".

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 3 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 40 cyklů

95°C 15 s

60°C 40 s Odečet signálu v kanálech (Acquiring in channels) "Green" and "Yellow"

Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 20 s

Pro možnost "Gain Optimization" vyberte možnost "Automatic gain optimization before first acquisition".

Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene_CELI_RT_Q-GENE_v01.ret".



Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

V úvodní možnosti "Startup Wizard Create" založte nový "New Experiment" a vytvořte nový protokol "Create New Protocol".

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1	95°C	3 min
Step 2	95°C	15 s
Step 3	60°C	40 s + Plate Read
Step 4	GOTO Step 2	40x
Step 5	40°C	20 s

Doplňte "Sample Volume" na 20 µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 3 při 60 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM a HEX. Označte pozice s umístěnými vzorky s čtením v FAM a HEX kanálech jako „Unknown“ vzorky, případně „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene_CELI_RT_CFX_v00.prc1". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

Příprava reagensí

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie zcela rozmrazené, krátce promíchané na vortexu a stočené.
- Izolujte DNA podle standardního protokolu.

Příprava reakčního mixu

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

1. Detekce: Vezměte jednu zkumavku s CELI-DQ2 Mixem, jednu zkumavku s CELI-DQ8 Mixem a jednu zkumavku s CELI-DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do tří sad amplifikačních zkumavek po 17,5 µl každého mixu a přidejte 2,5 µl izolované DNA. Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. Nezamrazujte mikrozkušavky s MasterMixem opakovaně. Za těchto podmínek je souprava stabilní nejméně 14 dní.
2. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s CELI-DQ2 Mixem, jednu zkumavku s CELI-DQ8 Mixem a jednu zkumavku s CELI-DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do tří sad amplifikačních zkumavek po 17,5 µl každého Mixu a přidejte 2,5 µl pozitivní kontroly DNA (PC CELI).

Vložte zkumavky nebo destičku do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše

Odečet výsledků

LightCycler[®] 480 (Roche):

V nabídce "Analysis" zvolte možnost "Abs Quant/2nd Derivative Max".

V okně "Analysis" klikněte na ikonu "Color Comp" a zvolte Universal CC FAM (510)-HEX (580) kalibraci. Analyzujte výsledky kliknutím na ikonu "Calculate".



Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (465-510) a JOE (533-580) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

Real-Time PCR Systémy QuantStudio 3 a 5 (ThermoFisher Scientific):

V nabídce "Analysis Settings" zadejte pro možnost "Baseline" Start Cycle 3 a End Cycle 15. Hodnotu "Threshold" nastavte do 1/3 maximální intenzity signálu pozitivní kontroly pro danou alelu. Zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (em. 518 nm) a JOE (em. 548 nm) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Hodnoty "Qty" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "result undet." znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

RealTime systém 7500FAST (Applied Biosystems)

V nabídce "Analysis Settings" zadejte pro možnost "Baseline" Start Cycle 3 a End Cycle 15. Hodnotu "Threshold" nastavte do 1/3 maximální intenzity signálu pozitivní kontroly pro danou alelu. Zanalyzujte výsledky.

Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (em. 518 nm) a JOE (em. 548 nm) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Hodnoty "Qty" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "result undet." znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

Rotor-Gene Q (Qiagen):

Klikněte v hlavní nabídkové liště na ikonu "Analysis" a vyberte Analýzu "Quantitation". V okně „Quantitation Analysis“ zvolte možnosti "Dynamic Tube" a "Slope Correct". V nabídce "Outlier Removal" nastavte NTC Threshold na 10 %. Hodnotu "Threshold" nastavte do 1/3 maximální intenzity signálu pozitivní kontroly pro danou alelu.

Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (Green) a JOE (Yellow) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

V okně "Data Analysis" zvolte možnost "Quantification". V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Threshold“ a vyberte v „Baseline Cycles“ možnost „Auto Calculated“ a v „Single Threshold“ možnosti nastavte „User defined“ hodnotu na 1/3 maximální intenzity signálu pozitivní kontroly pro danou alelu.

Poté v okně "Data Analysis" vyberte jednotlivé fluorofory (FAM a HEX) kliknutím na box s jejich označení pod amplifikačním grafem a odečtěte výsledky jednotlivých vzorků.

Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM a HEX kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Hodnoty "Concentration" u vzorků poté odpovídají kvantitě pozitivního výsledku, "Negative" znamená negativní výsledek. Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v daném kanálu.



Interpretace výsledků

HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1*05) a JOE (DQB1*02) a zároveň rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQA1*05) a kanálu JOE (DQB1*02) není vyšší než 4.

HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1*05) a JOE (DQB1*02) nebo rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQA1*05) a kanálu JOE (DQB1*02) je vyšší než 4. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ2 pozitivní výsledek je nutné mít pozitivní výsledek pro obě alely, DQA1*05 a DQB1*02. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ2 pozitivní.

HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ8 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1*0302) a JOE (DQA1*03) a zároveň rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQB1*0302) a kanálu JOE (DQA1*03) není vyšší než 4.

HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DQ8 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1*0302) a JOE (DQA1*03) nebo rozdíl Ct hodnot mezi signálem v kanálu FAM (DQB1*0302) a kanálu JOE (DQA1*03) je vyšší než 4. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ8 pozitivní výsledek je nutné mít pozitivní výsledek pro obě alely, DQA1*03 a DQB1*0302. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ8 pozitivní.

HLA-DR4 pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DR4 Mixu v kanálu FAM (DRB1*04) je vzorek HLA-DR4 pozitivní.

Důležitá poznámka: Vzhledem k tomu, že se DR4 alela vyskytuje v haplotypu s DQ8 alelou, je při detekované pozitivitě DQ8 alely detekována i pozitivita v DR4 alele. Pouze velmi vzácně je DQ8 alela pozitivní bez DRB1*04.

HLA-DR4 negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u CELI-DR4 Mixu v kanálu FAM (DRB1*04) je vzorek HLA-DRB1*04 negativní. Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v JOE kanálu u CELI-DR4 Mixu však musí být pozitivní.

Pozitivní výsledek

Pokud byla ve vzorku detekovaná alespoň jedna alela (HLA DQ2 a/nebo HLA DQ8) může dojít ke vzniku a rozvoji onemocnění. Vliv genetické složky je přibližně 50 %.

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.



Negativní výsledek

Pokud vzorek není pozitivní na HLA DQ2 ani na HLA DQ8 lze onemocnění vyloučit.

Pokud je vzorek pozitivní pouze na HLA-DRB1*04 lze onemocnění vyloučit.

Inhibovaný vzorek

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu u CELI-DR4 Mixu v kanálu JOE je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky DNA.



Následující tabulka shrnuje možné výsledku testu

Genotyp	CELI-DQ2 Mix				CELI-DQ8 Mix				CELI-DR4 Mix		
	FAM DQA1*05	JOE DQB1*02	FAM DQB1*0302	JOE DQA1*03	FAM DRB1*04	JOE DQB1*0302	JOE DQA1*03	FAM DRB1*04	JOE IC		
DQ2	+	+	-	+	-	-	+	+	+		
DQ2	+	+	-	+	+	-	+	+	+		
DQ2	+	+	+	-	+	+	-	+	+		
DQ2	+	+	+	-	+	+	-	+	+		
DQ8/DR4	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
DQ8/DR4	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
DQ8/DR4	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
DQ2/DQ8/DR4	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
DR4	+	-	-	-	-	-	-	+	+		
DR4	-	+	-	-	-	-	-	+	+		
DR4	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
DR4	+	-	-	+	-	-	+	+	+		
DR4	-	+	-	+	-	-	+	+	+		
DR4	-	-	-	+	-	-	+	+	+		



Kontrolní postup

Kit EliGene[®] Coeliac RT využívá jako vnitřní izolační kontrolu detekci lidského genu SYPL2 (synaptophysin-like 2) v CELI DR4 Mixu v kanálu JOE. Gen pro SYPL2 je přítomen v každém vzorku lidské DNA, tudíž není nutné přidávat ke vzorku interní kontrolu. Inhibiční izolační kontrola sleduje kvalitu izolace DNA a detekuje případné chyby v procesu izolace DNA. Detekuje také případné inhibice amplifikačního procesu. V případě že vzorek je DQA1*05/DQB1*02, DQA1*03/DQB1*0302 a DRB1*04 DNA negativní, Ct vnitřní kontroly musí mít hodnotu 35 nebo méně.

Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující DNA izolaci a RealTime PCR detekci můžete použít referenční materiál pozitivní pro DQ2, DQ8 a DR4 alely. Komerční pozitivní materiál není k dispozici.

Řešení problémů

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly, může jít o závadu v postupu izolace DNA, použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.
2. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.

Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

Kit EliGene[®] Coeliac RT specificky detekuje přítomnost alel DQA1*05, DQA1*03, DQB1*02, DQB1*0302 a DRB1*04. Kit je určen pro detekci lidské DNA o koncentraci vyšší než 5 ng/μl.

Analytická citlivost je 10 ng DNA v reakční směsi.

Analytická specifita metodiky je 100% a byla ověřena prohledáváním DNA databází.

Klinická specifita kitu EliGene[®] Coeliac RT byla testována na 50 vzorcích lidské DNA s genotypy určenými na základě sekvenace.

Diagnostické funkční charakteristiky:

Specifita kitu EliGene[®] Coeliac RT byla testována na 50 vzorcích lidské DNA s genotypy určenými na základě sekvenace. Všechny 50 vzorků kitu EliGene[®] Coeliac RT vyhodnotil správně. Klinická specifita EliGene[®] Coeliac RT kitu je 100%.

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci ≥ 10 ng DNA molekul v reakční směsi.

Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola pro kontrolu procesu izolace a amplifikace společně s pozitivní kontrolou sledující funkčnost MasterMixu.



Limitace testovacího postupu

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace DNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.

Upozornění

Nevyužitý obsah zkumavky s MasterMixem je stabilní po dobu 2 týdnů při -20 °C. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem opakovaně! Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započetím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensy poskytované v rámci kitu a reagensy doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensy z různých šarží!
- Nepoužívejte reagensy ze souprav jiných výrobců!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.



- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagensii musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

- Mikrozkušavky obsahující mixy (CELI-DQ2 Mix, CELI-DQ8 Mix a CELI-DR4 Mix) jsou určeny pouze pro jedno použití a musejí být použity pouze pro přípravu reakční směsi.
- S tímto mixem pracujte podle bezpečnostních vět (P):

P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

Literatura

Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C, Troncone R, Spanpanato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L. (2007) HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*. 56(8):1054-9

Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, Coto I, Hugot JP, Ascher H, Sollid LM, Greco L, Clerget-Darpoux F. (2004) HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 63(6):562-7.



Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98/79/EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: info@elisabeth.cz