

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



HLA Celiac

CE IVD



These instructions for use apply to the following references / *Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:*

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- CEL106L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- CEL106H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- CEL112L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- CEL112H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- CEL136
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- CEL101L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- CEL101H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- CEL101

Table A 1. References for Open and Rotor-Gene format with internal control products. / *Referencias para productos Open y Rotor-Gene Format con control interno.*

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- CEL148T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / *Referencias para productos formato Tubo con control interno.*

Content

1.	Intended use.....	6
2.	Summary and Explanation	6
3.	Principle of the procedure	7
4.	Reagents provided	8
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	8
6.	Transport and storage conditions.....	9
7.	Precautions for users	9
8.	Test procedure	10
8.1.	Specimen collection, transport and storage	10
8.2.	DNA extraction	11
9.	Result interpretation	11
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2).....	11
10.	Limitations of the test	13
11.	Quality control.....	14
12.	Performance characteristics.....	14
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	14
12.2.	Analytical sensitivity	15
12.3.	Analytical specificity	18
12.4.	Analytical reactivity	18
	ANNEX 1	19
A1.1	Principle of the procedure.....	19
A1.2	Reagents provided.....	19
A1.3	Test procedure	20
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	20
A1.3.2	PCR protocol	21
	ANNEX 2	22
A2.1	Principle of the procedure.....	22
A2.2	Reagents provided.....	22
A2.3	Test procedure	23
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	23
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube.....	23
A2.3.3	PCR protocol	23

Contenido

1.	Uso previsto	25
2.	Introducción y explicación	25
3.	Procedimiento	27
4.	Reactivos suministrados	27
5.	Material requerido y no suministrado	27
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	28
7.	Precauciones para el usuario	28
8.	Procedimiento del test	30
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	30
8.2.	Extracción de DNA	30
9.	Interpretación de resultados	31
9.1.	Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	31
10.	Limitaciones del test	33
11.	Control de calidad	34
12.	Características del test	34
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica	34
12.2.	Sensibilidad analítica	35
12.3.	Especificidad analítica	38
12.4.	Reactividad analítica	38
	ANEXO 1	39
A1.1	Procedimiento	39
A1.2	Reactivos suministrados	39
A1.3	Procedimiento del test	40
A1.3.1	Control positivo liofilizado	40
A1.3.2	Protocolo PCR	41
	ANEXO 2	42
A2.1	Procedimiento	42
A2.2	Reactivos suministrados	42
A2.3	Procedimiento del test	43
A2.3.1	Control positivo liofilizado	43
A2.3.2	Mezcla de reacción liofilizada	43
A2.3.3	Protocolo PCR	43

Bibliography/Bibliografía	45
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	45
Trademarks.....	46

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit is a real-time RT-PCR multiplexed test designed for the simultaneous qualitative detection and differentiation of the main HLA alleles (*DQA1*05*, *DQB1*03:02*, *DQB1*02*, *DQA1*02*, *DQA1*03* and other alleles *DQB1* different from *DQB1*02*) associated with celiac disease (CD) in blood samples. This test is intended to be used as an aid in the detection of a genetic predisposition for celiac disease based on genotype identified. The absence of Celiac Disease-associated *HLA-DQ2.5*, *HLA-DQ2.2* and *HLA-DQ8* risk factors is an important exclusion criterion for CD. For the *HLA-DQB1*02* allele, it can determine the status of a sample as homozygous or heterozygous. DNA is extracted from blood specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for HLA alleles.

2. Summary and Explanation

Celiac disease is an inflammatory autoimmune condition that affects the small intestine primarily. At the molecular level, celiac disease is induced by an immune reaction to gluten, a protein found in wheat, barley and rye. Celiac disease is driven by aberrant immune responses to the presence of gluten in the diet in genetically predisposed individuals. The gold standard of celiac disease diagnosis requires analysis of the mucosa obtained from an intestinal biopsy and serological detection of anti-tissue transglutaminase, deaminated anti-gliadin peptides and / or anti-endomysial antibodies. Celiac disease has a strong hereditary component.

The celiac disease risk alleles *HLA-DQA1** and *DQB1** encode the alpha and beta chains, respectively, of the heterodimer of the HLA-DQ molecule, present on the surface of antigen presenting cells. Since each person presents two alleles from each loci *HLA-DQA1* and *HLA-DQB1*, it is possible to present up to 4 HLA-DQ heterodimers or molecules. A heterodimer encoded by the *HLA-DQA1* and *HLA-DQB1* alleles of the same chromosome is said to be cis-encoded, whereas if it is made up of alleles from different chromosomes, it is said to be trans-configured. Most celiac patients have at least one copy of *HLA-DQ2* or *HLA-DQ8*, two gene variants of the human leukocyte antigen (HLA class II or major histocompatibility complex, MHC). However, these variants are common in many populations, while only 1% develop celiac disease. Therefore, having one of the variants is necessary, but not sufficient for predisposition to the disease.

Each type of HLA is capable of presenting different peptide antigens, based on the amino acid sequence present in the peptide binding region of the HLA-DQ heterodimer. In the context of celiac disease, antigen presenting cells present gliadin-derived peptides, previously deaminated by tissue transglutaminase, as antigens, activating gluten-specific CD4 T cells. One of the hallmarks of celiac disease is a flow of activated lymphocytes into the small intestine, concomitant with villous atrophy. Immune activation is what ultimately induces the release of specific anti-gliadin and anti-tissue transglutaminase antibodies, these being detected in the diagnosis by serology.

The majority (95%) of celiac patients express the *HLA-DQ2* heterodimer (*HLA-DQA1*05* and *HLA-DQB1*02*) in cis or trans. *HLA-DQ8* (*HLA-DQA1*03* and *HLA-DQB1*03:02*) is present in most of the remaining patients (5-10%). *HLA-DQ2* and *HLA-DQ8* are estimated to contribute around 35% to the risk of developing celiac disease. The strongest association and most severe form occur with *HLA-DQA1*05*, *HLA-DQB1*02* (called *HLA-DQ2.5*), which, when inherited in homozygotes, is associated with a five-fold increase in risk of celiac disease development compared to individuals heterozygous for *HLA-DQ2.5*. Considering the high prevalence of these types of HLA in western

populations (40%), HLA typing has a very poor positive predictive value for the diagnosis of celiac disease. However, the absence of *HLA-DQ2* and *HLA-DQ8* makes the diagnosis of celiac disease highly unlikely (sensitivity > 96%). HLA typing has been included as a tool to exclude celiac disease in the European Society for Gastroenterology, Hepatology and Pediatric Nutrition (ESPGHAN) celiac diagnosis guide.

Therefore, a positive result in risk alleles in the HLA typing test is not sufficient for the diagnosis of celiac disease and requires other clinical correlations, such as positive serology with or without abnormal-looking duodenal biopsy, as indicated by the European and American clinical reference guides. Furthermore, it is particularly important that serology and duodenal biopsy studies are performed when the patient continues to include gluten in their diet, triggering the associated immune response.

The current diagnostic standard is based on the "rule of four out of five", which indicates that four of the five criteria are sufficient to establish the diagnosis of celiac disease: (1) typical signs and symptoms (diarrhea and malabsorption); (2) positive antibodies; (3) *HLA-DQ2* and / or *HLA-DQ8* positive; (4) intestinal damage (e.g., villous atrophy and minor injuries); and (5) clinical response to the gluten-free diet.

CerTest Biotec has developed a real-time PCR for the typing of the main celiac disease-related HLA haplotypes in patients with suspected gene susceptibility. This test has the advantage of requiring less time than the routine method, since being based on real-time PCR, only the time of the PCR reaction is required, without adding the hybridization time required with the routine method; in addition to reducing handling in the laboratory.

NOTE: For a better comprehension of nomenclature, we will refer to HLA alleles as follows:*

- *HLA-DQA1*05 alleles: DQA1*05*
- *HLA-DQB1*03:02 allele: DQB1*03:02.*
- *HLA-DQB1*02 alleles: DQB1*02.*
- *HLA-DQA1*02 alleles: DQA1*02.*
- *HLA-DQA1*03 alleles: DQA1*03.*
- *other alleles HLA-DQB1 different from HLA-DQB1*02: no" DQB1*02.*

*Antony Nolan Research Institute. (n.d.). HLA Nomenclature @ hla.alleles.org. Retrieved April 16, 2021, from <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

3. Principle of the procedure

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification and differentiation of HLA alleles (*DQA1*05*, *DQB1*03:02*, *DQB1*02*, *DQA1*02*, *DQA1*03* and other alleles *DQB1* different from *DQB1*02*) from blood samples. The isolated DNA target is amplified on specific regions for the identification of the *HLA-DQA1* loci (*DQA1*05*, *DQA1*02*, and *DQA1*03* alleles), *HLA-DQB1* loci (*DQB1*03:02* and *DQB1*02* alleles and other alleles *DQB1* different from *DQB1*02*), using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an **endogenous internal control** to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an **Endogenous Internal Control (IC)** (hemoglobin subunit beta gene, *HBB* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels. Each kit includes two kinds of multiplex reaction mix and each one corresponds to one different assay. The first multiple reaction mix detects *DQA1*05*, *DQB1*03:02* and/or *DQB1*02* alleles (*HLA Celiac 1*) and contains the endogenous internal control. The second multiple reaction mix detects *DQA1*02*, *DQA1*03* alleles and/or "no" *DQB1*02* alleles (other alleles *DQB1* different from *DQB1*02*) (*HLA Celiac 2*).

4. Reagents provided

VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products, and Annex 2 for tube format with internal control products.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1).

VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with VIASURE Real Time PCR Detection Kits. This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel – 500, ROX channel – 1000 and Cy5 channel – 1000.

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): FAM channel - 500, HEX channel - 200, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the *HLA Celiac* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR, human genetics and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for reference VS-CEL136). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-CEL136 (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.

- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Make sure to use a well for determining *DQA1*05*, *DQB1*03:02* and/or *DQB1*02* alleles and another well for determining *DQA1*02*, *DQA1*03* alleles and/or "no" *DQB1*02* alleles (other alleles *DQB1* different from *DQB1*02*). Be careful not to mix them throughout the process.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open and Rotor-Gene format with internal control products Test Procedure and Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit has been tested in blood (with EDTA or citrate). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, clinical samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 4°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), it is recommended shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 4°C for up to 24

hours or frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to Yong W. (eds) Biobanking. Methods in Molecular Biology, vol 1897 (2019) Humana Press, New York, NY.

8.2. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For DNA extraction from blood samples, you can use your manual or automatic routine optimized system, or any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. The following extraction kits have been validated:

- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).
- QIAAsymphony SP (Qiagen).

9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annex 1 and 2)

All the result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Endogenous Internal Control (IC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for HLA alleles in the positive control well.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	HLA Celiac 1				HLA Celiac 2			Interpretation of Controls
	DQA1*05 (FAM) ¹	DQB1*03:02 (ROX) ¹	DQB1*02 (Cy5) ¹	Endogenous Internal Control (HEX) ²	DQA1*02 (FAM) ¹	DQA1*03 (HEX) ¹	"no" DQB1*02 (ROX) ¹	
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls

¹ In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid', and retesting is required.

2. The Endogenous Internal Control (IC) should show an amplification signal ($C_t \leq 40$) in PC control wells.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read and analyze the results:

HLA Celiac 1			HLA Celiac 2			Result	Risk ⁽²⁾
DQA1*05 (FAM)	DQB1*03:02 (ROX)	DQB1*02 (Cy5)	DQA1*02 (FAM)	DQA1*03 (HEX)	"no" DQB1*02 (ROX)		
+	-	+	-	+/-	+/- ⁽¹⁾	DQ2.5	High
+	+	+	-	+	+	DQ2.5/DQ8	High
+	-	+	+	-	- ⁽¹⁾	DQ2.5/DQ2.2	High
-	+	-	+/-	+	+	DQ8	Moderate
-	+	+	+	+	+	DQ8/DQ2.2	Moderate
+	+	-	-	+	+	DQ8/DQA1*05	Moderate
-	-	+	+	+/-	+/- ⁽¹⁾	DQ2.2	Low
+	-	-	+/-	+/-	+	DQA1*05	Very low
-	-	-	+/-	+/-	+	Negative	Risk free

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. "no" DQB1*02= other alleles DQB1 different from DQB1*02.

+: Amplification curve

-: No amplification curve

1 A negative result for these targets implies a major risk (homozygous for DQB1*02 allele), following the indications described in Ruiz-Ortiz E. et al., 2014.

2 Risk genotypes at the HLA-DQA1 and HLA-DQB1 loci following the indications described in Erlichster M. et al., 2018.

A sample is considered positive if the C_t value obtained is less than 40 and the endogenous internal control shows or not an amplification signal. The endogenous internal control is a human housekeeping gene that should be present in all human nucleated cells.

A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system but the endogenous internal control is positive (C_t less than 35). A failure in the extraction procedure and/or an inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of endogenous internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (HLA Celiac 1).

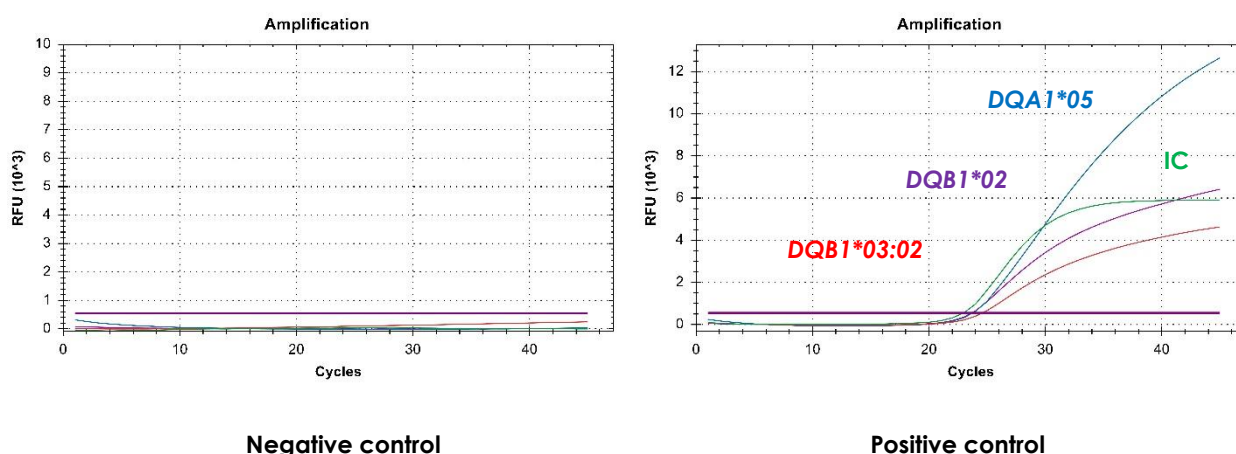
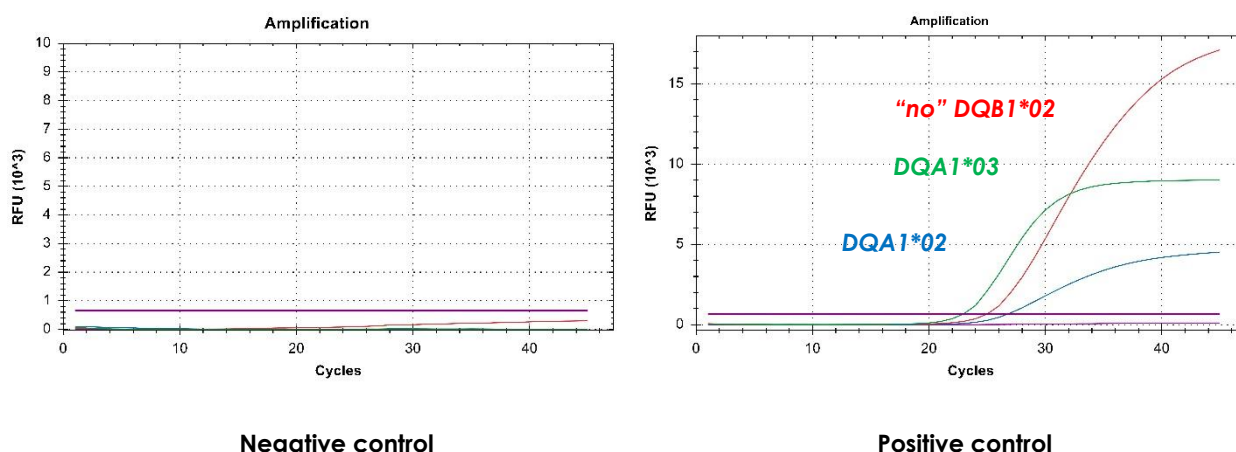


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (HLA Celiac 2).



The result is considered invalid if there is any signal of amplification in negative control or absence of target signals in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of endogenous internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters, the sigmoid shape of the curve and fluorescence intensity. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other canonical diagnostic tests. It is recommended to use VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit as an aid to the algorithm used in the diagnosis of celiac diseases (serological screening methods, small intestinal biopsies from the duodenum, gluten-free diet etc.).
- Results obtained from genetic diagnosis have only negative predictive value, allowing the exclusion of celiac disease in a high percentage, but positive results do not imply disease condition or positive predictive value.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from blood samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; properly extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by HLA Celiac Positive Control, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).

- Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
- A target in the specimen below the limit of detection for the assay.
- The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

11. Quality control

VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the Endogenous Internal Control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit was tested using clinical samples (blood samples) from patients diagnosed with celiac disease and first-degree relatives. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, a multicenter evaluation has been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Clinical Biochemistry Service of 'Hospital Universitario Miguel Servet' (HUMS) (Zaragoza, Spain)	Blood samples	QIASymphony DSP DNA Kit using QIASymphony SP instrument + Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 and Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	HLA alleles associated to celiac disease
2	Certest Biotec and Department of Biochemistry of Nordsjællands hospital, (Denmark)	Blood samples	QIASymphony DSP DNA Kit using QIASymphony SP instrument + Qiagen Rotor-Gene® Q + + Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	HLA alleles associated to celiac disease

Table 3. Summary of the sites, sample type and workflow carried out during the clinical evaluation.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	CeliacStrip kit (Operon)	HLA alleles associated to celiac disease	73	6	1	0	1 (0.95 – 1)	0.85 (0.42 – 0.99)	0.98 (0.91 – 0.99)	1 (0.51 – 1)
2	EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct assay (EUROIMMUN)	DQ2.5/DQ8 haplotypes	11	278	0	0	1 (0.71 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.71 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQ2.5/DQ2.2 haplotypes	16	273	0	0	1 (0.79 – 1)	1 (0.79 – 1)	1 (0.79 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQ2.5 (heterocygote) haplotype	52	237	0	0	1 (0.93 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.93 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQ2.5 (homocygote) haplotype	24	265	0	0	1 (0.85 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.85 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQ8/DQ2.2 haplotypes	3	286	0	0	1 (0.29 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.29 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQ8/DQA1*05 haplotypes	8	281	0	0	1 (0.63 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.63 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQ8 haplotype	40	248	1	0	1 (0.91 – 1)	0.99 (0.97 – 1)	1 (0.91 – 1)	0.99 (0.97 – 1)
		DQ2.2 (heterocygote) haplotype	17	272	0	0	1 (0.80 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.80 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQ2.2 (homocygote) haplotype	7	282	0	0	1 (0.59 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.59 – 1)	1 (0.98 – 1)
		DQA1*05 haplotype	31	258	0	0	1 (0.88 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.88 – 1)	1 (0.98 – 1)
		No risk	79	210	0	0	1 (0.95 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.95 – 1)	1 (0.98 – 1)

Table 4. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit.

In addition to this, 4 saliva samples from individuals diagnosed with celiac disease were also analysed with VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit, obtaining concordant results comparing to reference methods used.

Results show high agreement to detect HLA alleles associated to celiac disease using VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 50 DNA copies per reaction for HLA alleles DQA1*05, DQB1*03:02, and DQB1*02; and 10 DNA copies per reaction for HLA alleles DQA1*02, DQA1*03 and “no” DQB1*02 (other alleles DQB1 different from DQB1*02)) with a positive rate of $\geq 95\%$.

Figure 3. Dilution series of DQA1*05 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *HLA Celiac 1*, channel FAM).

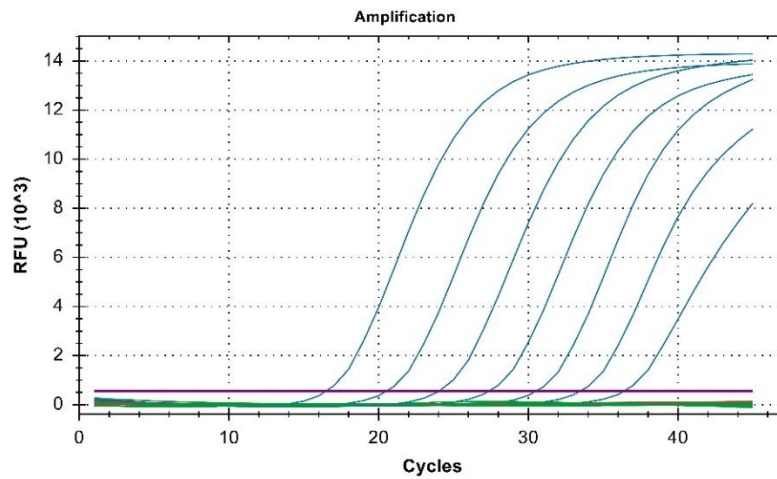


Figure 4. Dilution series of DQB1*03:02 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *HLA Celiac 1*, channel ROX).

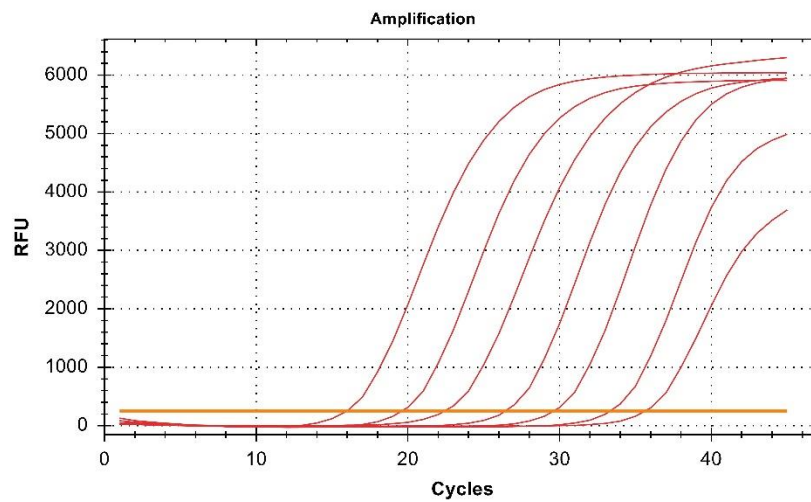


Figure 5. Dilution series of DQB1*02 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *HLA Celiac 1*, channel Cy5).

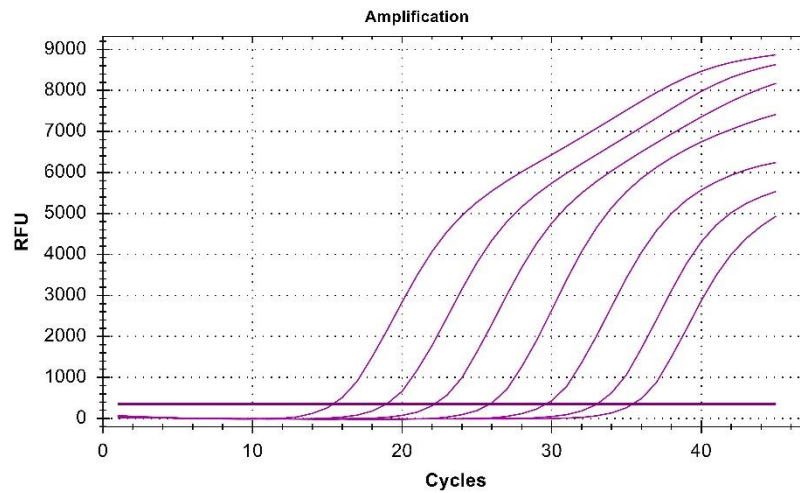


Figure 6. Dilution series of DQA1*02 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *HLA Celiac 2*, channel FAM)

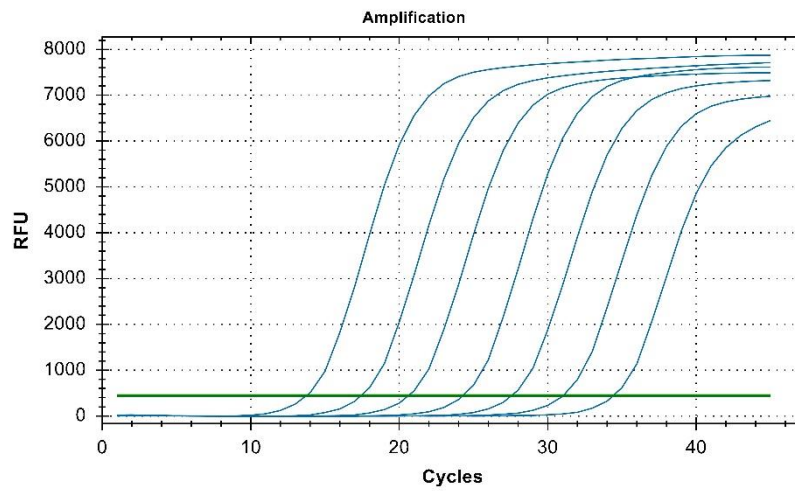


Figure 7. Dilution series of DQA1*03 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction *HLA Celiac 2*, channel HEX).

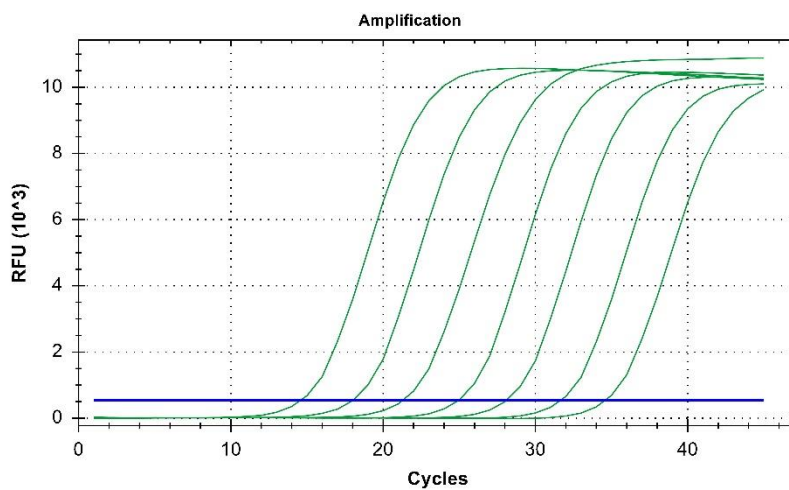
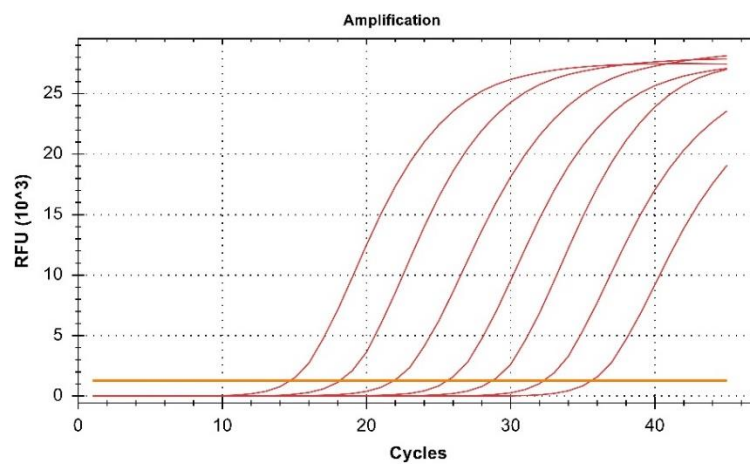


Figure 8. Dilution series of "no" DQB1*02 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction *HLA Celiac 2*, channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *HLA Celiac* assay was confirmed by testing a panel consisting different microorganisms representing the most common vector-borne pathogens, and other 18S-possessing homologous eukaryotes. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

Cross-reactivity testing					
<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Leptospira</i>	-	Dengue 1 virus strain Hawaii	-
<i>Bartonella henselae</i> strain Houston-1	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-	Dengue 2 virus strain New Guinea C	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> . strain Moroccan	-	Dengue 3 virus strain H87	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-	Dengue 4 virus strain H241	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	Usutu Virus	-
<i>Borrelia azfeli</i> strain P-Ko/1984	-	Japanese encephalitis	-	West Nile virus strain NY99	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Japanese Encephalitis virus Nakayama	-	West Nile virus Heja	-
<i>Borrelia bissetti</i>	-	Rift Valley Fever Virus AR21229	-	West Nile virus Ug37	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto strain IRS	-	Rift Valley Fever Virus MP12	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto strain B31	-	St Louis Encephalitis virus	-	Yellow Fever Virus French Neurotropic	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	Chikungunya virus WHO IS (R91064)	-	Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia)	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	Zika Virus strain 11468/16(French Polynesia)	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Chikungunya virus Martinique isolate	-	Zika Virus (African)	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Chikungunya virus strain F24	-	Zika virus strain PF13/251013-18 (Asian)	-
<i>Coxiella burnetii</i> strain Nine Mile Q	-	Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV) strain Neudorfl	-	Zika virus strain FB-GWUH-2016	-
<i>Theileria annulata</i>	-				

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *HLA-DQ2.5* heterodimer (*HLA-DQA1*05:01* and *HLA-DQB1*02:01* alleles), *HLA-DQ2.2* heterodimer (*HLA-DQA1*05:01* and *HLA-DQB1*02:01* alleles), *HLA-DQ8* heterodimer (*HLA-DQA1*03:01* and *HLA-DQB1*03:02* alleles), showing positive results.

ANNEX 1

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- CEL106L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- CEL106H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- CEL112L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- CEL112H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- CEL136
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- CEL101L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- CEL101H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- CEL101

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor PCR inhibition.

	Target	Channel	Gene (Alleles)
HLA Celiac 1	HLA alleles associated to celiac disease	FAM	DQA1*05
	HLA alleles associated to celiac disease	ROX	DQB1*03:02
	HLA alleles associated to celiac disease	Cy5	DQB1*02
	Endogenous Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE#	HBB gene (β-globin)
HLA Celiac 2	HLA alleles associated to celiac disease	FAM	DQA1*02
	HLA alleles associated to celiac disease	HEX, VIC or JOE#	DQA1*03
	HLA alleles associated to celiac disease	ROX	no DQB1*02

Table A1 2. Target, channel and genes.

#Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.certest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3 and A1.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>HLA Celiac</i> 1 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
<i>HLA Celiac</i> 2 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>HLA Celiac</i> Positive Control	synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CEL101L, VS- CEL101H, VS- CEL106L, VS- CEL106H, VS- CEL112L and VS- CEL112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>HLA Celiac</i> 1 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
<i>HLA Celiac</i> 2 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>HLA Celiac</i> Positive Control	synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	4/18 x 4-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CEL101 and VS-CEL136. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

HLA Celiac Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *HLA Celiac* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.2 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA extracted from each sample, reconstituted *HLA Celiac* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A1 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*DQA1*05* and *DQA1*02*), HEX, JOE or VIC (Endogenous Internal Control (IC) and *DQA1*03*), ROX (*DQB1*03:02* and "no" *DQB1*02*), and Cy5 channels (*DQB1*02*). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CEL148T

Table A2. 1.References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

	Target	Channel	Gene (Alleles)
HLA Celiac 1	HLA alleles associated to celiac disease	FAM	DQA1*05
	HLA alleles associated to celiac disease	ROX	DQB1*03:02
	HLA alleles associated to celiac disease	Cy5	DQB1*02
	Endogenous Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE [#]	HBB gene (β-globin)
HLA Celiac 2	HLA alleles associated to celiac disease	FAM	DQA1*02
	HLA alleles associated to celiac disease	HEX, VIC or JOE [#]	DQA1*03
	HLA alleles associated to celiac disease	ROX	no DQB1*02

Table A2. 2.Target, channel and genes.

[#]Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website www.cer-test.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
HLA Celiac 1 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	White	2 vials
HLA Celiac 2 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs in stabilized format	White	2 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
HLA Celiac Positive Control	synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CEL148T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

HLA Celiac Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *HLA Celiac* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *HLA Celiac* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *HLA Celiac* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA extracted from each sample, reconstituted *HLA Celiac* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tube in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*DQA1*05* and *DQA1*02*), HEX, JOE or VIC (Endogenous Internal Control (IC) and *DQA1*03*), ROX (*DQB1*03:02* and "no" *DQB1*02*), and Cy5 channels (*DQB1*02*). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit es un test PCR a tiempo real diseñada para la detección cualitativa y diferenciación simultánea de los principales alelos HLA (*DQA1*05*, *DQB1*03:02*, *DQB1*02*, *DQA1*02*, *DQA1*03* y otros alelos *DQB1* diferentes del alelo *DQB1*02*) asociados a la enfermedad celíaca (o celiacía) en muestras sanguíneas. El uso previsto de este test es facilitar la detección de una predisposición genética a la enfermedad celíaca en base al genotipo identificado. La ausencia de los factores de riesgo asociados a la celiacía *HLA-DQ2.5*, *HLA-DQ2.2* y *HLA-DQ8* es un criterio de exclusión importante de la enfermedad. Para el alelo *HLA-DQB1*02* puede establecerse la homogeneidad o heterogeneidad de la muestra. El DNA es extraído a partir de muestras sanguíneas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para la identificación de alelos de HLA.

2. Introducción y explicación

La celiacía es una condición autoinmune inflamatoria que afecta al intestino delgado de manera primaria. A nivel molecular, es inducida por una reacción inmune al gluten, una proteína presente en trigo, cebada y centeno. La celiacía es conducida por respuestas inmunes aberrantes a la presencia de gluten en la dieta en individuos predispuestos genéticamente. El *gold-standard* del diagnóstico de esta enfermedad requiere el análisis de la mucosa obtenida de una la biopsia intestinal y la detección serológica de anti-transglutaminasa tisular, anti-péptidos de gliadina deaminados y/o anticuerpos anti-endomisio. La enfermedad celíaca tiene un fuerte componente hereditario.

Los alelos de riesgo de celiacía *HLA-DQA1** y *DQB1** codifican las cadenas alfa y beta, respectivamente, del heterodímero de la molécula HLA-DQ, presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Dado que cada persona presenta dos alelos de cada loci *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1*, es posible presentar hasta 4 heterodímeros o moléculas HLA-DQ. Un heterodímero codificado por los alelos *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* del mismo cromosoma se dice que está codificado en *cis*, mientras que, si está formado por alelos de diferentes cromosomas, se dice que está configurado en *trans*. La mayoría de los pacientes celíacos tienen al menos una copia de *HLA-DQ2* o *HLA-DQ8*, dos variantes génicas del antígeno leucocitario humano (HLA clase II o complejo mayor de histocompatibilidad, MHC). Sin embargo, estas variantes son comunes en muchas poblaciones, mientras que únicamente un 1% desarrolla celiacía. Por tanto, tener una de las variantes es necesario, pero no suficiente para la predisposición a la enfermedad.

Cada tipo de HLA es capaz de presentar distintos antígenos peptídicos, basándose en la secuencia de aminoácidos presente en la región de unión a péptidos del heterodímero HLA-DQ. En el contexto de la celiacía, las células presentadoras de antígeno presentan péptidos derivados de gliadina, previamente desaminados por la transglutaminasa tisular, como antígenos, activando células T CD4 específicas de gluten. Una de las señas de identidad de la celiacía es un flujo de linfocitos activados hacia el intestino delgado, concomitante con la atrofia vellositaria. La activación inmune es la que finalmente induce la liberación de anticuerpos específicos anti-gliadina y anti-transglutaminasa tisular, siendo estos detectados en el diagnóstico por serología.

La mayoría (95%) de los pacientes celíacos expresan el heterodímero HLA-DQ2 (HLA-DQA1*05 y HLA-DQB1*02) en cis o trans. HLA-DQ8 (HLA-DQA1*03 y HLA-DQB1*03:02) está presente en la mayoría de los pacientes restantes (5-10%). Se estima que HLA-DQ2 y HLA-DQ8 contribuyen en torno a un 35% en el riesgo de desarrollar celiaquía. La asociación más fuerte y forma más grave se da con HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*02 (llamado HLA-DQ2.5), el cual, cuando es heredado en homocigosis, se asocia a un aumento de cinco veces el riesgo de desarrollo de celiaquía comparado con individuos heterocigotos a HLA-DQ2.5. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de estos tipos de HLA en las poblaciones occidentales (40%), el tipado de HLA tiene un valor predictivo positivo muy pobre para el diagnóstico de celiaquía. Sin embargo, la ausencia de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 hace el diagnóstico de la enfermedad celíaca altamente improbable (sensibilidad >96%). El tipado de HLA se ha incluido como una herramienta para excluir esta enfermedad en la guía de diagnóstico de celiaquía de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN).

Por tanto, un resultado positivo en alelos de riesgo en la prueba de tipado de HLA no es suficiente para el diagnóstico de celiaquía y requiere otras correlaciones clínicas, como son serología positiva con o sin biopsia duodenal de aspecto anormal, tal y como se indica por las guías de referencia clínica europeas y americanas. Además, es particularmente importante que los estudios de serología y biopsia duodenal se realicen cuando el paciente continúa incluyendo gluten en su dieta, desencadenando la respuesta inmune asociada.

El estándar actual de diagnóstico se basa en "la regla de cuatro de cinco", que indica que cuatro de los cinco criterios son suficientes para establecer el diagnóstico de celiaquía: (1) signos y síntomas típicos (diarrea y malabsorción); (2) anticuerpos positivos; (3) HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 positivo; (4) daño intestinal (p.ej.: atrofia vellositaria y lesiones menores); y (5) respuesta clínica a la dieta libre de gluten.

CerTest Biotec ha desarrollado una PCR a tiempo real para el tipado de los principales haplotipos de HLA relacionados con celiaquía en pacientes con sospecha de susceptibilidad génica. Este test presenta la ventaja de requerir menos tiempo que el método de rutina, pues al estar basado en PCR a tiempo real solo se requiere el tiempo de la reacción de PCR, sin añadir el tiempo de hibridación requerido con el método de rutina; además de reducir el manejo en el laboratorio.

NOTA: Para una mayor comprensión de la nomenclatura, los alelos HLA se referirán de la siguiente manera en este documento*:

- Alelos HLA- DQA1*05: DQA1*05
- Alelo HLA- DQB1*03:02: DQB1*03:02.
- Alelos HLA- DQB1*02: DQB1*02.
- Alelos HLA- DQA1*02: DQA1*02.
- Alelos HLA- DQA1*03: DQA1*03.
- Otros alelos HLA- DQB1 diferentes de los HLA- DQB1*02: no" DQB1*02.

*Antony Nolan Research Institute. (n.d.). *HLA Nomenclature* @ hla.alleles.org. Retrieved April 16, 2021, from <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

3. Procedimiento

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación de los alelos de HLA (*DQA1*05*, *DQB1*03:02*, *DQB1*02*, *DQA1*02*, *DQA1*03* y otros alelos *DQB1* diferentes del alelo *DQB1*02*) en muestras de sangre humanas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de los loci HLA-DQA1 (alelos *DQA1*05*, *DQA1*02*, y *DQA1*03*), HLA-DQB1 (alelos *DQB1*03:02* y *DQB1*02*), y otros alelos *DQB1* diferentes del alelo *DQB1*02* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando oligonucleótidos específicos y varias sondas marcadas con fluorescencia que hibridan con las regiones diana específicas.

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Dicha fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un **control interno endógeno** para controlar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como **Control Interno Endógeno (IC)** (el gen *HBB*, codificante para la subunidad beta de la hemoglobina). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes. Cada kit incluye dos tipos de mezclas de reacción y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera mezcla de reacción detecta los alelos *DQA1*05*, *DQB1*03:02* y/o *DQB1*02* (HLA Celiac 1), así como el Control Interno Endógeno (CI). La segunda mezcla de reacción detecta los alelos *DQA1*02*, *DQA1*03* y/o otros alelos *DQB1* diferentes del alelo *DQB1*02* (HLA Celiac 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open format" y "Rotor Gene format" con productos con control interno y el anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexo 2).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o ≤ -70°C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.

- Micropipetas (0,5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para "Rotor Gene format" (Anexo 1).

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506). Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los tests VIASURE Real Time PCR Detection Kit. Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX - 500, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): canal FAM -500, canal HEX - 200, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial HLA Celiac Reaction-Mix ha sido reconstituido, puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real, genética humana y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).

- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencia VS-CEL136). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS- CEL136 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas, así como para evitar la contaminación.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.

- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente, por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de los alelos *DQA1*05*, *DQB1*03:02* y/o *DQB1*02* y otro para el ensayo que permite la detección de los alelos *DQA1*02*, *DQA1*03* y/o "no" *DQB1*02* (otros alelos *DQB1* diferentes del alelo *DQB1*02*). Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para "open format" y "rotor-gene format" con productos con control interno y el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection kit ha sido testado en muestras sanguíneas (con EDTA o citrato). Otros tipos de muestras diferentes deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados a 4°C hasta 24 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 24 horas, se recomienda realizar el envío a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse a 4°C hasta 24 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la referencia Yong W. (eds) *Biobanking. Methods in Molecular Biology*, vol 1897 (2019) Humana Press, New York, NY.

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de muestras sanguíneas, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado, y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).
- MagDEA Dx SV kit, empleando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).
- QIAAsymphony SP (Qiagen).

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de control interno endógeno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal en el pocillo de control positivo que marca la *HLA Celiac*. Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	HLA Celiac 1				HLA Celiac 2			Interpretación de los controles
	DQA1*05 (FAM) ¹	DQB1*03:02 (ROX) ¹	DQB1*02 (Cy5) ¹	Control Interno Endógeno (HEX) ²	DQA1*02 (FAM) ¹	DQA1*03 (HEX) ¹	"no" DQB1*02 (ROX) ¹	
Control Positivo (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (NC)	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno Endógeno (CI) debería mostrar una señal de amplificación ($C_t \leq 40$) en los pocillos del CP.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

HLA Celiac 1			HLA Celiac 2			Resultado	Riesgo ⁽²⁾
DQA1*05 (FAM)	DQB1*03:02 (ROX)	DQB1*02 (Cy5)	DQA1*02 (FAM)	DQA1*03 (HEX)	"no" DQB1*02 (ROX)		
+	-	+	-	+/-	+/- ⁽¹⁾	DQ2.5	Alto
+	+	+	-	+	+	DQ2.5/DQ8	Alto
+	-	+	+	-	- ⁽¹⁾	DQ2.5/DQ2.2	Alto
-	+	-	+/-	+	+	DQ8	Moderado
-	+	+	+	+	+	DQ8/DQ2.2	Moderado
+	+	-	-	+	+	DQ8/DQA1*05	Moderado
-	-	+	+	+/-	+/- ⁽¹⁾	DQ2.2	Bajo
+	-	-	+/-	+/-	+	DQA1*05	Muy bajo
-	-	-	+/-	+/-	+	Negativo	Sin riesgo

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. "no" DQB1*02= otros alelos DQB1 diferentes del alelo DQB1*02.

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

1 Un resultado negativo para estas dianas implica un riesgo mayor (homocigoto para el alelo DQB1*02), siguiendo las indicaciones descritas en Ruiz-Ortiz E. et al., 2014.

2 Genotipos de riesgo en los loci HLA-DQA1 y HLA-DQB1 siguiendo las indicaciones descritas en Erlichster M. et al., 2018.

Una muestra se considera positiva si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno endógeno muestra una gráfica de amplificación. El control interno endógeno es un gen humano *housekeeping* que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas.

Una muestra se considera negativa si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno endógeno sí la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno endógeno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (HLA Celiac 1).

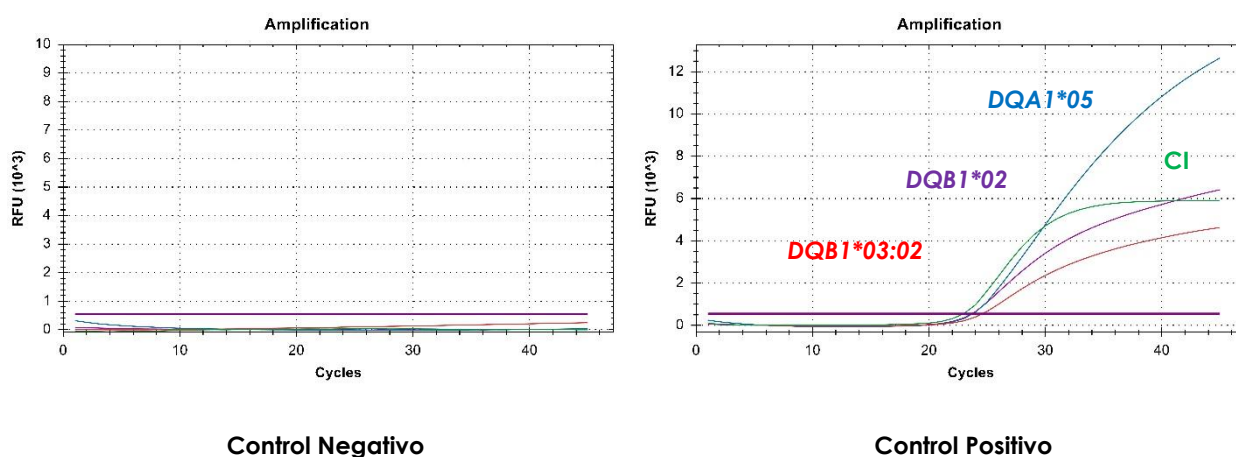
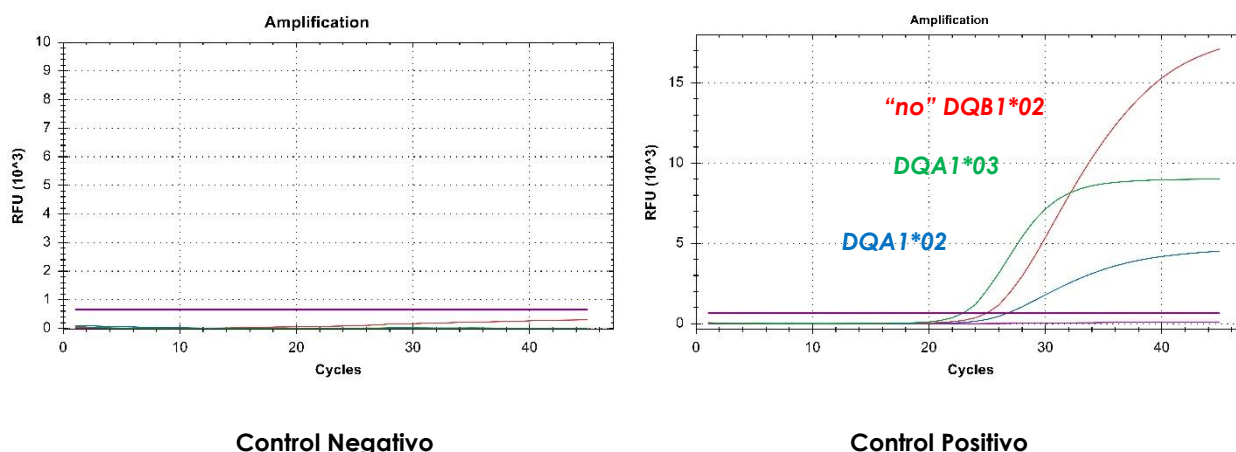


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (HLA Celiac 2).



En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico canónicas por un profesional de la salud. Se recomienda utilizar VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit como ayuda del algoritmo utilizado en el diagnóstico de enfermedades celíacas (métodos de cribado serológico, biopsia del duodeno, dieta sin gluten).
- Los resultados obtenidos mediante diagnóstico genético solo tienen valor predictivo negativo, permitiendo la exclusión del padecimiento de la enfermedad celíaca en un alto porcentaje. Sin embargo, la obtención de resultados positivos no implica el padecimiento de la enfermedad, o un valor predictivo positivo.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras de sangre.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con el HLA Celiac Positive Control, ya sea por el gran número de copias de molde DNA diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Una diana en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes.

- No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno endógeno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Kit fue evaluada empleando muestras clínicas (sangre) procedentes de pacientes diagnosticados con enfermedad celíaca y familiares de primer grado, realizando una evaluación multicéntrica en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado:

	Centro	Tipo muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) (Zaragoza, España)	Sangre	QIASymphony DSP DNA Kit empleando el equipo QIASymphony SP instrument + Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 y Bio- Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca
2	CerTest Biotec y Departamento de Bioquímica del Hospital Nordsjællands (Dinamarca)	Sangre	QIASymphony DSP DNA Kit empleando el equipo QIASymphony SP instrument + Qiagen Rotor-Gene® Q + Bio-Rad CFX96 Touch Real- Time PCR Detection System	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca

Tabla 3. Resumen de los centros, tipos de muestra y flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas.

Los valores positivo y negativo, falso positivo y negativo, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Centro	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	CeliacStrip kit (Operon)	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	73	6	1	0	1 (0.95 – 1)	0.85 (0.42 – 0.99)	0.98 (0.91 – 0.99)	1 (0.51 – 1)
2	EUROArray HLA-DQ2/DQ8 Direct assay (EUROIMMUN)	Haplotipos DQ2.5/DQ8	11	278	0	0	1 (0.71 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.71 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipos DQ2.5/DQ2.2	16	273	0	0	1 (0.79 – 1)	1 (0.79 – 1)	1 (0.79 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipo DQ2.5 (heterocigoto)	52	237	0	0	1 (0.93 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.93 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipo DQ2.5 (homocigoto)	24	265	0	0	1 (0.85 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.85 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipos DQ8/DQ2.2	3	286	0	0	1 (0.29 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.29 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipos DQ8/DQA1*05	8	281	0	0	1 (0.63 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.63 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipo DQ8	40	248	1	0	1 (0.91 – 1)	0.99 (0.97 – 1)	1 (0.91 – 1)	0.99 (0.97 – 1)
		Haplotipo DQ2.2 (heterocigoto)	17	272	0	0	1 (0.80 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.80 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipo DQ2.2 (homocigoto)	7	282	0	0	1 (0.59 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.59 – 1)	1 (0.98 – 1)
		Haplotipos DQA1*05	31	258	0	0	1 (0.88 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.88 – 1)	1 (0.98 – 1)
		No risk	79	210	0	0	1 (0.95 – 1)	1 (0.98 – 1)	1 (0.95 – 1)	1 (0.98 – 1)

Tabla 4. Valores positivo y negativo verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit.

Además, se analizaron también 4 muestras de saliva procedentes de individuos con diagnóstico positivo para celiaquía con VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit, obteniéndose resultados concordantes con respecto al método de referencia empleado.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca utilizando VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de 50 copias de DNA por reacción para los alelos de HLA DQA1*05, DQB1*03:02, y DQB1*02; y un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para los alelos de HLA DQA1*02, DQA1*03 y “no” DQB1*02 (otros alelos DQB1 diferentes del alelo DQB1*02)) con una tasa de positividad del 95%.

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de DQA1*05 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción HLA Celiac 1, canal FAM).

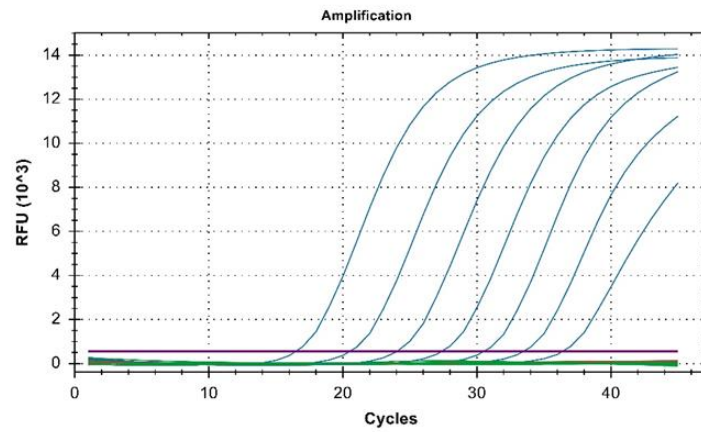


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de DQB1*03:02 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción HLA Celiac 1, canal ROX).

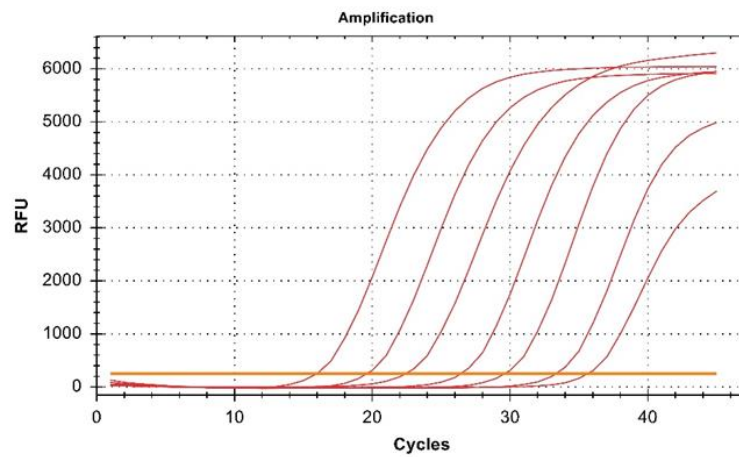


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar de DQB1*02 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción HLA Celiac 1, canal Cy5).

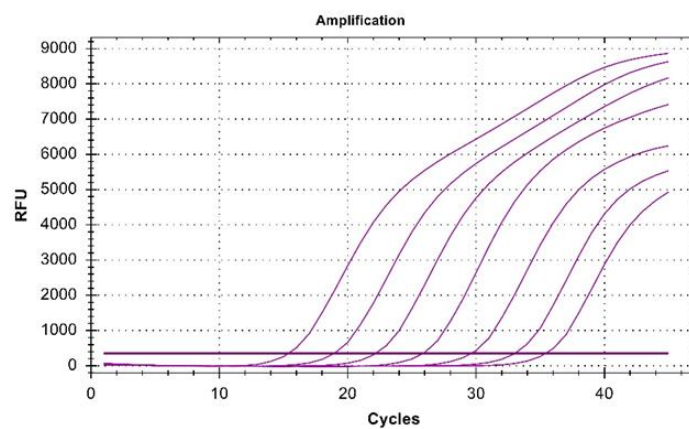


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar DQA1*02 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción HLA Celiac 2, canal FAM).

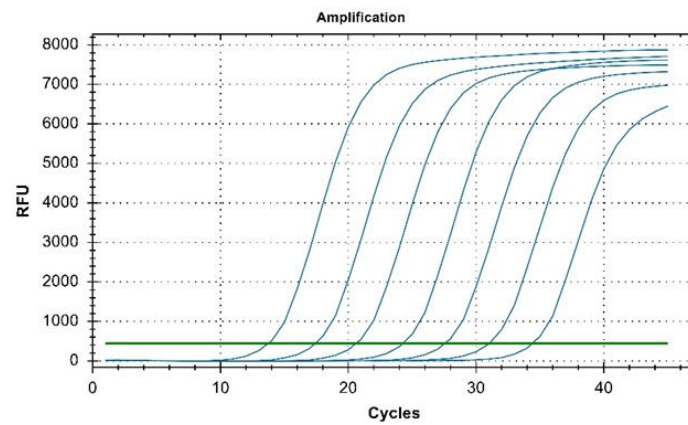


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar DQA1*03 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción HLA Celiac 2, canal HEX).

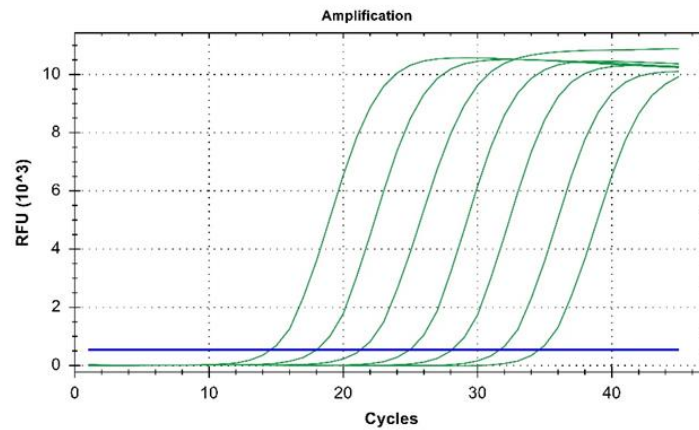
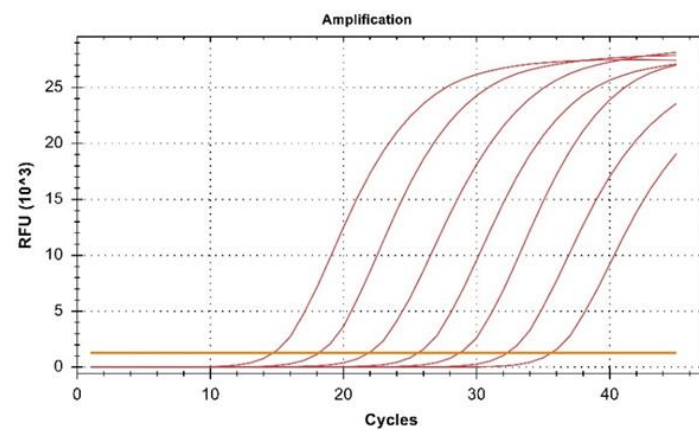


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar "no" DQB1*02 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción HLA Celiac 2, canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *HLA Celiac* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos transmitidos por vectores más comunes y eucariotas portadores de regiones homologas del gen 18S rRNA. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo

Prueba de reacción cruzada					
<i>Anaplasma marginale</i>	-	<i>Leptospira</i>	-	Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-
<i>Bartonella henselae</i> cepa Houston-1	-	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	-	Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-
<i>Borrelia hermsii</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i> , cepa Moroccan	-	Virus Dengue 3 cepa H87	-
<i>Borrelia lusitanae</i>	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-	Virus Dengue 4 cepa H241	-
<i>Borrelia valaisiana</i>	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	Virus Usutu	-
<i>Borrelia azfeli</i> cepa P-Ko/1984	-	Japanese encephalitis	-	Virus West Nile cepa NY99	-
<i>Borrelia bavariensis</i>	-	Virus Japanese Encephalitis Nakayama	-	Virus West Nile Heja	-
<i>Borrelia bissetti</i>	-	Virus Rift Valley Fever AR21229	-	Virus West Nile virus Ug37	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa IRS	-	Virus Rift Valley Fever MP12	-	Virus Yellow Fever cepa 17D	-
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto cepa B31	-	Virus St Louis Encephalitis	-	Virus Yellow Fever French Neurotropic	-
<i>Borrelia garinii</i>	-	Virus Chikungunya WHO IS (R91064)	-	Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia)	-
<i>Borrelia japonica</i>	-	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus Zika cepa 11468/16 (French Polynesia)	-
<i>Borrelia miyamotoi</i>	-	Virus Chikungunya Martinique isolate	-	Virus Zika (African)	-
<i>Borrelia spielmanii</i>	-	Virus Chikungunya cepa F24	-	Virus Zika cepa PF13/251013-18 (Asian)	-
<i>Coxiella burnetii</i> cepa Nine Mile Q	-	Virus Tick Borne Encephalitis (TBEV) cepa Neudorfl	-	Virus Zika cepa FB-GWUH-2016	-
<i>Theileria annulata</i>	-				

Tabla 5. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *HLA-DQ2.5* (*HLA-DQA1*05:01* y *HLA-DQB1*02:01*), *HLA-DQ2.2* (*HLA-DQA1*05:01* y *HLA-DQB1*02:01*), *HLA-DQ8* (*HLA-DQA1*03:01* y *HLA-DQB1*03:02*), mostrando un resultado positivo.

ANEXO 1

OPEN Y ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS- CEL106L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS- CEL106H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS- CEL112L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS- CEL112H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- CEL136
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS- CEL101L
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS- CEL101H
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS- CEL101

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno endógeno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen (Alelos)
HLA Celiac 1	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	FAM	DQA1*05
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	ROX	DQB1*03:02
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	Cy5	DQB1*02
	Control Interno Endógeno (IC)	HEX, VIC o JOE#	HBB gene (β-globin)
HLA Celiac 2	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	FAM	DQA1*02
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	HEX, VIC o JOE#	DQA1*03
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	ROX	no DQB1*02

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializarse en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-

Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>HLA Celiac 1</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
<i>HLA Celiac 2</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>HLA Celiac</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CEL101L, VS-CEL101H, VS-CEL106L, VS-CEL106H, VS-CEL112L y VS-CEL112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>HLA Celiac 1</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Transparente	1/9 tiras de 4 pocillos
<i>HLA Celiac 2</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs en formato estabilizado	Transparente	1/9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>HLA Celiac</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *HLA Celiac* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CEL101 y VS-CEL136. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *HLA Celiac* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *HLA Celiac*

Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *HLA Celiac* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1.5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (DQA1*05 y DQA1*02), HEX, JOE o VIC (Control Interno endógeno (CI) y DQA1*03), ROX (DQB1*03:02 y "no" DQB1*02) y Cy5 (DQB1*02). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS- CEL148T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno endógeno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

	Diana	Canal	Gen (Alelos)
HLA Celiac 1	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	FAM	DQA1*05
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	ROX	DQB1*03:02
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	Cy5	DQB1*02
	Control Interno Endógeno (IC)	HEX, VIC o JOE#	HBB gene (β-globin)
HLA Celiac 2	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	FAM	DQA1*02
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	HEX, VIC o JOE#	DQA1*03
	Alelos HLA asociados a la enfermedad celíaca	ROX	no DQB1*02

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.cerest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
HLA Celiac 1 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	2 viales
HLA Celiac 2 Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs en formato estabilizado	Blanco	2 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
HLA Celiac Positive Control	DNA sintético liofilizado	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE HLA Celiac Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CEL148T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *HLA Celiac Positive Control* contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *HLA Celiac Positive Control* liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de Rehydration Buffer (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de *HLA Celiac Reaction-Mix* (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *HLA Celiac Positive Control* reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*DQA1*05* y *DQA1*02*), HEX, JOE o VIC (Control Interno endógeno (CI) y *DQA1*03*), ROX (*DQB1*03:02* y "no" *DQB1*02*) y Cy5 (*DQB1*02*). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

Bibliography/Bibliografía

1. Abdulbaqi A.T., et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterology Journal*, 2019 Vol. 7(5) 583–613.
2. Burmeister, Y. et al. The prevalence, pathogenesis and diagnostics of celiac disease. *Medical Laboratory Observer*, 2019.
3. Byrne G. and Feighery, C.F. Celiac Disease: Diagnosis. En A. W. Ryan, et al. *Celiac Disease: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* New York: Springer, 2015, vol. 1326 (págs. 15-22).
4. Caio, G. et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*, 2019. 17:142.
5. Turner, G. D. et al. Celiac Disease: Background and Historical Context. En A. W. Ryan, *Celiac Disease: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, New York: Springe 2015. vol. 1326 (págs. 3-14).
6. Edvige Fasano, M. et al. HLA Genotyping: Methods for the Identification of the HLA-DQ2,-DQ8 Heterodimers Implicated in Celiac Disease (CD) Susceptibility. En A. W. Ryan, *Celiac Disease: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, New York: Springer, 2015. vol. 1326 (págs. 79-92).
7. Brown, N.K. et al. A Clinician's Guide to Celiac Disease HLA Genetics. *The American Journal of Gastroenterology*, 2019. 114:1587–1592.
8. Ruiz-Ortiz E. et al. HLA-DQ2/DQ8 and HLA-DQB1*02 homozygosity typing by real-time polymerase chain reaction for the assessment of celiac disease genetic risk: evaluation of a Spanish celiac population. *Tissue Antigens* 2014;84(6):545-53.
9. Erlichster M. et al. Rapid, Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection of Celiac Disease Risk Alleles. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2018;20(3):307-315.
10. Antony Nolan Research Institute. (n.d.). *HLA Nomenclature @ hla.alleles.org*. Retrieved April 16, 2021, from <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>
11. Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud (SESCS); 2018.

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Unique Device Identification Identificación única de dispositivo		Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	27/04/2021

Table A 3. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 27th April 2021

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01