



## EliGene® CELIAC DQ PLUS RT

**REF** 90085-RT (pro 50 stanovení)

### Složení soupravy:

5 x 150 µl HLA-DQ2 Mix  
5 x 150 µl HLA-DQ8/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® CELIAC DQ PLUS RT slouží ke genotypizaci alel HLA-DQ2.5 (DQA1\*05/DQB1\*02), HLA-DQ2.2 (DQA1\*02/DQB1\*02), HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*03:02) a HLA-DRB1\*04 z izolované DNA.

### Princip metody

Diagnostická souprava je založena na principu RealTime PCR. Pro detekci alel DQ2.5, DQ2.2, DQ8, DRB1\*04 a interní kontroly jsou použity primery a značené sondy (FAM, HEX, TexasRed a Cy5).

### 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 multi-faktoriální onemocnění asociované s alelami HLA-DQ2.5 (DQA1\*05/DQB1\*02), HLA-DQ2.2 (DQA1\*02/DQB1\*02) nebo DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*03:02). HLA DQ2.5 alela je exprimována u většiny osob trpících celiakií (> 90 %), DQ8 alela poté asi u 8 %. **Expresse 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-DQ2.5 alely asi 95%, zatímco u běžné populace je výskyt této alely pouze 20%. Z malé skupiny osob trpících celiakií a negativních na HLA-DQ2.5 a HLA DQ8 alelu, je drtivá většina pozitivní na HLA-DQ2.2 alelu. Z tohoto pohledu je **absence zmíněných alel velmi dobře využitelná pro vyloučení celiakie.**

Souprava EliGene® CELIAC DQ PLUS RT detekuje geny pro alely HLA-DQ2.5 (DQA1\*05/DQB1\*02), HLA-DQ2.2 (DQA1\*02/DQB1\*02), HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*03:02) a HLA-DRB1\*04. Jako vnitřní kontrola je použit jednokopiový gen SYPL2 (synaptophysin-like 2).



## Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:	Doporučená izolace DNA:
Krev	Manuální: EliGene Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) Automatická: <b>ZEPHYRUS Magneto</b> (ELISABETH PHARMACON)
Stěry	Manuální: EliGene Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) Automatická: <b>ZEPHYRUS Magneto</b> (ELISABETH PHARMACON)

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

Doporučená koncentrace analyzované DNA je 1–10 ng/µl. Nedoporučuje se testovat vzorky o koncentraci nižší než 1 ng/µl.



### Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Sterilní automatická pipeta 5–20 µl a sterilní špičky s filtrem prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- Sterilní stojánek prostý DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro Real Time – kit je optimalizován pro qPCR přístroje QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific), Rotor-Gene Q (Qiagen), CFX96 (Bio-Rad) a MIC cycler (Bio Molecular Systems).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodné pro daný Real Time přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

### Konfigurace RealTime PCR přístroje

- Pro detekci alel DQA1\*05 and DQB1\*03:02 je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm).
- Pro detekci alel DQB1\*02 and DQA1\*03 je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – emise 548 nm).
- Pro detekci alel DQA1\*02 and DRB1\*04 je použita sonda značená TexasRed barvou (exc. 589 nm – em. 615 nm).
- Pro detekci genu SYPL2 (Interní kontrola) je použita sonda značená Cy5 barvou (exc. 650 nm – em. 670 nm).

### QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, "Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard". Jako reportér používají barvy **FAM** (DQA1\*05 and DQB1\*03:02), **VIC** (DQB1\*02 and DQA1\*03), **ROX** (DQA1\*02 and DRB1\*04) a **Cy5** (SYPL2 gene). **NEPOUŽÍVEJTE ŽÁDNÉ PASIVNÍ REFERENČNÍ BARVIVO!**

### 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 10 s Ramp rate (1.6°C/s)

59°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON

67°C 30 s Ramp rate (1.6°C/s)

#### Post-Read Stage

40°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s)

*Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 59 °C.*

Kompletní teplotní profil lze nahrát ze šablony spuštění "EliGene CELIAC DQ PLUS RT\_QS5.edt". Šablonu pro spuštění lze zkopírovat z disku CD, který je součástí kitu.

### 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 10 s

59°C 20 s Odečet signálu v kanálech (Acquiring in channels) "Green", "Yellow", "Orange" and "Red"

67°C 30 s

#### Udržovací fáze (Holding stage)

40°C 20 s

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

Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene CELIAC DQ PLUS RT\_Q-GENE.ret".

Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

### CFX96 Touch (Bio-Rad):

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

### Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 95°C 3 min

Step 2 95°C 10 s

Step 3 59°C 20 s + Plate Read

Step 4 67°C 30 s

Step 5 GOTO Step 2 39x

Step 6 40°C 20 s

Doplňte "Sample Volume" na 20µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 3 při 59 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM, HEX, TexasRed a Cy5. Označte pozice s umístěnými vzorky jako „Unknown“ vzorky nebo „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene CELIAC DQ PLUS RT\_CFX96.prcd" z CD přiloženého v kitu.

### MIC Cycler (Bio Molecular Systems):

V "Run Setup" přístroje MIC vytvořte nový "Run Profile". Zadejte objem vzorku 20ul a řízení teploty "Fast TAQ (v3)".

### Nastavte následující teplotní profil:

#### Udržovací fáze (Hold)

95°C 3 min

#### Cyklovací fáze (Cycling) – 40 cyklů

95°C 10 s

59°C 10 s Odečet signálu v kanálech (Acquire on) "Green", "Yellow", "Orange" and "Red"

67°C 20 s

#### Udržovací fáze po cyklování (Hold after cycling)



40°C 20 s

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 59 °C pro kanály Green", "Yellow", "Orange" a "Red".

Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template "EliGene CELIAC DQ PLUS RT\_MIC.mictemplate" 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 rozmražené, krátce promíchány 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 HLA-DQ2 Mixem a jednu zkumavku s HLA-DQ8/DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do dvou sad amplifikačních zkumavek po 15.0 µl každého mixu a přidejte 5.0 µl izolované DNA. Pokud nevyužijete veškerý obsah zkumavky s MasterMixem, zamrazte ho a uchovejte při -20 °C v temnu. **Obsah zkumavek může být zamražen/rozmražen maximálně 5-krát.**
2. Pozitivní kontrola: Vezměte jednu zkumavku s HLA-DQ2 Mixem a jednu zkumavku s HLA-DQ8/DR4 Mixem. Po rozmrazení, promíchání a krátkém stočení pipetujte do dvou sad amplifikačních zkumavek po 15.0 µl každého Mixu a přidejte 5.0 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**

#### **QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):**

V případě **HLA-DQ2 mixu** v nabídce "Analyse Settings" edituje původní parametry pro Ct u jednotlivých kanálů (FAM, VIC, ROX, Cy5) zadejte hladinu Threshold u jednotlivých kanálů na hodnotu rovnající se **1/3 maximální intenzity pozitivní kontroly**, zvolte možnost "Automatic Baseline" a analyzujte výsledky kliknutím na možnost "Apply".

Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (exc. 494 nm – em. 518 nm), HEX (exc. 520 nm – em. 548 nm), TexasRed (exc. 589 nm – em. 615 nm) nebo Cy5 (exc. 650 nm – em. 670 nm) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

V případě **HLA-DQ8/DR4 mixu** v nabídce "Analyse Settings" edituje původní parametry pro Ct u jednotlivých kanálů (FAM, VIC, ROX, Cy5) zadejte hladinu Threshold u jednotlivých kanálů na hodnotu rovnající se **1/3 maximální intenzity pozitivní kontroly**, zvolte možnost "Automatic Baseline" a analyzujte výsledky kliknutím na možnost "Apply".

Pozitivní výsledek: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (exc. 494 nm – em. 518 nm), HEX (exc. 520 nm – em. 548 nm), TexasRed (exc. 589 nm – em. 615 nm) nebo Cy5 (exc. 650 nm – em. 670 nm) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.



**Interní kontrola musí být vždy amplifikována v každém vzorku.** Interní kontrola (SYPL2 gen) je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v Cy5 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 15 %**.

**Pozitivní výsledek:** Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (Green), HEX (Yellow), TexasRed (Orange) nebo Cy5 (Red) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

**Interní kontrola musí být vždy amplifikována v každém vzorku.** Interní kontrola (SYPL2 gen) je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v Cy5 kanálu.

### **CFX96 Touch (Bio-Rad):**

V okně „Data Analysis“ zvolte možnost „Quantification“. V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Setting“ a vyberte „Baseline Subtracted Curve Fit“ a možnost „Apply Fluorescence Drift Correction“.

V případě **HLA-DQ2 mixu** v nabídce „Nastavení“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte „Single Threshold“ na hodnotu rovnající se **1/3 maximální intenzity pozitivní kontroly**, zvolte možnost „Automatic Baseline“.

**Pozitivní výsledek:** Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM, HEX, TexasRed nebo Cy5 kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

V případě **HLA-DQ8/DR4 mixu** v nabídce „Nastavení“ vyberte možnost „Baseline Threshold“ a nastavte „Single Threshold“ na hodnotu rovnající se **1/3 maximální intenzity pozitivní kontroly**, zvolte možnost „Automatic Baseline“.

**Pozitivní výsledek:** Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM, HEX, TexasRed nebo Cy5 kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

**Interní kontrola musí být vždy amplifikována v každém vzorku.** Interní kontrola (SYPL2 gen) je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v Cy5 kanálu.

### **MIC Cycler (Bio Molecular Systems):**

V nabídce Analýza klikněte na malé plus vedle položky Cycling a poté vyberte cíl - FAM (zelená), HEX (žlutá), TexasRed (oranžová) nebo Cy5 (červená). V pravém dolním rohu **zvyšte „Fluorescence Cut-off Level“ na 20 %**. Pro každou pozitivní jamku se zobrazí hodnota kvantifikačního cyklu (Cq). Toto je číslo cyklu, při kterém fluorescence vzorku stoupne nad prahovou hodnotu (červená vodorovná čára v dolní části grafu amplifikační křivky). V podokně „Vzorky“ vpravo klikněte na názvy vzorků, chcete-li skrýt nebo zobrazit přidružené křivky a výsledky.

**Pozitivní výsledek:** Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (Green), HEX (Yellow), TexasRed (Orange) nebo Cy5 (Red) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

**Interní kontrola musí být vždy amplifikována v každém vzorku.** Interní kontrola (SYPL2 gen) je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v Cy5 (červeném) kanálu.



## Interpretace výsledků

### HLA-DQ2.5 (DQA1\*05/DQB1\*02) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1\*05) a HEX (DQB1\*02).

### HLA-DQ2.5 (DQA1\*05/DQB1\*02) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ2 Mixu v obou kanálech FAM (DQA1\*05) a HEX (DQB1\*02). Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v Cy5 kanálu u HLA-DQ2 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ2.5 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-DQ2.5 pozitivní

### HLA-DQ2.2 (DQB1\*02/ DQA1\*02) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ2 Mixu v obou kanálech HEX (DQB1\*02) a TexasRed (DQA1\*02).

### HLA-DQ2.2 (DQB1\*02/ DQA1\*02) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ2 Mixu v kanálu HEX (DQB1\*02) a TexasRed (DQA1\*02). Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v Cy5 kanálu u HLA-DQ2 Mixu však musí být pozitivní.

Důležitá poznámka: Pro HLA-DQ2.2 pozitivní výsledek je nutné mít pozitivní výsledek pro obě alely, DQB1\*02 a DQA1\*02. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ2.2 pozitivní

### HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*0302) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ8/DR4 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1\*03:02) a HEX (DQA1\*03).

### HLA-DQ8 (DQA1\*03/DQB1\*0302) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ8/DR4 Mixu v obou kanálech FAM (DQB1\*03:02) a HEX (DQA1\*03). Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v Cy5 kanálu u HLA-DQ8/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\*03:02. Pokud je pozitivní pouze jedna z alel, pacient není HLA-DQ8 pozitivní

### HLA-DR4 (DRB1\*04) pozitivní

Pokud je pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ8/DR4 Mixu v kanálu TexasRed (DRB1\*04).

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 (DRB1\*04) negativní

Pokud není pozorován před cyklem 35 nárůst emisního spektra u HLA-DQ8/DR4 Mixu v kanálu TexasRed (DRB1\*04). Signál pro vnitřní kontrolu (SYPL2) v Cy5 kanálu u HLA-DQ8/DR4 Mixu však musí být pozitivní.



### **Pozitivní výsledek**

DQ2.5 a/nebo DQ2.2 a/nebo DQ8 alely byly zjištěny ve vzorku, může dojít k rozvoji onemocnění celiak. 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 žádnou z detekovaných alel (HLA DQ2.5, DQ2.2 a 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 HLA-DQ2 a HLA-DQ8/DR4 Mixu v kanálu Cy5, je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky DNA.

Následující tabulka shrnuje výsledky ukazující genetickou predispozici k celiakii.





Genotype	HLA-DQ2 Mix					HLA-DQ8/DR4 Mix				
	FAM (DQA1*05)	HEX (DQB1*02)	TxR (DQA1*02)	Cy5 (IC)	FAM (DQB1*03:02)	HEX (DQA1*03)	TxR (DRB1*04)	Cy5 (IC)		
DQ2.5	+	-	-	+	-	-	-	+		
DQ2.5	+	-	-	+	-	-	-	+		
DQ2.5/DR4	+	-	-	+	-	-	+	+		
DQ2.5/DR4	+	-	-	+	-	-	+	+		
DQ2.2	-	+	+	+	-	+	-	+		
DQ2.2	-	+	+	+	+	-	-	+		
DQ2.2/DR4	-	+	+	+	-	+	+	+		
DQ2.2/DR4	-	+	+	+	-	-	+	+		
DQ8	-	+	-	+	+	+	+	+		
DQ8	+	-	+	+	+	+	+	+		
DQ8	-	-	+	+	+	+	+	+		
DQ8	-	-	-	+	+	+	+	+		
DQ2.5/DQ2.2	+	+	+	+	-	+	-	+		
DQ2.5/DQ2.2	+	+	+	+	-	-	-	+		
DQ2.5/DQ2.2/DR4	+	+	+	+	-	+	+	+		
DQ2.5/DQ2.2/DR4	+	+	+	+	-	-	+	+		
DQ2.5/DQ2.2/DQ8	+	+	+	+	+	+	+	+		

## Kontrolní postup



Kit EliGene® CELIAC DQ PLUS RT využívá jako vnitřní izolační kontrolu detekci lidského genu SYPL2 (synaptophysin-like 2) v HLA-DQ2 a HLA-DQ8/DR4 Mixu v kanálu Cy5. Gen pro SYPL2 je přítomen v každém vzorku lidské DNA, tudíž není nutné přidávat ke vzorku vnitřní 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\*03:02, DQB1\*02, DQA1\*03, DQA1\*02 a DRB1\*04 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 DQ2.5, DQ2.2, DQ8 a DRB1\*04 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® CELIAC DQ PLUS RT specificky detekuje přítomnost genů DQA1\*05, DQB1\*02, DQB1\*0302 a DRB1\*04. Kit je určen pro detekci lidské DNA o koncentraci vyšší než 5 ng/μl.

**Analytická citlivost** je 5 ng DNA v reakční směsi.

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

**Klinická specifita** kitu EliGene® CELIAC DQ PLUS RT byla testována na 50 vzorcích lidské DNA s genotypy určenými na základě referenčních CE-IVD souprav určených pro detekci analyzovaných alel.

#### Diagnostické funkční charakteristiky:

Specifita kitu EliGene® CELIAC DQ PLUS RT byla testována na 50 vzorcích lidské DNA s genotypy určenými na základě referenčních CE-IVD souprav určených pro detekci analyzovaných alel. Všechny 50 vzorků kitu EliGene® CELIAC DQ PLUS RT vyhodnotil správně. Klinická specifita EliGene® CELIAC DQ PLUS RT kitu je 100%.

### Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci  $\geq 5$  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 může být zamražen/rozmražen maximálně 5-krát. 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 započatím 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 reagensy 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 (HLA-DQ2 Mix, HLA-DQ8/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](mailto:info@elisabeth.cz)