



## EliGene<sup>®</sup> 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:

Všecké 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<sup>®</sup> 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 průjemem, 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: <b>ZEPHYRUS Magneto</b> (ELISABETH PHARMACON) <b>Prepito NA Body Fluid Kit</b> (Chemagen-PerkinElmer)
Stěry	Manuální: EliGene Urine Isolation Kit (ELISABETH PHARMACON) Automatická: <b>ZEPHYRUS Magneto</b> (ELISABETH PHARMACON) <b>Prepito NA Body Fluid Kit</b> (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 20µl.

*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 reagenty 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*02	FAM 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  $\geq 10$  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](mailto:info@elisabeth.cz)