



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

## RIDA® GENE Lac Intol

**REF** PY4215



Deutsch .....	3
English.....	23
Español.....	41
Français.....	61
Italiano .....	81
Português .....	101

# RIDA®GENE Lac Intol

**REF** PY4215

## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®GENE Lac Intol Test, der auf dem Roche LightCycler® 480 II durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time PCR zum qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der Positionen C13910 & G22018 sowie deren mögliche SNPs (single nucleotide polymorphism) C13910T & G22018A im humanen MCM6 Gen aus humanen EDTA Vollblutproben von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer Laktose Intoleranz.

Der RIDA®GENE Lac Intol Test ist zur Unterstützung der Diagnose bei Patienten mit Symptomen einer Laktose Intoleranz in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Das Testergebnis sollte nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Laktose, ein Disaccharid bestehend aus Galaktose und Glukose, ist die Hauptenergiequelle der Milch beim Menschen und bei Tieren.

Die  $\beta$ -(1,4)-glykosidische Bindung kann durch das Enzym Laktase gespalten und so die Monosaccharide für die weitere Verwendung zur Verfügung gestellt werden<sup>(1)</sup>.

Die Spaltung und Adsorption findet im Dünndarm statt. Anschließend werden die Monosaccharide in das Innere der Epithelzellen (Enterozyten) transportiert<sup>(2)</sup>. Die Menge an Laktase steigt im Laufe der Schwangerschaft und hat ihren Höchstwert wenige Tage nach der Geburt. Durch Regulatoren auf genetischer Ebene sinkt die Menge an Laktase im Laufe des Lebens<sup>(1)</sup>. Allerdings sind 50 % der Laktase Aktivität ausreichend, um eine effektive Spaltung der Laktose zu erreichen<sup>(3)</sup>. Kann Laktose nicht oder nur in geringen Mengen abgebaut werden, führt das zu einer erhöhten osmotischen Belastung und einer Steigerung des Wassergehaltes im Darm. Des Weiteren gelangt die Laktose in den Dickdarm, wo diese von Darmbakterien verarbeitet wird und so zur Produktion von kurzkettigen Fettsäuren und Gasen wie Wasserstoff, Kohlendioxid und Methan beiträgt<sup>(4)</sup>. Das wiederum kann dann zu klinischen Symptomen wie Blähungen Schmerzen im Unterleib, Krämpfe und/oder postprandiales Völlegefühl, Aufstoßen, Durchfall und in einigen Fällen zu

Verstopfungen, Übelkeit und Erbrechen führen<sup>(1,4)</sup>. Das Gen, welches für die Laktase codiert, nennt sich *LCT* und befindet sich auf Chromosom 2. Das *MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6) Gen, welches sich ca. 14 kb upstream des Laktase Gens befindet, fungiert als Enhancer. Verschiedene Single Nucleotide Polymorphism (SNP) wie u. a. 13910 C/T und 22018 G/A in diesem Gen werden mit einer Laktase Persistenz in Verbindung gebracht. Diese Veränderung führen zu neuen Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen und tragen so zu einer lebenslangen Expression des *LCT* Gens bei<sup>(2,4,5)</sup>. Laktose Intoleranz ist damit keine Krankheit und hat eine globale Prävalenz von 57 % und mehr<sup>(2,3)</sup>. Diese variiert von Region zu Region. In Europa mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 28 % schwankt sie von 2 % in Skandinavien und 70 % auf Sizilien<sup>(2)</sup>.

### 3. Testprinzip

Der RIDA®GENE Lac Intol Test ist eine multiplex real-time PCR zum qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der Positionen C13910 & G22018, sowie deren mögliche SNPs (single nucleotide polymorphism) C13910T & G22018A im humanen *MCM6* Gen aus humanen EDTA Vollblutproben. Nach der DNA-Isolierung werden die spezifische Genfragmente entweder als Wildtyp oder als Mutation amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an.

### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

**Tab. 1:** Packungsinhalt

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	gelb, gebrauchsfertig
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µl	rot, gebrauchsfertig
A	Control A	1 ×	200 µl	blau, gebrauchsfertig
B	Control B	1 ×	200 µl	grün, gebrauchsfertig

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 5 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

**Tab. 2:** Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-20 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-20 °C	5 Tau-/Frier-Zyklen

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 6.1 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Verwendung des RIDA®GENE Lac Intol Kits benötigt:

Zubehör
Extraktionsplattform: MagNa Pure 96 Instrument (Roche)
Real-time PCR Geräte: <ul style="list-style-type: none"><li>• LightCycler® 480 II (Roche)</li><li>• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)</li><li>• CFX96™ Dx (Bio-Rad)</li></ul>
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) bei Verwendung des LightCycler® 480 II
Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten (low profile, white wells, clear frame), Reaktionsgefäße, Folien)
Zentrifuge mit Rotor für Platten
Vortexer
Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
Pipettenspitzen mit Filtern
Puderfreie Einmalhandschuhe

Das RIDA®GENE Lac Intol Kit kann in Verbindung mit kompatiblen Workflows verwendet werden. Alternative Nukleinsäure-Extraktionsverfahren und real-time PCR-Geräte müssen durch den Anwender verifiziert/validiert werden. Kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken. Eine räumliche Trennung, gesonderte Kleidung und Instrumente für Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um eine Querkontamination oder falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Control A, Control B) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit darf nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.



## **8. Sammlung und Lagerung der Proben**

### **8.1 Probenlagerung**

Der Test ist für die Untersuchung humaner EDTA Vollblutproben entwickelt worden. Bis zur DNA-Extraktion sind die Proben bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden und bei 2 - 8 °C bis zu 72 Stunden zu lagern<sup>(6)</sup>. Eine mikrobielle Kontamination der Proben ist unbedingt zu vermeiden. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

### **8.2 Probenvorbereitung**

#### **8.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA Vollblut**

Für die DNA-Isolierung aus EDTA Vollblut wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit oder DNA-Extraktionssystem (z.B. MagNA Pure 96 Instrument (Roche)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Bei Verwendung des MagNa Pure 96 Instrument (Roche) sollen aus 200 µl der EDTA Vollblutprobe DNA mit dem DNA/Viral NA SV Kit und dem Pathogen Universal 200 Protokoll extrahiert werden. Die DNA wird mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf müssen die Control A und Control B mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Control A** und die **Control B** auftauen, vortexen (mit Ausnahme der Taq-Polymerase) und kurz zentrifugieren. Reagenzien sind während der Arbeitsschritte stets geeignet zu kühlen (2 – 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

### 9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Platten) pipettieren.

**Proben:** Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Kontrollen:** Je 5 µl **Control A** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Je 5 µl **Control B** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 4, Tab. 5).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®GENE Assays wurde das RIDA®GENE Lac Intol Kit im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA und RNA Assays miteinander zu kombinieren. Daher ist im Universalprofil eine reverse Transkription vorangestellt.

**Tab. 4:** Universal real-time PCR Profil für den LightCycler® 480 II

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Tab. 5:** Universal real-time PCR Profil für ABI 7500 Fast Dx und CFX96™ Dx

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

**Tab. 6:** Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	C13910 (WT)	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	C13910T (Mut)	533/580	
	G22018 (WT)	533/610	
	G22018A (Mut)	618/660	
<b>Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	-
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	

## 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. **Control A** und **Control B** müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7).

Die **Control A** und **Control B** liegen jeweils in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

**Tab. 7:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	FAM	ROX	VIC	Cy5	Zielgen Ct
Control A	+	+	-	-	Siehe Certificate of Analysis
Control B	-	-	+	+	Siehe Certificate of Analysis

\* + = positiv  
- = negativ

Wenn die beiden Kontrollen, **Control A** und **Control B**, nicht spezifikationsgerecht sind, ist der gesamte PCR-Lauf zu wiederholen. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

**Tab. 8:** Interpretation der Ergebnisse\*

Nachweis von				Ergebnis
C13910 (WT)	C13910T (Mut)	G22018 (WT)	G22018A (Mut)	
+	-	+	-	homozygot Wildtyp 13910, homozygot Wildtyp 22018
+	-	+	+	homozygot Wildtyp 13910, heterozygot 22018
+	+	-	+	heterozygot 13910, homozygot Mutation 22018
+	+	+	-	heterozygot 13910, homozygot Wildtyp 22018
+	+	+	+	heterozygot 13910, heterozygot 22018
-	+	+	-	homozygot Mutation 13910, homozygot Wildtyp 22018
+	-	-	+	homozygot Wildtyp 13910, homozygot Mutation 22018
-	+	-	+	homozygot Mutation 13910, homozygot Mutation 22018
-	+	+	+	homozygot Mutation 13910, heterozygot 22018
-	-	+ / -	+ / -	ungültig
+ / -	+ / -	-	-	ungültig
-	-	-	-	ungültig

\* + = positiv  
- = negativ

**Hinweis:** Die Fluoreszenzhöhe eines richtig-positiven Signals im VIC Kanal muss bei Nutzung des LightCycler® 480II (Roche), des CFX96™ Dx (Biorad) und des ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems) mindestens 20 % des Fluoreszenzsignals der Control B betragen. Für eine eindeutigere Auswertung empfehlen wir den Threshold auf diesen Grenzwert (20 % Control B) zu legen.

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn die Kontrollen im Nachweissystem keine Amplifikation zeigen. Der gesamte PCR-Lauf ist zu wiederholen.

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn die Probe im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In diesem Fall wurde entweder die DNA nicht zugegeben oder ungeeignete Template-DNA (Qualität, PCR-Inhibitoren) verwendet. Die extrahierte Probe sollte erneut amplifiziert oder die Isolierung und Reinigung der Probe sollte verbessert werden.

## 12. Grenzen der Methode

1. Das RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol Kit weist die Positionen C13910 & G22018 und/oder deren mögliche SNPs (single nucleotide polymorphism) C13910T & G22018A im humanen *MCM6* Gen aus humanen EDTA Vollblutproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur für humane EDTA Vollblutproben verifiziert.
4. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
6. Bei der verwendeten SNP-Technologie werden einzelne Basenaustausche nachgewiesen. Dies kann die Endpunktfluoreszenzhöhe beeinträchtigen.
7. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.
8. Das Gendiagnostikgesetz (GenDG) setzt für alle genetischen Analysen gemäß GenDG eine ausführliche Aufklärung und eine schriftliche Einwilligung der Patienten voraus.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Analytische Leistungsmerkmale

#### 13.1.1 Analytische Spezifität

##### Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden mit hohen Konzentrationen (Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht.

Für die in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt:

**Tab. 9:** Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Medunasal Heparin 500 I.U. Ampullen (Heparin)	15 U/ml
Cholesterin	3 mg/ml
Bilirubin	0,1 mg/ml
Hämoglobin	0,2 mg/ml
K <sub>2</sub> EDTA	1,8 mg/ml

#### 13.1.2 Präzision

Die Präzision des Lac Intol Kits wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

*Intra*-Assay Präzision: Bestimmung von 7 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem LightCycler® 480 II unter identischen Bedingungen.

*Inter*-Assay Präzision: Bestimmung von 7 Kontrollproben in 20 Läufen in Duplikaten an 10 Arbeitstagen (2 Läufe pro Tag) von zwei unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Die Testungen zur *Intra*- und *Inter*-Assay Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die Präzisionsdaten wurden mit sieben Kontrollproben, sowie dem Assay zugehörige Kontrolle A und Kontrolle B ermittelt.

Der höchste erhaltene Variationskoeffizient der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE Lac Intol Kit auf dem LightCycler® 480 II lag bei 8,72 %.



**Tab. 12:** Ergebnisse der Präzision des Lac Intol Kits für den FAM-Kanal.

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	23,3	23,4	22,9	23,6	24,2	24,2	24,0
	VK (%)	0,84 %	1,10 %	2,52 %	3,34 %	2,46 %	2,27 %	2,99 %
2	Ct	23,4	23,6	23,2	23,8	24,1	24,3	24,1
	VK (%)	1,46 %	0,95 %	1,80 %	2,22 %	2,37 %	2,20 %	2,44 %
3	Ct	23,6	23,8	23,6	23,9	24,2	24,6	24,2
	VK (%)	0,67 %	1,02 %	1,18 %	2,80 %	2,22 %	2,34 %	2,83 %
4	Ct	24,4	24,6	24,5	24,3	24,5	25,0	24,6
	VK (%)	1,41 %	1,01 %	1,14 %	2,91 %	2,46 %	2,63 %	2,96 %
5	Ct	24,1	24,2	23,9	24,0	24,3	24,6	24,3
	VK (%)	0,88 %	1,13 %	0,96 %	2,78 %	2,42 %	2,01 %	2,59 %
6	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

**Tab. 13:** Ergebnisse der Präzision des Lac Intol Kits für den VIC-Kanal.

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	28,0	27,0	27,5	28,4	28,9	28,1	28,5
	VK (%)	1,81 %	2,13 %	3,62 %	2,71 %	2,70 %	4,38 %	3,58 %
3	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
4	Ct	31,2	29,4	28,9	28,5	29,1	28,3	28,7
	VK (%)	5,35 %	8,72 %	1,75 %	2,42 %	2,03 %	3,86 %	3,15 %
5	Ct	28,7	28,0	27,3	27,2	27,3	27,0	27,2
	VK (%)	2,41 %	6,02 %	3,44 %	1,75 %	1,73 %	2,84 %	2,21 %
6	Ct	27,5	26,5	26,8	26,9	26,9	26,8	26,9
	VK (%)	1,40 %	1,33 %	0,97 %	1,30 %	1,46 %	1,34 %	1,37 %
7	Ct	25,9	25,8	25,6	26,5	26,7	26,2	26,5
	VK (%)	0,87 %	1,36 %	0,88 %	1,63 %	1,04 %	1,75 %	1,75 %

**Tab. 14:** Ergebnisse der Präzision des Lac Intol Kits für den ROX-Kanal.

Ct- Mittelwert / VK		Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	23,4	23,2	23,3	24,0	24,4	24,5	24,3
	VK (%)	0,95 %	1,08 %	1,89 %	2,47 %	2,16 %	2,07 %	2,46 %
2	Ct	23,7	23,5	24,0	24,4	24,5	24,8	24,6
	VK (%)	1,00 %	0,81 %	1,56 %	1,98 %	2,07 %	1,69 %	2,06 %
3	Ct	23,6	23,4	23,9	24,2	24,4	24,9	24,5
	VK (%)	0,64 %	1,35 %	1,46 %	2,43 %	2,25 %	2,23 %	2,61 %
4	Ct	24,7	25,1	24,7	24,8	25,0	25,3	25,1
	VK (%)	1,22 %	1,24 %	1,28 %	2,52 %	2,34 %	2,33 %	2,53 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	Ct	24,2	24,4	24,0	24,4	24,4	24,6	24,4
	VK (%)	0,94 %	1,32 %	1,10 %	2,71 %	2,40 %	2,60 %	2,57 %
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

**Tab. 15:** Ergebnisse der Präzision des Lac Intol Kits für den Cy5-Kanal.










Ct- Mittelwert / VK		Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	Ct	25,5	26,0	28,3	25,7	26,1	27,0	26,3
	VK (%)	1,06 %	1,54 %	4,10 %	2,74 %	3,19 %	3,69 %	4,06 %
4	Ct	25,9	26,2	26,2	26,2	26,4	27,4	26,7
	VK (%)	1,62 %	2,90 %	1,54 %	3,48 %	2,86 %	3,19 %	3,95 %
5	Ct	25,3	25,6	25,7	25,7	25,8	26,5	26,0
	VK (%)	0,95 %	1,84 %	0,61 %	2,17 %	2,11 %	1,75 %	2,55 %
6	Ct	25,5	25,8	25,7	26,0	26,0	26,4	26,1
	VK (%)	1,29 %	1,03 %	0,99 %	3,33 %	2,59 %	3,05 %	3,07 %
7	Ct	25,4	25,5	25,8	25,4	25,5	26,1	25,7
	VK (%)	0,90 %	1,16 %	0,86 %	2,28 %	1,94 %	2,28 %	2,58 %

## 14. Versionsübersicht

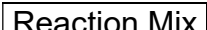

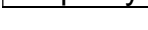

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-05-11	Freigabeversion

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Taq-Polymerase
	Kontrolle A
	Kontrolle B

## 16. Literatur

1. Toca MDC, Fernández A, Orsi M, Tabacco O, Vinderola G. Lactose intolerance: myths and facts. An update. *Arch Argent Pediatr.* 2022;120(1):59-66.
2. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut.* 2019;68(11):2080-91.
3. Morelli L, Amrani N, Goulet O, Lukito W. Lactose Intolerance Clinical Symptoms, Diagnosis and Treatment. *Global Diabetes Open Access Journal.* 2019;1(1):1-10
4. Catanzaro R, Sciuto M, Marotta F. Lactose Intolerance—Old and New Knowledge on Pathophysiological Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *SN Comprehensive Clinical Medicine.* 2021;3:499-509.
5. Anguita-Ruiz A, Aguilera CM, Gil Á. Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients.* 2020;12(9).
6. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005



**English**

## **RIDA®GENE Lac Intol**

**REF** PY4215

### **1. Intended use**

For *in-vitro* diagnostic use.

The RIDA®GENE Lac Intol test, which is performed on the LightCycler® 480 II, is a multiplex real-time PCR for the qualitative detection and differentiation of C13910 & G22018 as well as their SNPs (single nucleotide polymorphisms) C13910T & G22018A in the human MCM6 gene from human whole blood EDTA samples from persons with signs and symptoms of lactose intolerance.

The RIDA®GENE Lac Intol test is intended to aid in the diagnosis of patients with symptoms of lactose intolerance in connection with other clinical and laboratory findings.

The test result should not be used as the sole basis for diagnosis.

The product is intended for professional use.

### **2. Summary and explanation of the test**

Lactose, a disaccharide made up of galactose and glucose, is the main energy source of milk in humans and animals.

The  $\beta$ -(1,4) glycosidic bond can be broken down by the enzyme lactase, thereby making the monosaccharides available for further use<sup>(1)</sup>. Breakdown and adsorption take place in the small intestine. The monosaccharides are subsequently transported inside the epithelial cells (enterocytes)<sup>(2)</sup>. The amount of lactase increases during pregnancy and reaches its highest value a few days after birth. Lactase content decreases over a lifetime through regulators at the genetic level<sup>(1)</sup>. Yet 50 % of lactase activity is sufficient to break down lactose effectively<sup>(3)</sup>. If lactose can only be broken down in small quantities or not at all, this leads to an excessive osmotic load and increases the water content in the intestine. Furthermore, lactose gets into the large intestine, where it is fermented by intestinal bacteria, contributing to the production of short-chain fatty acids and gases such as hydrogen, carbon dioxide, and methane<sup>(4)</sup>. This, in turn, can cause clinical symptoms such as bloating, abdominal pain, cramps and/or postprandial fullness, belching, diarrhea and in some cases constipation, nausea, and vomiting<sup>(1,4)</sup>. The gene that codes for lactase is called *LCT* and is located on chromosome 2. The *MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6) gene, which is located approx. 14 Kb upstream



of the lactase gene, functions as an enhancer. Different single nucleotide polymorphisms (SNPs) including 13910 C/T and 22018 G/A in this gene are associated with lactase persistence. This change leads to new transcription factor binding sites, thus contributing to a lifelong expression of the *LCT* gene<sup>(2,4,5)</sup>. Lactose intolerance is therefore not a disease; it has a global prevalence of 57 % and higher<sup>(2,3)</sup>. This varies from region to region. Europe has an average prevalence of 28 %, varying from 2 % in Scandinavia and 70 % on Sicily<sup>(2)</sup>.

### 3. Test principle

The RIDA®GENE Lac Intol test is a multiplex real-time PCR for the qualitative detection and differentiation of C13910 & G22018 as well as their possible SNPs (single nucleotide polymorphisms) C13910T & G22018A in the human *MCM6* gene from human whole blood EDTA samples. After DNA isolation, the specific gene fragments are amplified either as a wild type or a mutation.

The amplified target sequences are detected with hydrolysis probes labeled with a quencher at one end and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, **Taq-Polymerase** separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescent signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescent signal increases with the quantity of formed amplicons.

### 4. Reagents provided

The reagents in the kit are sufficient for 100 determinations.

**Table 1:** Reagents provided

Kit code	Reagent	Amount		Lid color
1	<b>Reaction Mix</b>	2 ×	1050 µL	yellow, ready for use
2	<b>Taq-Polymerase</b>	1 ×	80 µL	red, ready for use
A	<b>Control A</b>	1 ×	200 µL	blue, ready for use
B	<b>Control B</b>	1 ×	200 µL	green, ready for use

## 5. Storage instructions

- Please follow the handling guidelines in Table 2 and store the kit directly after use according to the information specified.
- All reagents must be stored away from light at -20 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 5 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents appropriately during PCR preparation (2 - 8 °C).

**Table 2:** Storage conditions and information

	Storage temperature	Maximum storage time
unopened	-20 °C	Can be used until the printed expiration date
opened	-20 °C	5 freeze-thaw cycles

## 6. Reagents required but not provided

### 6.1 Laboratory equipment

The following equipment is needed for using the RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol kit:

Equipment
Extraction platform: MagNA Pure 96 instrument (Roche)
Real-time PCR devices: <ul style="list-style-type: none"><li>• LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche)</li><li>• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)</li><li>• CFX96<sup>™</sup> Dx (Bio-Rad)</li></ul>
RIDA <sup>®</sup> GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) when using LightCycler <sup>®</sup> 480 II
Real-time PCR consumables (plates (low profile, white wells, clear frame), reaction vials, slides)
Centrifuge with rotor for plates
Vortexer
Pipettes (0.5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pipette tips with filters
Powder-free disposable gloves

The RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol kit can be used in conjunction with compatible workflows. Alternative nucleic acid extraction procedures and real-time PCR devices must be verified/validated by the user. Please contact R-Biopharm AG to review compatibility at [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Warnings and precautions for the users

For *in vitro* diagnostic use only.

This test must be carried out only by qualified laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be observed.

Always adhere strictly to the operating manual when carrying out this test.

Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.

Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test.

Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.

Separate rooms, special clothing, and instruments for extraction, PCR preparation, and PCR must be used to prevent cross-contamination and false-positive results.

Avoid contaminating the samples and components of the kit with microbes and nucleases (DNase/RNase).

Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.

Do not exchange or mix the components (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Control A, Control B) of one lot with the components of another lot.

Do not use the test kit after the expiration date. Users are responsible for the proper disposal of all reagents and materials after use. For disposal, please adhere to national regulations.

Further details on the Safety Data Sheet (SDS) can be found under the item number at <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

For users in the European Union: Report all serious adverse events associated with the product to R-Biopharm AG and the appropriate national authorities.

## 8. Collection and storage of samples

### 8.1 Sample storage

This test was developed for the examination of human whole blood EDTA samples. The samples must be stored at room temperature for up to 24 hours and 2 - 8 °C for up to 72 hours until the DNA is extracted<sup>(6)</sup>. Microbial contamination of the samples is to be avoided. The use of lipemic, hemolytic, icteric or opaque serums inactivated by heat may lead to distorted results.

### 8.2 Sample preparation

#### 8.2.1 DNA isolation from whole blood EDTA

A commercially available DNA isolation kit or DNA extraction system (e.g., MagNA Pure 96 instrument (Roche)) is recommended for the isolation of DNA from whole blood EDTA. The manufacturer's instructions must be observed.

When using the MagNA Pure 96 instrument (Roche), extract 200 µL of whole blood EDTA DNA using the DNA/Viral NA SV kit and the Pathogen Universal 200 protocol. Elute the DNA with 50 µL of elution buffer.

## 9. Test procedure

### 9.1 Preparation of the Master Mix

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. Control A and Control B must be included for each test run.

Adding an additional 10 % volume to the Master Mix is recommended in order to compensate for any pipetting loss (see Table 3). Prior to use, thaw the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, **Control A** and **Control B**, vortex (except Taq-Polymerase), and briefly centrifuge. Reagents must always be cooled appropriately during the work steps (2 - 8 °C).

**Table 3:** Example for the calculation and production of the Master Mix for 10 reactions

Kit code	Components of the Master Mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µL	212.3 µL
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0.7 µL	7.7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mix the Master Mix and then centrifuge for short time.

## 9.2 Preparation of the PCR mix

Pipette 20 µL of the Master Mix into each reaction vial (plates).

**Samples:** Add 5 µL eluate to each pre-pipetted Master Mix.

**Controls:** Add 5 µL of **Control A** to each pre-pipetted Master Mix.

Add 5 µL of **Control B** to each pre-pipetted Master Mix.

Seal the plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer to the real-time PCR instrument. Start PCR according to PCR instrument setup (see Table 4, Tab. 5).

## 9.3 Device settings

### 9.3.1 Universal real-time PCR profile

To harmonize the RIDA®GENE assays, the RIDA®GENE Lac Intol kit was verified in the universal profile. This makes it possible to combine DNA and RNA assays with each other. Reverse transcription therefore comes first in the universal profile.

**Table 4:** Universal real-time PCR profile for LightCycler® 480 II

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/extension	15 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

**Note:** **Annealing and extension take place in the same step.**

**Table 5:** Universal real-time RT-PCR profile for ABI 7500 Fast Dx and CFX96™ Dx

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/extension	30 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

**Note:** **Annealing and extension take place in the same step.**

## 9.4 Detection channel setting

**Table 6:** Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Note
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	C13910 (WT)	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.</b>
	C13910T (Mut)	533/580	
	G22018 (WT)	533/610	
	G22018A (Mut)	618/660	
<b>Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	<b>Set the ROX passive reference dye to none.</b>
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	-
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	

## 10. Quality control - indication of instability or expiration of reagents

Samples are evaluated using the analysis software of the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. **Control A** and **Control B** must indicate the correct results (see Table 7).

**Control A** and **Control B** are each present in a concentration of  $10^3$  copies/ $\mu$ L. It is used in a total quantity of  $5 \times 10^3$  copies in every PCR run.

**Table 7:** A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	FAM	ROX	VIC	Cy5	Target gene Ct
Control A	+	+	-	-	See Certificate of Analysis
Control B	-	-	+	+	See Certificate of Analysis

\* + = positive  
- = negative

If both controls, **Control A** and **Control B**, are not in line with the specifications, the whole PCR run must be repeated. If the specified values are not met, check the following items before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the equipment being used
- Correct test procedure

If the conditions are still not fulfilled after repeating the test, please consult the manufacturer or your local R-Biopharm distributor.



## 11. Result interpretation

The sample results are interpreted according to Table 8.

**Table 8:** Result interpretation\*

Detection of				Result
C13910 (WT)	C13910T (Mut)	G22018 (WT)	G22018A (Mut)	
+	-	+	-	Homozygous wild type 13910 Homozygous wild type 22018
+	-	+	+	Homozygous wild type 13910 Heterozygous 22018
+	+	-	+	Heterozygous 13910 Homozygous mutation 22018
+	+	+	-	Heterozygous 13910 Homozygous wild type 22018
+	+	+	+	Heterozygous 13910 Heterozygous 22018
-	+	+	-	Homozygous mutation 13910 Homozygous wild type 22018
+	-	-	+	Homozygous wild type 13910 Homozygous mutation 22018
-	+	-	+	Homozygous mutation 13910 Homozygous mutation 22018
-	+	+	+	Homozygous mutation 13910 Heterozygous 22018
-	-	+ / -	+ / -	invalid
+ / -	+ / -	-	-	invalid
-	-	-	-	invalid

\* + = positive  
- = negative

**Note:** When the LightCycler® 480 II (Roche), the CFX96™ Dx (Biorad) and the ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems) are used, the fluorescence level of a truly positive signal in the VIC channel must be at least 20 % of the fluorescence signal of Control B. For a more definitive evaluation, it is recommended to set the threshold to this limit (20 % Control B).

The PCR run cannot be evaluated if the controls display no amplification in the detection system. The whole PCR run must be repeated.

The PCR run cannot be evaluated if the sample displays no amplification in the detection system. In this case, either the DNA was not added or an unsuitable

template DNA (quality, PCR inhibitor) was used. The extracted sample should be re-amplified or the isolation and cleaning of the sample should be improved.

## 12. Limitations of the method

1. The RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol test detects C13910 & G22018 and/or their possible SNPs (single nucleotide polymorphisms) C13910T & G22018A in the human *MCM6* gene from human whole blood EDTA samples. A connection between the level of the determined Ct value and the occurrence of severe clinical symptoms cannot be derived from this. The results obtained must always be interpreted in combination with the complete clinical symptoms.
2. The diagnosis should not be based on the result of the molecular biological analysis alone, but should always take the patient's medical history and symptoms into account.
3. This test is valid only for human whole blood EDTA samples.
4. Improper specimen extraction, transport, storage, and handling can produce false-negative results.
5. The presence of PCR inhibitors can lead to false-negative or invalid results.
6. Individual base exchanges are detected for the SNP technology used. This can adversely affect the endpoint fluorescence level.
7. This assay should be performed in compliance with the regulation on good laboratory practice. Users must precisely follow the manufacturer's instructions when performing the test.
8. The German Genetic Diagnostics Act (GenDG) requires a thorough explanation and written consent of the patients for all genetic analyses in accordance with the GenDG.

## 13. Performance characteristics

### 13.1. Analytical performance characteristics

#### 13.1.1 Analytical specificity

##### Interfering substances

The presence of PCR inhibitors and interfering substances can lead to invalid results. Therefore the effects of different substances that could be present in the respective samples because of their widespread use should be tested.

Substances that could potentially significantly influence the test results were examined at high concentrations (simulation of the worst case) in an interference screen.

No interferences were determined for the substances listed in Table 9.

**Table 9:** Potentially interfering substances

Potentially interfering substance	Concentration
Medunasal Heparin 500 I.U. Ampules (heparin)	15 U/mL
Cholesterol	3 mg/mL
Bilirubin	0.1 mg/mL
Hemoglobin	0.2 mg/mL
K <sub>2</sub> EDTA	1.8 mg/mL

#### 13.1.2 Precision

The precision of the Lac Intol kit was determined for the following assessment levels.

*Intra*-assay precision: Determination of 7 control samples using 20 replicates each on LightCycler® 480 II under identical conditions.

*Inter*-assay precision: Determination of 7 control samples in 20 runs in duplicate on 10 work days (2 runs per day) performed by two different technicians under reproducible conditions.

Testing for intra- and inter-assay precision was carried out using three different lots.

The precision data were determined with seven control samples as well as the control A and control B associated with the assay.

The maximum obtained coefficient of variation of the measurements with the RIDA®GENE Lac Intol kit on LightCycler® 480 II was 8.72 %.

**Table 12:** Results of the precision of the Lac Intol kit for the FAM channel.

Ct mean value/CV		<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1-3
1	Ct	23.3	23.4	22.9	23.6	24.2	24.2	24.0
	CV (%)	0.84 %	1.10 %	2.52 %	3.34 %	2.46 %	2.27 %	2.99 %
2	Ct	23.4	23.6	23.2	23.8	24.1	24.3	24.1
	CV (%)	1.46 %	0.95 %	1.80 %	2.22 %	2.37 %	2.20 %	2.44 %
3	Ct	23.6	23.8	23.6	23.9	24.2	24.6	24.2
	CV (%)	0.67 %	1.02 %	1.18 %	2.80 %	2.22 %	2.34 %	2.83 %
4	Ct	24.4	24.6	24.5	24.3	24.5	25.0	24.6
	CV (%)	1.41 %	1.01 %	1.14 %	2.91 %	2.46 %	2.63 %	2.96 %
5	Ct	24.1	24.2	23.9	24.0	24.3	24.6	24.3
	CV (%)	0.88 %	1.13 %	0.96 %	2.78 %	2.42 %	2.01 %	2.59 %
6	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

**Table 13:** Results of the precision of the Lac Intol kit for the VIC channel.

Ct mean value/CV		<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	28.0	27.0	27.5	28.4	28.9	28.1	28.5
	CV (%)	1.81 %	2.13 %	3.62 %	2.71 %	2.70 %	4.38 %	3.58 %
3	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
4	Ct	31.2	29.4	28.9	28.5	29.1	28.3	28.7
	CV (%)	5.35 %	8.72 %	1.75 %	2.42 %	2.03 %	3.86 %	3.15 %
5	Ct	28.7	28.0	27.3	27.2	27.3	27.0	27.2
	CV (%)	2.41 %	6.02 %	3.44 %	1.75 %	1.73 %	2.84 %	2.21 %
6	Ct	27.5	26.5	26.8	26.9	26.9	26.8	26.9
	CV (%)	1.40 %	1.33 %	0.97 %	1.30 %	1.46 %	1.34 %	1.37 %
7	Ct	25.9	25.8	25.6	26.5	26.7	26.2	26.5
	CV (%)	0.87 %	1.36 %	0.88 %	1.63 %	1.04 %	1.75 %	1.75 %

**Table 14:** Results of the precision of the Lac Intol kit for the ROX channel.

Ct mean value/CV	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>	
	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1-3	
1	Ct	23.4	23.2	23.3	24.0	24.4	24.5	24.3
	CV (%)	0.95 %	1.08 %	1.89 %	2.47 %	2.16 %	2.07 %	2.46 %
2	Ct	23.7	23.5	24.0	24.4	24.5	24.8	24.6
	CV (%)	1.00 %	0.81 %	1.56 %	1.98 %	2.07 %	1.69 %	2.06 %
3	Ct	23.6	23.4	23.9	24.2	24.4	24.9	24.5
	CV (%)	0.64 %	1.35 %	1.46 %	2.43 %	2.25 %	2.23 %	2.61 %
4	Ct	24.7	25.1	24.7	24.8	25.0	25.3	25.1
	CV (%)	1.22 %	1.24 %	1.28 %	2.52 %	2.34 %	2.33 %	2.53 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
6	Ct	24.2	24.4	24.0	24.4	24.4	24.6	24.4
	CV (%)	0.94 %	1.32 %	1.10 %	2.71 %	2.40 %	2.60 %	2.57 %
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

**Table 15:** Results of the precision of the Lac Intol kit for the Cy5 channel.










Ct mean value/CV	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>	
	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1-3	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	Ct	25.5	26.0	28.3	25.7	26.1	27.0	26.3
	CV (%)	1.06 %	1.54 %	4.10 %	2.74 %	3.19 %	3.69 %	4.06 %
4	Ct	25.9	26.2	26.2	26.2	26.4	27.4	26.7
	CV (%)	1.62 %	2.90 %	1.54 %	3.48 %	2.86 %	3.19 %	3.95 %
5	Ct	25.3	25.6	25.7	25.7	25.8	26.5	26.0
	CV (%)	0.95 %	1.84 %	0.61 %	2.17 %	2.11 %	1.75 %	2.55 %
6	Ct	25.5	25.8	25.7	26.0	26.0	26.4	26.1
	CV (%)	1.29 %	1.03 %	0.99 %	3.33 %	2.59 %	3.05 %	3.07 %
7	Ct	25.4	25.5	25.8	25.4	25.5	26.1	25.7
	CV (%)	0.90 %	1.16 %	0.86 %	2.28 %	1.94 %	2.28 %	2.58 %

## 14. Version history





Version number	Section and designation
2022-05-11	Release version

## 15. Explanation of symbols

### General symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Observe operating manual
	Batch number
	Use before
	Storage temperature
	Item number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

### Test-specific symbols

	Reaction Mix
	Taq Polymerase
	Control A
	Control B



## 16. References

1. Toca MDC, Fernández A, Orsi M, Tabacco O, Vinderola G. Lactose intolerance: myths and facts. An update. *Arch Argent Pediatr*. 2022;120(1):59-66.
2. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*. 2019;68(11):2080-91.
3. Morelli L, Amrani N, Goulet O, Lukito W. Lactose Intolerance Clinical Symptoms, Diagnosis and Treatment. *Global Diabetes Open Access Journal*. 2019;1(1):1-10
4. Catanzaro R, Sciuto M, Marotta F. Lactose Intolerance—Old and New Knowledge on Pathophysiological Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2021;3:499-509.
5. Anguita-Ruiz A, Aguilera CM, Gil Á. Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients*. 2020;12(9).
6. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005

# RIDA®GENE Lac Intol

**REF** PY4215

## 1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*.

La prueba RIDA®GENE Lac Intol, que se realiza en el LightCycler® 480 II, es una PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y la diferenciación de C13910 y G22018, así como sus SNP (polimorfismos de nucleótido único) C13910T y G22018A, en el gen *MCM6* humano a partir de muestras de sangre entera humana con EDTA de personas con signos y síntomas de intolerancia a la lactosa.

La prueba RIDA®GENE Lac Intol está prevista para asistir en el diagnóstico de pacientes con síntomas de intolerancia a la lactosa junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados del ensayo no deben utilizarse como única base para el diagnóstico.

El producto está previsto para uso profesional.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

La lactosa, un disacárido formado por galactosa y glucosa, es la principal fuente de energía de la leche en humanos y animales.

La enzima lactasa puede romper el enlace  $\beta$ -(1,4) glicosídico, con lo que los monosacáridos quedan disponibles para su uso posterior<sup>(1)</sup>. La descomposición y la adsorción tienen lugar en el intestino delgado. Los monosacáridos son transportados posteriormente al interior de las células epiteliales (enterocitos)<sup>(2)</sup>. La cantidad de lactasa aumenta durante el embarazo y alcanza su valor máximo unos días después del nacimiento. El contenido de lactasa disminuye a lo largo de la vida a través de reguladores a nivel genético<sup>(1)</sup>. Sin embargo, el 50 % de la actividad de la lactasa es suficiente para descomponer la lactosa de forma eficaz<sup>(3)</sup>. Si la lactosa solo se puede descomponer en pequeñas cantidades o no se descompone en absoluto, se produce una carga osmótica excesiva y aumenta el contenido de agua en el intestino.

Además, la lactosa llega al intestino grueso, donde es fermentada por las bacterias intestinales, lo que contribuye a la producción de ácidos grasos de cadena corta y de gases como el hidrógeno, el dióxido de carbono y el metano<sup>(4)</sup>. Esto, a su vez, puede provocar síntomas clínicos como hinchazón, dolor abdominal, calambres o plenitud posprandial, eructos, diarrea y, en algunos casos, estreñimiento, náuseas y vómitos<sup>(1,4)</sup>. El gen que codifica la lactasa se llama *LCT* y se encuentra en el

cromosoma 2. El gen *MCM6* (componente del complejo de mantenimiento del minicromosoma 6), que se encuentra aproximadamente a 14 Kb aguas arriba del gen de la lactasa, funciona como potenciador. Diferentes polimorfismos de nucleótido único (SNP), entre ellos 13910 C/T y 22018 G/A en este gen, están asociados con la persistencia de la lactasa. Este cambio conduce a nuevos sitios de unión del factor de transcripción, lo que contribuye a una expresión permanente del gen *LCT* <sup>(2,4,5)</sup>. Por lo tanto, la intolerancia a la lactosa no es una enfermedad; tiene una prevalencia global del 57 % y superior<sup>(2,3)</sup>. Esto varía de una región a otra. La prevalencia media en Europa es del 28 %, y varía entre el 2 % en Escandinavia y el 70 % en Sicilia<sup>(2)</sup>.

### 3. Principio del ensayo

La prueba RIDA®GENE Lac Intol es una PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa y la diferenciación de C13910 y G22018, así como sus posibles SNP (polimorfismos de nucleótido único) C13910T y G22018A, en el gen *MCM6* humano a partir de muestras de sangre entera humana con EDTA. Tras el aislamiento del ADN, los fragmentos de genes específicos se amplifican como tipo natural o como mutación.

Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq Polymerase** separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados.

### 4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones.

**Tabla 1:** Reactivos suministrados

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	<b>Reaction Mix</b>	2 ×	1050 µL	amarillo, listo para usar
2	<b>Taq-Polymerase</b>	1 ×	80 µL	rojo, listo para usar
A	<b>Control A</b>	1 ×	200 µL	azul, listo para usar
B	<b>Control B</b>	1 ×	200 µL	verde claro, listo para usar

## 5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. En caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 5 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 - 8 °C).

**Tabla 2:** Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de almacenamiento	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-20 °C	Puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa
abierto	-20 °C	5 ciclos de congelación y descongelación

## 6. Reactivos necesarios no suministrados

### 6.1 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para utilizar el kit RIDA®GENE Lac Intol:

Equipo
Plataforma de extracción: Equipo MagNA Pure 96 (Roche)
Dispositivos de PCR en tiempo real: <ul style="list-style-type: none"><li>• LightCycler® 480 II (Roche)</li><li>• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)</li><li>• CFX96™ Dx (Bio-Rad)</li></ul>
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) para uso con el LightCycler® 480 II
Consumibles para PCR en tiempo real (placas [perfil bajo, pocillos blancos, marco transparente], viales de reacción, portaobjetos)
Centrífuga con rotor para placas
Mezclador vórtex
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Puntas de pipeta con filtros
Guantes desechables sin talco

El kit RIDA®GENE Lac Intol puede utilizarse junto con flujos de trabajo compatibles. Los procedimientos alternativos de extracción de ácidos nucleicos y los dispositivos de PCR en tiempo real deben ser verificados o validados por el usuario. Póngase en contacto con R-Biopharm AG para revisar la compatibilidad en [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al llevar a cabo esta prueba.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Deben utilizarse salas diferentes, ropa especial y equipos para la extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha para evitar la contaminación cruzada y los resultados falsos positivos.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni mezcle los componentes (Reaction Mix, Taq Polymerase, Control A, Control B) de un lote de lote con los componentes de otro lote.

No utilice el kit de ensayo después de la fecha de caducidad. Los usuarios serán los responsables de desechar de forma correcta todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Encontrará más detalles sobre la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) con el número de artículo en <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

## **8. Obtención y almacenamiento de muestras**

### **8.1 Almacenamiento de la muestra**

Este ensayo fue desarrollado para el análisis de muestras de sangre entera humana con EDTA. Las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente hasta por 24 horas y a 2 - 8 °C hasta por 72 horas, hasta que el ADN se haya extraído<sup>(6)</sup>. Debe evitarse la contaminación microbiológica de las muestras. El uso de suero lipémico, hemolítico, icterico u opaco inactivado mediante calor puede dar resultados erróneos.

### **8.2 Preparación de las muestras**

#### **8.2.1 Aislamiento de ADN de sangre entera con EDTA**

Para aislar el ADN de la sangre entera con EDTA se recomienda un kit de aislamiento de ADN o un sistema de extracción de ADN disponible en el mercado (como el equipo MagNA Pure 96 [Roche]). Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Si se utiliza el equipo MagNA Pure 96 (Roche), extraiga 200 µL de ADN de sangre entera con EDTA utilizando el kit DNA/Viral NA SV y el protocolo Pathogen Universal 200. Eluir el ADN con 50 µL de tampón de elución.

## 9. Ejecución de la prueba

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. El control A y el control B deben incluirse para cada prueba.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte la tabla 3). Antes de su uso, descongele la **Reaction Mix**, la **Taq Polymerase**, el **Control A** y el **Control B** agite en un mezclador vórtex (excepto la Taq Polymerase) y centrifugue durante un breve tiempo. Los reactivos deben estar siempre debidamente refrigerados durante la etapa de trabajo (2 - 8 °C).

**Tabla 3:** Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para 10 reacciones

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µL	212.3 µL
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0.7 µL	7.7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

### 9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µL de mezcla maestra en cada vial de reacción (placas).

**Muestras:** Añada 5 µL de eluato a cada mezcla maestra prepipeteada.

**Controles:** Añada 5 µL del **Control A** a cada mezcla maestra prepipeteada.

Añada 5 µL del **Control B** a cada mezcla maestra prepipeteada.

Tape las placas, centrifugue brevemente a baja velocidad y colóquelas en el equipo de PCR en tiempo real. Inicie la PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 4 y 5).



### 9.3 Configuración del dispositivo

#### 9.3.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®GENE, el kit RIDA®GENE Lac Intol se verificó en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí. Por lo tanto, la transcripción inversa es lo primero en el perfil universal.

**Tabla 4:** Perfil universal de PCR en tiempo real en el equipo LightCycler® 480 II

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Tiempo de almacenamiento

**Nota:** La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

**Tabla 5:** Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en el ABI 7500 Fast Dx y CFX96™ Dx

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Tiempo de almacenamiento

**Nota:** La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

## 9.4 Configuración del canal de detección

**Tabla 6:** Selección de los canales de detección adecuados

Dispositivo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	C13910 (WT)	465/510	<b>Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).</b>
	C13910T (Mut)	533/580	
	G22018 (WT)	533/610	
	G22018A (Mut)	618/660	
<b>Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	<b>Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en Ninguno.</b>
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	-
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	

## 10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan con el software de análisis del equipo de PCR en tiempo real, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El **Control A** y el **Control B** deben indicar los resultados correctos (consulte la tabla 7).

El **Control A** y el **Control B** están presentes cada uno en una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ L. Se usa en una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias en cada corrida de PCR.

**Tabla 7:** Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	FAM	ROX	VIC	Cy5	Ct de genes diana
Control A	+	+	-	-	Ver Certificate of Analysis
Control B	-	-	+	+	Ver Certificate of Analysis

\* + = positivo  
- = negativo

Si ambos controles, el **Control A** y el **Control B** no se ajustan a las especificaciones, deberá repetirse toda la ejecución de la PCR. Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Ejecución de la prueba correcta

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

## 11. Interpretación de los resultados

Los resultados de la muestra se interpretan según la tabla 8.

**Tabla 8:** Interpretación de los resultados\*

Detección de				Resultado
C13910 (WT)	C13910T (Mut)	G22018 (WT)	G22018A (Mut)	
+	-	+	-	Tipo natural homocigoto 13910 Tipo natural homocigoto 22018
+	-	+	+	Tipo natural homocigoto 13910 Heterocigoto 22018
+	+	-	+	Heterocigoto 13910 Mutación homocigótica 22018
+	+	+	-	Heterocigoto 13910 Tipo natural homocigoto 22018
+	+	+	+	Heterocigoto 13910 Heterocigoto 22018
-	+	+	-	Mutación homocigótica 13910 Tipo natural homocigoto 22018
+	-	-	+	Tipo natural homocigoto 13910 Mutación homocigótica 22018
-	+	-	+	Mutación homocigótica 13910 Mutación homocigótica 22018
-	+	+	+	Mutación homocigótica 13910 Heterocigoto 22018
-	-	+ / -	+ / -	no válido
+ / -	+ / -	-	-	no válido
-	-	-	-	no válido

\* + = positivo  
- = negativo

**Nota:** Cuando se utilizan el LightCycler® 480 II (Roche), el CFX96™ Dx (Biorad) y el ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems), el nivel de fluorescencia de una señal verdaderamente positiva en el canal VIC debe ser al menos el 20 % de la señal de fluorescencia del control B. Para una evaluación más definitiva, se recomienda fijar el umbral en este límite (20 % del control B).

La corrida de PCR no puede evaluarse si los controles no presentan amplificación en el sistema de detección. Debe repetirse la corrida de PCR entera.

La corrida de PCR no puede evaluarse si la muestra no presenta amplificación en el sistema de detección. En este caso, o bien no se añadió el ADN o se utilizó una plantilla de ADN inadecuada (calidad, inhibidor de la PCR). La muestra extraída debe amplificarse de nuevo o se deben mejorar el aislamiento y la limpieza de la muestra.

## 12. Limitaciones del método

1. La prueba RIDA®GENE Lac Intol detecta C13910 y G22018 o sus posibles SNP (polimorfismos de nucleótido único) C13910T y G22018A en el gen *MCM6* humano a partir de muestras de sangre entera humana con EDTA. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Este ensayo es válido solo para muestras de sangre entera humana con EDTA.
4. La extracción, transporte, almacenamiento y manejo inapropiados de la muestra pueden producir resultados falso negativos.
5. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
6. Se detectan intercambios de bases individuales para la tecnología SNP utilizada. Esto puede afectar negativamente al nivel de fluorescencia del punto final.
7. Este ensayo debe realizarse de acuerdo con la normativa sobre buenas prácticas de laboratorio. Los usuarios deben seguir con precisión las instrucciones del fabricante al realizar el ensayo.
8. La Ley alemana en materia de diagnóstico genético (GenDG) exige una explicación exhaustiva y un consentimiento por escrito de los pacientes para todos los análisis genéticos, de conformidad con la GenDG.

## 13. Características de rendimiento

### 13.1. Características de rendimiento analítico

#### 13.1.1 Especificidad analítica

##### Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de la PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados no válidos. Por lo tanto, deben investigarse los efectos de diferentes sustancias que podrían estar presentes en las muestras correspondientes debido a su amplio uso.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados de las pruebas se examinaron a altas concentraciones (simulación del peor caso) en un cribado de interferencia.

No se determinaron interferencias para las sustancias enumeradas en la tabla 9.

**Tabla 9:** Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Medunasal Heparin 500 I.U. Ampollas (heparina)	15 U/mL
Colesterol	3 mg/mL
Bilirrubina	0,1 mg/mL
Hemoglobina	0,2 mg/mL
K <sub>2</sub> EDTA	1,8 mg/mL

#### 13.1.2 Precisión

Se determinó la precisión del kit Lac Intol para los siguientes niveles de evaluación.

Precisión intraensayo: determinación de 7 muestras de control con 20 réplicas cada una en el LightCycler® 480 II en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de 7 muestras de control en 20 ensayos por duplicado en 10 días de trabajo (2 corridas por día) realizadas por dos técnicos diferentes en condiciones reproducibles.

las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los datos de precisión se determinaron con siete muestras de control, así como con el control A y el control B asociados al ensayo.

El máximo coeficiente de variación obtenido de las mediciones con el kit RIDA®GENE Lac Intol en el LightCycler® 480 II fue del 8,72 %.

**Tabla 12:** Resultados de la precisión del kit Lac Intol para el canal FAM.

Valor medio de Ct/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	23,3	23,4	22,9	23,6	24,2	24,2	24,0
	CV (%)	0,84 %	1,10 %	2,52 %	3,34 %	2,46 %	2,27 %	2,99 %
2	Ct	23,4	23,6	23,2	23,8	24,1	24,3	24,1
	CV (%)	1,46 %	0,95 %	1,80 %	2,22 %	2,37 %	2,20 %	2,44 %
3	Ct	23,6	23,8	23,6	23,9	24,2	24,6	24,2
	CV (%)	0,67 %	1,02 %	1,18 %	2,80 %	2,22 %	2,34 %	2,83 %
4	Ct	24,4	24,6	24,5	24,3	24,5	25,0	24,6
	CV (%)	1,41 %	1,01 %	1,14 %	2,91 %	2,46 %	2,63 %	2,96 %
5	Ct	24,1	24,2	23,9	24,0	24,3	24,6	24,3
	CV (%)	0,88 %	1,13 %	0,96 %	2,78 %	2,42 %	2,01 %	2,59 %
6	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

**Tabla 13:** Resultados de la precisión del kit Lac Intol para el canal VIC.

Valor medio de Ct/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	28,0	27,0	27,5	28,4	28,9	28,1	28,5
	CV (%)	1,81 %	2,13 %	3,62 %	2,71 %	2,70 %	4,38 %	3,58 %
3	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
4	Ct	31,2	29,4	28,9	28,5	29,1	28,3	28,7
	CV (%)	5,35 %	8,72 %	1,75 %	2,42 %	2,03 %	3,86 %	3,15 %
5	Ct	28,7	28,0	27,3	27,2	27,3	27,0	27,2
	CV (%)	2,41 %	6,02 %	3,44 %	1,75 %	1,73 %	2,84 %	2,21 %
6	Ct	27,5	26,5	26,8	26,9	26,9	26,8	26,9
	CV (%)	1,40 %	1,33 %	0,97 %	1,30 %	1,46 %	1,34 %	1,37 %
7	Ct	25,9	25,8	25,6	26,5	26,7	26,2	26,5
	CV (%)	0,87 %	1,36 %	0,88 %	1,63 %	1,04 %	1,75 %	1,75 %



**Tabla 14:** Resultados de la precisión del kit Lac Intol para el canal ROX.

Valor medio de Ct/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	23,4	23,2	23,3	24,0	24,4	24,5	24,3
	CV (%)	0,95 %	1,08 %	1,89 %	2,47 %	2,16 %	2,07 %	2,46 %
2	Ct	23,7	23,5	24,0	24,4	24,5	24,8	24,6
	CV (%)	1,00 %	0,81 %	1,56 %	1,98 %	2,07 %	1,69 %	2,06 %
3	Ct	23,6	23,4	23,9	24,2	24,4	24,9	24,5
	CV (%)	0,64 %	1,35 %	1,46 %	2,43 %	2,25 %	2,23 %	2,61 %
4	Ct	24,7	25,1	24,7	24,8	25,0	25,3	25,1
	CV (%)	1,22 %	1,24 %	1,28 %	2,52 %	2,34 %	2,33 %	2,53 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
6	Ct	24,2	24,4	24,0	24,4	24,4	24,6	24,4
	CV (%)	0,94 %	1,32 %	1,10 %	2,71 %	2,40 %	2,60 %	2,57 %
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

**Tabla 15:** Resultados de la precisión del kit Lac Intol para el canal Cy5.










Valor medio de Ct/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
3	Ct	25,5	26,0	28,3	25,7	26,1	27,0	26,3
	CV (%)	1,06 %	1,54 %	4,10 %	2,74 %	3,19 %	3,69 %	4,06 %
4	Ct	25,9	26,2	26,2	26,2	26,4	27,4	26,7
	CV (%)	1,62 %	2,90 %	1,54 %	3,48 %	2,86 %	3,19 %	3,95 %
5	Ct	25,3	25,6	25,7	25,7	25,8	26,5	26,0
	CV (%)	0,95 %	1,84 %	0,61 %	2,17 %	2,11 %	1,75 %	2,55 %
6	Ct	25,5	25,8	25,7	26,0	26,0	26,4	26,1
	CV (%)	1,29 %	1,03 %	0,99 %	3,33 %	2,59 %	3,05 %	3,07 %
7	Ct	25,4	25,5	25,8	25,4	25,5	26,1	25,7
	CV (%)	0,90 %	1,16 %	0,86 %	2,28 %	1,94 %	2,28 %	2,58 %

## 14. Historial de versiones





Número de versión	Sección y designación
2022-05-11	Versión de lanzamiento

## 15. Explicación de los símbolos

### Símbolos generales

	Para el uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Observe el manual de funcionamiento
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

	Mezcla de reacción
	Polimerasa Taq
	Control A
	Control B

## 16. Bibliografía

1. Toca MDC, Fernández A, Orsi M, Tabacco O, Vinderola G. Lactose intolerance: myths and facts. An update. *Arch Argent Pediatr*. 2022;120(1):59-66.
2. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*. 2019;68(11):2080-91.
3. Morelli L, Amrani N, Goulet O, Lukito W. Lactose Intolerance Clinical Symptoms, Diagnosis and Treatment. *Global Diabetes Open Access Journal*. 2019;1(1):1-10
4. Catanzaro R, Sciuto M, Marotta F. Lactose Intolerance—Old and New Knowledge on Pathophysiological Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2021;3:499-509.
5. Anguita-Ruiz A, Aguilera CM, Gil Á. Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients*. 2020;12(9).
6. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005



# RIDA® GENE Lac Intol

**REF** PY4215

## 1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Le test RIDA® GENE Lac Intol, qui est réalisé sur le LightCycler® 480 II, est une PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et la différenciation de C13910 et G22018 ainsi que de leurs SNP (polymorphismes nucléotidiques simples) C13910T et G22018A dans le gène MCM6 humain à partir d'échantillons de sang total EDTA humain provenant de personnes présentant des signes et des symptômes d'intolérance au lactose.

Le test RIDA® GENE Lac Intol est destiné à soutenir le diagnostic des patients présentant des symptômes d'intolérance au lactose conjointement à d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Le résultat du test ne doit pas être utilisé comme seule base de diagnostic.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

## 2. Résumé et explication du test

Le lactose, un disaccharide composé de galactose et de glucose, est la principale source d'énergie du lait chez les humains et les animaux.

La liaison glycosidique  $\beta$ -(1,4) peut être brisée par la lactase, rendant ainsi les monosaccharides disponibles pour une utilisation ultérieure<sup>(1)</sup>. La décomposition et l'adsorption ont lieu dans l'intestin grêle. Les monosaccharides sont ensuite transportés à l'intérieur des cellules épithéliales (entérocytes)<sup>(2)</sup>. La quantité de lactase augmente pendant la grossesse et atteint sa valeur maximale quelques jours après la naissance. La teneur en lactase diminue au cours de la vie grâce à des régulateurs au niveau génétique<sup>(1)</sup>. Pourtant, 50 % de l'activité du lactase est suffisante pour décomposer efficacement le lactose<sup>(3)</sup>. Si le lactose ne peut être décomposé qu'en petites quantités ou pas du tout, cela entraîne une charge osmotique excessive et augmente la teneur en eau dans l'intestin. En outre, le lactose pénètre dans le gros intestin, où il fermente sous l'action des bactéries intestinales, ce qui contribue à la production d'acides gras à chaîne courte et de gaz tels que l'hydrogène, le dioxyde de carbone et le méthane<sup>(4)</sup>. En contrepartie, cela peut provoquer des symptômes cliniques tels que ballonnements, douleurs abdominales, crampes et/ou lourdeur postprandiale, éructations, diarrhée et, dans

certains cas, constipation, nausées et vomissements<sup>(1,4)</sup>. Le gène codant pour la lactase s'appelle *LCT* et est situé sur le chromosome 2. Le gène *MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6), qui est situé à environ 14 kb en amont du gène de la lactase, fonctionne comme un amplificateur. Différents polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) dont 13910 C/T et 22018 G/A dans ce gène sont associés à la persistance de la lactase. Ce changement conduit à de nouveaux sites de liaison des facteurs de transcription, contribuant ainsi à l'expression permanente du gène *LCT*<sup>(2,4,5)</sup>. L'intolérance au lactose n'est donc pas une maladie ; sa prévalence mondiale est de 57 % et plus<sup>(2,3)</sup>. Elle varie d'une région à l'autre. La prévalence moyenne en Europe est de 28 %, mais elle s'échelonne de 2 % en Scandinavie à 70 % en Sicile<sup>(2)</sup>.

### 3. Principe du test

Le test RIDA®GENE Lac Intol est une PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative et la différenciation de C13910 et G22018 ainsi que de leurs éventuels SNP (polymorphismes nucléotidiques simples) C13910T et G22018A dans le gène *MCM6* humain à partir d'échantillons de sang total EDTA humain. Après isolement de l'ADN, les fragments de gènes spécifiques sont amplifiés, qu'il s'agisse d'un type sauvage ou d'une mutation.

Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-Polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés.

### 4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans le kit permettent de faire 100 déterminations.

**Tableau 1** :Contenu du paquet

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du bouchon
1	Reaction Mix	2 ×	1 050 µL	jaune, prêt à l'emploi
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	rouge, prêt à l'emploi
A	Control A	1 ×	200 µL	bleu, prêt à l'emploi
B	Control B	1 ×	200 µL	vert, prêt à l'emploi

## 5. Instructions de conservation des réactifs

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (p. ex., dans un réfrigérateur à 2 - 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 5 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 - 8 °C).

**Tableau 2** : Informations et conditions de conservation

	Température de conservation	Durée maximale de conservation
non ouvert	-20 °C	Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette
ouvert	-20 °C	5 cycles de congélation-décongélation



## 6. Réactifs requis, mais non fournis

### 6.1 Matériel de laboratoire

Le matériel suivant est nécessaire pour utiliser le kit RIDA®GENE Lac Intol :

Matériel
Plateforme d'extraction : Instrument MagNA Pure 96 (Roche)
Dispositifs de PCR en temps réel : <ul style="list-style-type: none"><li>• LightCycler® 480 II (Roche)</li><li>• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)</li><li>• CFX96™ Dx (Bio-Rad)</li></ul>
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) pour une utilisation avec LightCycler® 480 II
Consommables de PCR en temps réel (plaques [profil bas, puits blancs, support transparent], flacons de réaction, lames)
Centrifugeuse avec rotor pour plaques
Agitateur-mélangeur vortex
Pipettes (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1 000 µL)
Pointes de pipettes dotées de filtres
Gants jetables non poudrés

Le kit RIDA®GENE Lac Intol peut être utilisé en conjonction avec des flux de travail compatibles. Les autres procédures d'extraction des acides nucléiques et dispositifs de PCR en temps réel doivent être vérifiés/validés par l'utilisateur. Veuillez contacter R-Biopharm AG pour vérifier la compatibilité à l'adresse [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce test doit être réalisé uniquement par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.

Toujours respecter strictement le manuel d'utilisation lors de la réalisation du test.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec des plaies et des membranes muqueuses.

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.

Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons.

Des pièces séparées, des vêtements spéciaux et des instruments pour l'extraction, la préparation de la PCR et la réalisation de la PCR doivent être utilisés pour éviter la contamination croisée et les résultats faux positifs.

Éviter de contaminer les échantillons et les composants du kit avec des microbes et des nucléases (DNase/RNase).

Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.

Ne pas échanger ou mélanger les composants (Reaction Mix, Taq Polymerase, Control A, Control B) d'un lot d'un kit avec les composants d'un autre lot.

Ne pas utiliser le kit de test après sa date de péremption. Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de l'élimination correcte de tous les réactifs et matériaux. Pour l'élimination, respecter les règlements nationaux.

De plus amples informations sur la fiche de données de sécurité (Safety Data Sheet, SDS) sont disponibles sous le numéro d'article à l'adresse suivante

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Pour les utilisateurs de l'Union européenne : signaler tout événement indésirable grave associé au produit à R-Biopharm AG et aux autorités nationales compétentes.

## **8. Prélèvement et conservation des échantillons**

### **8.1 Conservation des échantillons**

Ce test a été développé dans le but d'examiner des échantillons de sang total humain EDTA. Les échantillons doivent être conservés à température ambiante pendant 24 heures maximum et à 2 - 8 °C pendant 72 heures maximum avant l'extraction de l'ADN<sup>6</sup>. La contamination microbienne des échantillons doit être évitée. L'utilisation de sérums lipémiques, hémolytiques, ictériques ou opaques inactivés par la chaleur risque de donner lieu à des résultats faussés.

### **8.2 Préparation de l'échantillon**

#### **8.2.1 Isolement de l'ADN dans le sang total EDTA**

Pour l'isolement de l'ADN du sang total EDTA, il est recommandé d'utiliser un kit d'isolement d'ADN ou un système d'extraction d'ADN du commerce (p. ex., Instrument MagNA Pure 96 [Roche]). Il convient de respecter les instructions du fabricant.

En cas d'utilisation de l'instrument MagNA Pure 96 (Roche), extraire 200 µL d'ADN de sang total EDTA en utilisant le kit DNA/Viral NA SV et le protocole Pathogen Universal 200. Éluer l'ADN avec 50 µL de tampon d'élution.

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Il est nécessaire de calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Le contrôle A et le contrôle B doivent être exécutés lors de chaque analyse.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume en plus au mélange maître afin de compenser la perte au pipetage (voir le tableau 3). Avant utilisation, décongeler les **Reaction Mix**, **Taq-Polymerase**, **Control A** et **Control B**, les mélanger au vortex (sauf pour la Taq polymérase) et les centrifuger pendant un court instant. Les réactifs doivent toujours être refroidis de manière appropriée pendant les étapes de travail (2 - 8 °C).

**Tableau 3** : Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

### 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µL du mélange maître dans chaque flacon de réaction (plaques).

**Échantillons :** Ajouter 5 µL d'éluat à chaque mélange maître pré-pipeté.

**Contrôles :** Ajouter 5 µL de **Control A** à chaque mélange maître pipeté au préalable.

Ajouter 5 µL de **Control B** à chaque mélange maître pipeté au préalable.

Fermer hermétiquement les plaques, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon la configuration de l'instrument de PCR (voir les tableaux 4 et 5).

## 9.3 Réglages du dispositif

### 9.3.1 Profil universel de PCR en temps réel

Pour harmoniser les tests RIDA®GENE, le kit RIDA®GENE Lac Intol a été vérifié par rapport au profil universel. Il est ainsi possible de combiner les tests ADN et ARN entre eux. La transcription inverse arrive donc en premier dans le profil universel.

**Tableau 4 :** Profil universel de PCR en temps réel pour LightCycler® 480 II

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Maximum

**Remarque :** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 5 :** Profil universel de RT-PCR en temps réel pour ABI 7500 Fast Dx et CFX96™ Dx

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Maximum

**Remarque :** L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

## 9.4 Réglage du canal de détection

**Tableau 6** : Sélection des canaux de détection adéquats

Dispositif de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	C13910 (WT)	465/510	<b>Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.</b>
	C13910T (Mut)	533/580	
	G22018 (WT)	533/610	
	G22018A (Mut)	618/660	
<b>Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	<b>Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.</b>
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	-
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	

## 10. Contrôle qualité - signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel, conformément aux instructions du fabricant. **Control A** et **Control B** doivent présenter des résultats corrects (voir tableau 7).

**Control A** et **Control B** doivent être présents selon une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ L. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de  $5 \times 10^3$  copies.

**Tableau 7 :** Pour être valide, une analyse de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	FAM	ROX	VIC	Cy5	Ct gène cible
Control A	+	+	-	-	Voir Certificate of Analysis
Control B	-	-	+	+	Voir Certificate of Analysis

\* + = positif  
- = négatif

Si les deux contrôles, **Control A** et **Control B**, ne sont pas conformes aux spécifications, l'ensemble du cycle PCR doit être répété. Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Procédure de test correcte

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir renouvelé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats de l'échantillon sont interprétés selon le tableau 8.

**Tableau 8** : Interprétation des résultats\*

Détection de				Résultat
C13910 (WT)	C13910T (Mut)	G22018 (WT)	G22018A (Mut)	
+	-	+	-	Type sauvage homozygote 13910 Type sauvage homozygote 22018
+	-	+	+	Type sauvage homozygote 13910 Hétérozygote 22018
+	+	-	+	Hétérozygote 13910 Mutation homozygote 22018
+	+	+	-	Hétérozygote 13910 Type sauvage homozygote 22018
+	+	+	+	Hétérozygote 13910 Hétérozygote 22018
-	+	+	-	Mutation homozygote 13910 Type sauvage homozygote 22018
+	-	-	+	Type sauvage homozygote 13910 Mutation homozygote 22018
-	+	-	+	Mutation homozygote 13910 Mutation homozygote 22018
-	+	+	+	Mutation homozygote 13910 Hétérozygote 22018
-	-	+ / -	+ / -	non valide
+ / -	+ / -	-	-	non valide
-	-	-	-	non valide

\* + = positif  
- = négatif

Remarque : Lorsque l'on utilise le LightCycler® 480 II (Roche), le CFX96™ Dx (Biorad) et l'ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems), le niveau de fluorescence d'un signal réellement positif dans le canal VIC doit représenter au moins 20 % du signal de fluorescence du contrôle B. Pour une évaluation plus concluante, il est recommandé de fixer le seuil à cette limite (20 % du contrôle B).

L'analyse de la PCR ne peut pas être évaluée si les contrôles ne présentent aucune amplification dans le système de détection. Il faut recommencer la PCR dans son ensemble.



L'analyse de la PCR ne peut pas être évaluée si l'échantillon ne présente aucune amplification dans le système de détection. Dans ce cas, soit l'ADN n'a pas été ajouté, soit un ADN matrice inadapté (qualité, inhibiteurs de PCR) a été utilisé. Il faut renouveler l'amplification de l'échantillon extrait ou améliorer l'isolation et le nettoyage de l'échantillon.

## 12. Limites de la méthode

1. Le test RIDA®GENE Lac Intol détecte C13910 et G22018 et/ou leurs possibles SNP (polymorphismes nucléotidiques simples) C13910T et G22018A dans le gène *MCM6* humain à partir d'échantillons de sang total EDTA humain. Ce test ne permet pas d'établir de rapport entre la valeur de Ct mesurée et la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
2. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
3. Ce test est seulement valide pour des échantillons de sang total EDTA humain.
4. Si l'extraction, le transport, la conservation et la manipulation sont incorrects, il est possible d'obtenir des résultats faux négatifs.
5. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
6. Les échanges de bases individuels sont détectés pour la technologie SNP utilisée. Cela peut avoir un effet négatif sur le niveau de fluorescence du point final.
7. Ce test doit être réalisé en conformité avec la réglementation sur les bonnes pratiques de laboratoire. Les utilisateurs doivent suivre précisément les instructions du fabricant lors de la réalisation du test.
8. La loi allemande sur le diagnostic génétique (GenDG) exige une explication approfondie et un consentement écrit des patients conforme à GenDG pour toutes les analyses génétiques.

## 13. Performances

### 13.1 Performances analytiques

#### 13.1.1 Spécificité analytique

##### Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la PCR et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats non valides. Par conséquent, les effets de diverses substances qui pourraient être présentes dans les échantillons correspondants en raison de leur présence répandue doivent être étudiés.

Les substances susceptibles d'influencer de manière significative les résultats des tests ont été examinées à des concentrations élevées (simulation du pire cas) dans un test d'interférence.

Aucune interférence n'a été identifiée pour les substances figurant dans le tableau 9.

**Tableau 9** : Substances potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration
Medunasal Héparine 500 U.I. Ampoules (héparine)	15 U/mL
Cholestérol	3 mg/mL
Bilirubine	0,1 mg/mL
Hémoglobine	0,2 mg/mL
K <sub>2</sub> EDTA	1,8 mg/mL

#### 13.1.2 Précision

La précision du kit Lac Intol a été déterminée pour les niveaux d'évaluation suivants.

Précision *intra*-essai : déterminée sur 7 échantillons de contrôle, à raison de 20 réplicats par échantillon, sur le LightCycler® 480 II dans des conditions identiques.

Précision *inter*-essais : déterminée sur 7 échantillons de contrôle testés en double au cours de 20 analyses réalisées sur 10 jours (2 analyses par jour) par deux opérateurs dans des conditions reproductibles.

Les tests de précision *intra*-essai et *inter*-essais ont été réalisés à l'aide de trois lots différents.

Les données de précision ont été déterminées avec sept échantillons de contrôle ainsi qu'avec le contrôle A et le contrôle B associés à l'essai.

Le coefficient de variation maximal obtenu pour chaque mesure avec le kit RIDA®GENE Lac Intol sur LightCycler® 480 II était de 8,72 %.

**Tableau 12 :** Résultats de la précision du kit Lac Intol pour le canal FAM.

Valeur Ct moyenne/ CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3
1	Ct	23,3	23,4	22,9	23,6	24,2	24,2	24,0
	CV (%)	0,84 %	1,10 %	2,52 %	3,34 %	2,46 %	2,27 %	2,99 %
2	Ct	23,4	23,6	23,2	23,8	24,1	24,3	24,1
	CV (%)	1,46 %	0,95 %	1,80 %	2,22 %	2,37 %	2,20 %	2,44 %
3	Ct	23,6	23,8	23,6	23,9	24,2	24,6	24,2
	CV (%)	0,67 %	1,02 %	1,18 %	2,80 %	2,22 %	2,34 %	2,83 %
4	Ct	24,4	24,6	24,5	24,3	24,5	25,0	24,6
	CV (%)	1,41 %	1,01 %	1,14 %	2,91 %	2,46 %	2,63 %	2,96 %
5	Ct	24,1	24,2	23,9	24,0	24,3	24,6	24,3
	CV (%)	0,88 %	1,13 %	0,96 %	2,78 %	2,42 %	2,01 %	2,59 %
6	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
7	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o

**Tableau 13 :** Résultats de la précision du kit Lac Intol pour le canal VIC.

Valeur Ct moyenne/ CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3
1	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	28,0	27,0	27,5	28,4	28,9	28,1	28,5
	CV (%)	1,81 %	2,13 %	3,62 %	2,71 %	2,70 %	4,38 %	3,58 %
3	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
4	Ct	31,2	29,4	28,9	28,5	29,1	28,3	28,7
	CV (%)	5,35 %	8,72 %	1,75 %	2,42 %	2,03 %	3,86 %	3,15 %
5	Ct	28,7	28,0	27,3	27,2	27,3	27,0	27,2
	CV (%)	2,41 %	6,02 %	3,44 %	1,75 %	1,73 %	2,84 %	2,21 %
6	Ct	27,5	26,5	26,8	26,9	26,9	26,8	26,9
	CV (%)	1,40 %	1,33 %	0,97 %	1,30 %	1,46 %	1,34 %	1,37 %
7	Ct	25,9	25,8	25,6	26,5	26,7	26,2	26,5
	CV (%)	0,87 %	1,36 %	0,88 %	1,63 %	1,04 %	1,75 %	1,75 %

**Tableau 14 :** Résultats de la précision du kit Lac Intol pour le canal ROX.

Valeur Ct moyenne/ CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3
1	Ct	23,4	23,2	23,3	24,0	24,4	24,5	24,3
	CV (%)	0,95 %	1,08 %	1,89 %	2,47 %	2,16 %	2,07 %	2,46 %
2	Ct	23,7	23,5	24,0	24,4	24,5	24,8	24,6
	CV (%)	1,00 %	0,81 %	1,56 %	1,98 %	2,07 %	1,69 %	2,06 %
3	Ct	23,6	23,4	23,9	24,2	24,4	24,9	24,5
	CV (%)	0,64 %	1,35 %	1,46 %	2,43 %	2,25 %	2,23 %	2,61 %
4	Ct	24,7	25,1	24,7	24,8	25,0	25,3	25,1
	CV (%)	1,22 %	1,24 %	1,28 %	2,52 %	2,34 %	2,33 %	2,53 %
5	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
6	Ct	24,2	24,4	24,0	24,4	24,4	24,6	24,4
	CV (%)	0,94 %	1,32 %	1,10 %	2,71 %	2,40 %	2,60 %	2,57 %
7	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o

**Tableau 15 :** Résultats de la précision du kit Lac Intol pour le canal Cy5.










Valeur Ct moyenne/ CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3
1	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
3	Ct	25,5	26,0	28,3	25,7	26,1	27,0	26,3
	CV (%)	1,06 %	1,54 %	4,10 %	2,74 %	3,19 %	3,69 %	4,06 %
4	Ct	25,9	26,2	26,2	26,2	26,4	27,4	26,7
	CV (%)	1,62 %	2,90 %	1,54 %	3,48 %	2,86 %	3,19 %	3,95 %
5	Ct	25,3	25,6	25,7	25,7	25,8	26,5	26,0
	CV (%)	0,95 %	1,84 %	0,61 %	2,17 %	2,11 %	1,75 %	2,55 %
6	Ct	25,5	25,8	25,7	26,0	26,0	26,4	26,1
	CV (%)	1,29 %	1,03 %	0,99 %	3,33 %	2,59 %	3,05 %	3,07 %
7	Ct	25,4	25,5	25,8	25,4	25,5	26,1	25,7
	CV (%)	0,90 %	1,16 %	0,86 %	2,28 %	1,94 %	2,28 %	2,58 %

## 14 Historique des versions





Numéro de version	Section et désignation
2022-05-11	Version de la publication

## 15 Signification des symboles

### Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Respecter le manuel d'utilisation
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de conservation
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

### Symboles spécifiques aux tests

	Mélange réactionnel
	Taq polymérase
	Control A
	Control B

## 16 Références

1. Toca MDC, Fernández A, Orsi M, Tabacco O, Vinderola G. Lactose intolerance: myths and facts. An update. *Arch Argent Pediatr*. 2022;120(1):59-66.
2. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*. 2019;68(11):2080-91.
3. Morelli L, Amrani N, Goulet O, Lukito W. Lactose Intolerance Clinical Symptoms, Diagnosis and Treatment. *Global Diabetes Open Access Journal*. 2019;1(1):1-10
4. Catanzaro R, Sciuto M, Marotta F. Lactose Intolerance—Old and New Knowledge on Pathophysiological Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2021;3:499-509.
5. Anguita-Ruiz A, Aguilera CM, Gil Á. Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients*. 2020;12(9).
6. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005





# RIDA®GENE Lac Intol

REF PY4215

## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*.

Il test RIDA®GENE Lac Intol, eseguito su LightCycler® 480 II, è una PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa e la differenziazione di C13910 e G22018 e dei loro SNP (polimorfismi a singolo nucleotide) C13910T e G22018A nel gene MCM6 umano da campioni di sangue intero con EDTA di soggetti con segni e sintomi di intolleranza al lattosio.

Il test RIDA®GENE Lac Intol è concepito per supportare la diagnosi nei pazienti con sintomi di intolleranza al lattosio in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati dei test non devono essere usati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Il lattosio, un disaccaride composto da galattosio e glucosio, è la principale fonte energetica del latte per l'uomo e gli animali.

Il legame glicosidico  $\beta$ -(1,4) può essere scisso dall'enzima lattasi; in questo modo i due monosaccaridi diventano disponibili per l'organismo <sup>(1)</sup>. La scissione e l'assorbimento avvengono nell'intestino tenue. I monosaccaridi vengono successivamente trasportati all'interno delle cellule epiteliali (enterociti) <sup>(2)</sup>. La quantità di lattasi aumenta durante la gravidanza e raggiunge il valore massimo pochi giorni dopo la nascita. I livelli di lattasi diminuiscono naturalmente nel corso della vita per effetto di regolatori a livello genetico <sup>(1)</sup>. Tuttavia, il 50% dell'attività dell'enzima è sufficiente per scindere il lattosio adeguatamente <sup>(3)</sup>. Se la scissione del lattosio è insufficiente o del tutto assente, il carico osmotico diventa eccessivo e il contenuto di liquidi nell'intestino aumenta. Inoltre, il lattosio arriva nell'intestino crasso, dove fermenta per l'azione della flora batterica intestinale, contribuendo alla produzione di acidi grassi a catena corta e di gas come idrogeno, anidride carbonica e metano <sup>(4)</sup>. Questo, a sua volta, può causare sintomi clinici come gonfiore, dolore addominale, crampi e/o senso di ripienezza postprandiale, eruttazioni, diarrea e in alcuni casi costipazione, nausea e vomito <sup>(1,4)</sup>. Il gene che codifica per la lattasi si chiama *LCT* ed è localizzato sul cromosoma 2. Il gene *MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6), che si trova circa 14 Kb a monte del gene della

lattasi, funziona come intensificatore. Diversi polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), tra cui 13910 C/T e 22018 G/A in questo gene, sono associati alla persistenza della lattasi. Questo cambiamento porta a nuovi siti di legame dei fattori di trascrizione, contribuendo così all'espressione del gene *LCT* nel corso della vita <sup>(2,4,5)</sup>. Pertanto l'intolleranza al lattosio non è una malattia; la sua prevalenza globale è del 57% e oltre <sup>(2,3)</sup>. La prevalenza varia in base alla regione. L'Europa ha una prevalenza media del 28%, con valori che variano dal 2% in Scandinavia al 70% in Sicilia <sup>(2)</sup>.

### 3. Principio del test

Il test RIDA®GENE Lac Intol è una PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa e la differenziazione di C13910 e G22018 e dei loro possibili SNP (polimorfismi a singolo nucleotide) C13910T e G22018A nel gene *MCM6* umano in campioni di sangue umano intero con EDTA. Dopo l'isolamento del DNA, i frammenti di geni specifici vengono amplificati come wild type o come mutazione.

Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target, le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-Polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica di uno strumento di PCR real-time. Il segnale fluorescente aumenta con la quantità di ampliconi formati.

### 4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni.

**Tabella 1:** Contenuto della confezione

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del tappo
<b>1</b>	<b>Reaction Mix</b>	2 ×	1050 µL	giallo, pronto per l'uso
<b>2</b>	<b>Taq-Polymerase</b>	1 ×	80 µL	rosso, pronto per l'uso
<b>Per</b>	<b>Control A</b>	1 ×	200 µL	blu, pronto per l'uso
<b>B</b>	<b>Control B</b>	1 ×	200 µL	verde, pronto per l'uso

## 5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C, e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2–8 °C).
- Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento (fino a 5 volte) non influiscono sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (2–8 °C).

**Tabella 2:** Condizioni di conservazione e informazioni

	Temperatura di conservazione	Tempo massimo di conservazione
prima dell'apertura	-20 °C	Utilizzabile fino alla data di scadenza indicata
dopo l'apertura	-20 °C	5 cicli di congelamento e scongelamento

## 6. Reagenti necessari ma non forniti

### 6.1 Attrezzatura di laboratorio

Per utilizzare il kit RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Piattaforma di estrazione: Strumento MagNA Pure 96 (Roche)
Dispositivi per PCR real-time: <ul style="list-style-type: none"><li>• LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche)</li><li>• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)</li><li>• CFX96<sup>™</sup> Dx (Bio-Rad)</li></ul>
RIDA <sup>®</sup> GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) per l'uso con il LightCycler <sup>®</sup> 480 II
Materiali di consumo per PCR real-time (piastre [profilo basso, pozzetti bianchi, telaio trasparente], cuvette di reazione, vetrini)
Centrifuga con rotore per piastre
Agitatore a vortice
Pipette (0,5–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL)
Puntali per pipette con filtri
Guanti monouso senza talco

Il kit RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol può essere utilizzato in combinazione con flussi di lavoro compatibili. Procedure alternative di estrazione dell'acido nucleico e dispositivi di PCR real-time diversi da quelli indicati devono essere verificati/convalidati dall'utente. Contattare R-Biopharm AG per verificare la compatibilità all'indirizzo [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'eseguire il test attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.

Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Per prevenire la contaminazione crociata e risultati falsi positivi è necessario utilizzare stanze separate e indumenti e strumenti dedicati per l'estrazione, la preparazione e l'esecuzione della PCR.

Evitare di contaminare i campioni e i componenti del kit con microbi e nucleasi (DNase/RNase).

I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

Non scambiare o mescolare i componenti (Reaction Mix, Taq Polymerase, Control A, Control B) di un lotto di un kit con i componenti di un altro lotto.

Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Gli operatori sono tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Per gli utenti nell'Unione europea: segnalare tutti gli eventi avversi gravi associati al prodotto a R-Biopharm AG e alle autorità nazionali competenti.

## **8. Raccolta e conservazione dei campioni**

### **8.1 Conservazione del campione**

Questo test è stato sviluppato per l'esame di campioni di sangue intero umano con EDTA. I campioni devono essere conservati a temperatura ambiente per un massimo di 24 ore e a 2–8 °C per un massimo di 72 ore fino all'estrazione del DNA <sup>(6)</sup>. Evitare la contaminazione microbica dei campioni. L'uso di sieri lipemici, emolitici, itterici od opachi inattivati dal calore potrebbe produrre risultati anomali.

### **8.2 Preparazione dei campioni**

#### **8.2.1 Isolamento del DNA dal sangue intero con EDTA**

Per isolare il DNA da sangue intero con EDTA si raccomanda un kit di isolamento del DNA o un sistema di estrazione del DNA disponibile in commercio (ad esempio MagNA Pure 96 (Roche)). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Se si utilizza lo strumento MagNA Pure 96 (Roche), estrarre 200 µL di DNA da sangue intero con EDTA utilizzando il kit DNA/Viral NA SV e il protocollo Pathogen Universal 200. Eluire il DNA con 50 µL di tampone di eluizione.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della master mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). I controlli A e B devono essere inclusi durante ogni ciclo di test.

Si consiglia di aggiungere un ulteriore 10% di volume alla master mix per compensare eventuali perdite durante il pipettaggio (vedere Tabella 3). Prima dell'uso, scongelare la **Reaction Mix** la **Taq-Polymerase**, il **Control A** e il **Control B**, vorticare (tranne la Taq-Polymerase) e centrifugare brevemente. I reagenti devono essere sempre adeguatamente raffreddati durante le fasi di lavoro (2–8 °C).

**Tabella 3:** Esempio per il calcolo e la produzione di master mix per 10 reazioni

Codice del kit	Componenti della master mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Totale</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mescolare la master mix e quindi centrifugare per breve tempo.

### 9.2 Preparazione della PCR mix

Pipettare 20 µL della master mix in ogni cuvetta di reazione (piastre).

**Campioni:** Aggiungere 5 µL di eluato a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

**Controlli:** Aggiungere 5 µL di **Control A** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

Aggiungere 5 µL di **Control B** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

Chiudere le piastre, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire allo strumento di PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento (vedere Tabella 4 e Tabella 5).



## 9.3 Impostazioni del dispositivo

### 9.3.1 Profilo per PCR real-time universale

Per armonizzare i test RIDA®GENE, il kit RIDA®GENE Lac Intol è stato verificato nel profilo universale. Questo rende possibile combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA. Pertanto la trascrizione inversa è il primo passaggio del profilo universale.

**Tabella 4:** Profilo universale PCR real-time per LightCycler® 480 II

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/ velocità di rampa	Durata di conservazione

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tabella 5:** Profilo RT-PCR real-time universale per ABI 7500 Fast Dx e CFX96™ Dx

Trascrizione inversa	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/ velocità di rampa	Durata di conservazione

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tabella 6:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento di PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	C13910 (WT)	465/510	<b>È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).</b>
	C13910T (Mut)	533/580	
	G22018 (WT)	533/610	
	G22018A (Mut)	618/660	
<b>Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	<b>Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su nessuno.</b>
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	C13910 (WT)	FAM	-
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (WT)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	

## 10. Controllo qualità – indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi dello strumento di PCR real-time in base alle istruzioni del fabbricante. Il **Control A** e il **Control B** devono indicare i risultati corretti (vedere Tabella 7).

Il **Control A** e il **Control B** sono presenti ciascuno in una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ L. Viene utilizzato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie in ogni ciclo di PCR.

**Tabella 7:** Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	FAM	ROX	VIC	Cy5	Ct gene target
Controllo A	+	+	-	-	Vedere Certificate of Analysis
Controllo B	-	-	+	+	Vedere Certificate of Analysis

\* + = positivo  
- = negativo

Se entrambi i controlli, **Control A** e **Control B** non sono in linea con le specifiche è necessario ripetere l'intero ciclo di PCR. Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo aver ripetuto il test, rivolgersi al fabbricante o al proprio distributore R-Biopharm locale.

## 11. Interpretazione del risultato

I risultati del campione sono interpretati secondo la Tabella 8.

**Tabella 8:** Interpretazione del risultato\*

Rivelazione di				Risultato
C13910 (WT)	C13910T (Mut)	G22018 (WT)	G22018A (Mut)	
+	-	+	-	Omozigote wild type 13910 Omozigote wild type 22018
+	-	+	+	Omozigote wild type 13910 Eterozigote 22018
+	+	-	+	Eterozigote 13910 Mutazione omozigote 22018
+	+	+	-	Eterozigote 13910 Omozigote wild type 22018
+	+	+	+	Eterozigote 13910 Eterozigote 22018
-	+	+	-	Mutazione omozigote 13910 Omozigote wild type 22018
+	-	-	+	Omozigote wild type 13910 Mutazione omozigote 22018
-	+	-	+	Mutazione omozigote 13910 Mutazione omozigote 22018
-	+	+	+	Mutazione omozigote 13910 Eterozigote 22018
-	-	+ / -	+ / -	non valido
+ / -	+ / -	-	-	non valido
-	-	-	-	non valido

\* + = positivo  
- = negativo

**Nota:** Quando si utilizzano LightCycler® 480 II (Roche), CFX96™ Dx (Biorad) e ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems), il livello di fluorescenza di un segnale realmente positivo nel canale VIC deve essere almeno il 20% del segnale di fluorescenza del controllo B. Per una valutazione più certa, si raccomanda di impostare la soglia a questo limite (20% del controllo B).

Il ciclo di PCR non può essere valutato se i controlli non mostrano alcuna amplificazione nel sistema di rivelazione. L'intero ciclo di PCR deve essere ripetuto.

Il ciclo di PCR non può essere valutato se il campione non mostra amplificazione nel sistema di rivelazione. In questo caso, o il DNA non è stato aggiunto o è stato usato un DNA stampo non adatto (qualità, inibitore della PCR). Il campione estratto deve essere nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la pulizia del campione.

## 12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA®GENE Lac Intol rivela C13910 e G22018 e/o i loro possibili SNP (polimorfismi a singolo nucleotide) C13910T e G22018A nel gene *MCM6* umano in campioni di sangue intero umano con EDTA. Pertanto, non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è valido solo per i campioni di sangue intero umano con EDTA.
4. Procedure inadatte di estrazione, trasporto, conservazione e manipolazione dei campioni possono produrre risultati falsi negativi.
5. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
6. Gli scambi di singole basi vengono rivelati per la tecnologia SNP utilizzata. Questo può influire negativamente sul livello di fluorescenza dell'endpoint.
7. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulla buona pratica di laboratorio. Durante l'esecuzione del test, gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del fabbricante.
8. La legge tedesca sulla diagnostica genetica (GenDG) richiede una spiegazione dettagliata e un consenso scritto dei pazienti per tutte le analisi genetiche ai sensi della GenDG.

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1. Prestazioni e caratteristiche analitiche

#### 13.1.1 Specificità analitica

##### Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della PCR e di sostanze interferenti può inficiare la validità dei risultati. Pertanto sono stati testati gli effetti di varie sostanze che potrebbero essere presenti nei campioni in ragione della loro ampia diffusione.

Le sostanze che potrebbero influire in modo significativo sui risultati del test sono state esaminate ad alte concentrazioni (simulazione del caso peggiore) in un'analisi di interferenza.

Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 9.

**Tabella 9:** Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Medunasal Heparin 500 I.U. fiale (eparina)	15 U/mL
Colesterolo	3 mg/mL
Bilirubina	0,1 mg/mL
Emoglobina	0,2 mg/mL
K <sub>2</sub> EDTA	1,8 mg/mL

#### 13.1.2 Precisione

La precisione del kit Lac Intol è stata determinata per i seguenti livelli di valutazione.

Precisione *intra*-test: determinazione di 7 campioni di controllo utilizzando 20 replicati ciascuno su LightCycler® 480 II in condizioni identiche.

Precisione *inter*-test: determinazione di 7 campioni di controllo in 20 cicli in duplicato in 10 giorni di lavoro (2 cicli al giorno), eseguiti da due tecnici diversi in condizioni riproducibili.

La precisione intra- e inter-test è stata verificata utilizzando tre diversi lotti.

I dati di precisione sono stati determinati con sette campioni di controllo e con i controlli A e B associati al test.

Il massimo coefficiente di variazione ottenuto dalle misurazioni con il kit RIDA®GENE Lac Intol su LightCycler® 480 II è stato 8,72%.

**Tabella 12:** Risultati della precisione del kit Lac Intol per il canale FAM.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>	
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3	
1	Ct	23,3	23,4	22,9	23,6	24,2	24,2	24,0
	CV (%)	0,84%	1,10%	2,52%	3,34%	2,46%	2,27%	2,99%
2	Ct	23,4	23,6	23,2	23,8	24,1	24,3	24,1
	CV (%)	1,46%	0,95%	1,80%	2,22%	2,37%	2,20%	2,44%
3	Ct	23,6	23,8	23,6	23,9	24,2	24,6	24,2
	CV (%)	0,67%	1,02%	1,18%	2,80%	2,22%	2,34%	2,83%
4	Ct	24,4	24,6	24,5	24,3	24,5	25,0	24,6
	CV (%)	1,41%	1,01%	1,14%	2,91%	2,46%	2,63%	2,96%
5	Ct	24,1	24,2	23,9	24,0	24,3	24,6	24,3
	CV (%)	0,88%	1,13%	0,96%	2,78%	2,42%	2,01%	2,59%
6	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile

**Tabella 13:** Risultati della precisione del kit Lac Intol per il canale VIC.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	28,0	27,0	27,5	28,4	28,9	28,1
	CV (%)	1,81%	2,13%	3,62%	2,71%	2,70%	4,38%
3	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
4	Ct	31,2	29,4	28,9	28,5	29,1	28,3
	CV (%)	5,35%	8,72%	1,75%	2,42%	2,03%	3,86%
5	Ct	28,7	28,0	27,3	27,2	27,3	27,0
	CV (%)	2,41%	6,02%	3,44%	1,75%	1,73%	2,84%
6	Ct	27,5	26,5	26,8	26,9	26,9	26,8
	CV (%)	1,40%	1,33%	0,97%	1,30%	1,46%	1,34%
7	Ct	25,9	25,8	25,6	26,5	26,7	26,2
	CV (%)	0,87%	1,36%	0,88%	1,63%	1,04%	1,75%



**Tabella 14:** Risultati della precisione del kit Lac Intol per il canale ROX.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>	
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3	
1	Ct	23,4	23,2	23,3	24,0	24,4	24,5	24,3
	CV (%)	0,95%	1,08%	1,89%	2,47%	2,16%	2,07%	2,46%
2	Ct	23,7	23,5	24,0	24,4	24,5	24,8	24,6
	CV (%)	1,00%	0,81%	1,56%	1,98%	2,07%	1,69%	2,06%
3	Ct	23,6	23,4	23,9	24,2	24,4	24,9	24,5
	CV (%)	0,64%	1,35%	1,46%	2,43%	2,25%	2,23%	2,61%
4	Ct	24,7	25,1	24,7	24,8	25,0	25,3	25,1
	CV (%)	1,22%	1,24%	1,28%	2,52%	2,34%	2,33%	2,53%
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
6	Ct	24,2	24,4	24,0	24,4	24,4	24,6	24,4
	CV (%)	0,94%	1,32%	1,10%	2,71%	2,40%	2,60%	2,57%
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile

**Tabella 15:** Risultati della precisione del kit Lac Intol per il canale Cy5.










Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
3	Ct	25,5	26,0	28,3	25,7	26,1	27,0
	CV (%)	1,06%	1,54%	4,10%	2,74%	3,19%	3,69%
4	Ct	25,9	26,2	26,2	26,2	26,4	27,4
	CV (%)	1,62%	2,90%	1,54%	3,48%	2,86%	3,19%
5	Ct	25,3	25,6	25,7	25,7	25,8	26,5
	CV (%)	0,95%	1,84%	0,61%	2,17%	2,11%	1,75%
6	Ct	25,5	25,8	25,7	26,0	26,0	26,4
	CV (%)	1,29%	1,03%	0,99%	3,33%	2,59%	3,05%
7	Ct	25,4	25,5	25,8	25,4	25,5	26,1
	CV (%)	0,90%	1,16%	0,86%	2,28%	1,94%	2,28%

## 14. Cronologia delle versioni


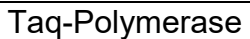
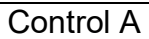
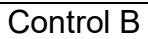
Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-05-11	Versione di rilascio

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Attenersi al manuale operativo
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

### Simboli specifici del test

	Miscela di reazione
	Taq Polimerasi
	Controllo A
	Controllo B

## 16. Bibliografía

1. Toca MDC, Fernández A, Orsi M, Tabacco O, Vinderola G. Lactose intolerance: myths and facts. An update. *Arch Argent Pediatr*. 2022;120(1):59-66.
2. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*. 2019;68(11):2080-91.
3. Morelli L, Amrani N, Goulet O, Lukito W. Lactose Intolerance Clinical Symptoms, Diagnosis and Treatment. *Global Diabetes Open Access Journal*. 2019;1(1):1-10
4. Catanzaro R, Sciuto M, Marotta F. Lactose Intolerance—Old and New Knowledge on Pathophysiological Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2021;3:499-509.
5. Anguita-Ruiz A, Aguilera CM, Gil Á. Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients*. 2020;12(9).
6. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005



# RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol

**REF** PY4215

## 1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*.

O teste RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol, que é realizado no LightCycler<sup>®</sup> 480 II, é um PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa e diferenciação de C13910 e G22018, bem como os seus SNP (polimorfismos de nucleotídeo único) C13910T e G22018A no gene humano MCM6 a partir de amostras de sangue total humano com EDTA com sinais e sintomas de intolerância à lactose.

O teste RIDA<sup>®</sup>GENE Lac Intol se destina a ajudar o diagnóstico de pacientes com sintomas de intolerância à lactose em conexão com outros achados clínicos e laboratoriais.

O resultado do teste não deve ser usado como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

Lactose, um dissacarídeo composto por galactose e glucose, é a principal fonte de energia do leite em humanos e animais.

A ligação glicosídica  $\beta$ -(1,4) pode ser decomposta pela enzima lactase, tornando assim os monossacarídeos disponíveis para utilização posterior<sup>(1)</sup>. A quebra e a adsorção acontecem no intestino delgado. Os monossacarídeos são posteriormente transportados dentro das células epiteliais (enterócitos)<sup>(2)</sup>. A quantidade de lactase aumenta durante a gravidez e atinge seu valor mais alto alguns dias após o nascimento. O conteúdo de lactase diminui ao longo da vida através de reguladores a nível genético<sup>(1)</sup>. No entanto, 50 % da atividade de lactase é suficiente para quebrar eficazmente a lactose<sup>(3)</sup>. Se a lactose só pode ser decomposta em pequenas quantidades ou não pode ser decomposta, isto leva a uma carga osmótica excessiva e aumenta o conteúdo de água no intestino. Além disso, a lactose entra no intestino grosso, onde é fermentada por bactérias intestinais, contribuindo para a produção de ácidos graxos e gases de cadeia curta, como hidrogênio, dióxido de carbono e metano.<sup>(4)</sup> Isto, por sua vez, pode causar sintomas clínicos como inchaço, dor abdominal, cólicas e/ou plenitude pós-prandial, arroto, diarreia e, em alguns casos, constipação, náusea e vômito.<sup>(1,4)</sup> O gene que codifica a lactase é chamado *LCT* e está localizado no cromossomo 2. O gene *MCM6* (componente 6 do complexo de manutenção de minicromossomos), que está localizado

aproximadamente 14 Kb a montante do gene da lactase, funciona como um potenciador. Diferentes polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs), incluindo 13910 C/T e 22018 G/A neste gene, estão associados à persistência da lactase. Esta mudança leva a novos locais de ligação do fator de transcrição, contribuindo assim para uma expressão vitalícia do gene *LCT*<sup>(2,4,5)</sup>. A intolerância à lactose não é, portanto, uma doença; ela tem uma prevalência global de 57 % e mais<sup>(2,3)</sup>. Isto varia de região para região. A Europa tem uma prevalência média de 28 %, variando de 2 % na Escandinávia e 70 % na Sicília.<sup>(2)</sup>

### 3. Princípio do teste

O teste RIDA®GENE Lac Intol é um PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa e diferenciação de C13910 e G22018, bem como os seus possíveis SNP (polimorfismos de nucleotídeo único) C13910T e G22018A no gene humano *MCM6* a partir de amostras de sangue total humano com EDTA. Após o isolamento do DNA, os fragmentos de genes específicos são amplificados como um tipo selvagem, ou como uma mutação.

As sequências-alvo amplificadas são detectadas com sondas de hidrólise etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a **Taq-Polymerase** separa o repórter do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados.

### 4. Reagentes fornecidos

Os reagentes no kit são suficientes para 100 determinações.

**Tabela 1:** Reagentes fornecidos

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	amarelo, pronto para uso
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	vermelho, pronto para uso
A	Control A	1 ×	200 µL	azul, pronto para uso
B	Control B	1 ×	200 µL	verde, pronto a usar

## 5. Instruções de armazenamento

- Siga as diretrizes de manuseamento da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término da data de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 - 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 5 vezes não afeta as propriedades do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação da PCR (2 - 8 °C).

**Tabela 2:** Condições de armazenamento e informação

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-20 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-20 °C	5 ciclos de congelamento-descongelamento



## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

### 6.1 Equipamento laboratorial

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o kit RIDA®GENE Lac Intol:

Equipamentos
Plataforma de extração: Instrumento MagNA Pure 96 (Roche)
Dispositivos PCR em tempo real: <ul style="list-style-type: none"><li>• LightCycler® 480 II (Roche)</li><li>• ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems)</li><li>• CFX96™ Dx (Bio-Rad)</li></ul>
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) ao usar o LightCycler® 480 II
Consumíveis PCR em tempo real (placas (baixo perfil, poços brancos, armação transparente), tubos de ensaio, lâminas)
Centrífuga com rotor para placas
Vortexer
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pontas da pipeta com filtros
Luvas descartáveis sem pó

O kit RIDA®GENE Lac Intol pode ser utilizado em conjunto com fluxos de trabalho compatíveis. Procedimentos alternativos de extração de ácido nucléico e dispositivos PCR em tempo real devem ser verificados/validados pelo usuário. Por favor entre em contato com a R-Biopharm AG para revisar a compatibilidade em [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para uso em Diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. Devem ser observadas as diretrizes para trabalho em laboratórios médicos.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas. Salas separadas, vestuário especial e instrumentos para extração, preparação de PCR, o PCR deve ser usado para evitar a contaminação cruzada e resultados falso-positivos.

Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não troque ou misture os componentes (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Control A, Control B) de um lote com os componentes de outro lote.

Não use o kit de teste após o prazo de validade. Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Mais detalhes sobre as Folhas de Dados de Segurança (Safety Data Sheet, SDS) podem ser encontrados sob o número do item em <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

## **8. Coleta e armazenamento de amostras**

### **8.1 Armazenamento de amostras**

Este teste foi desenvolvido para o exame de amostras de sangue total humano com EDTA. As amostras devem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 24 horas e entre 2 - 8 °C por até 72 horas até a extração do DNA.<sup>(6)</sup> Deve ser evitada a contaminação microbiana das amostras. A utilização de soros lipêmicos, hemolíticos, ictericos ou opacos, inativados pelo calor, podem gerar resultados distorcidos.

### **8.2 Preparação da amostra**

#### **8.2.1 Isolamento de DNA a partir de sangue total com EDTA**

Um kit de isolamento de DNA disponível no mercado ou um sistema de extração de DNA (por exemplo, equipamento MagNA Pure 96 (Roche)) é recomendado para o isolamento de DNA de sangue total com EDTA. As instruções do fabricante devem ser observadas.

Ao usar o instrumento MagNA Pure 96 (Roche), extraia 200 µL de DNA EDTA de sangue total usando o kit DNA/Viral NA SV e o protocolo Pathogen Universal 200. Elua o DNA com 50 µL de tampão de eluição.

## 9. Realização do teste

### 9.1 Preparação da Mistura Principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle A e um controle B.

Recomenda-se acrescentar um volume adicional de 10 % à Mistura Principal a fim de compensar qualquer perda da pipetagem (consulte a Tabela 3). Antes de utilizar, descongele a **Reaction Mix**, a **Taq-Polymerase**, o **Control A** e o **Control B**, misture com vórtice (exceto a Taq-Polymerase), e centrifugue brevemente. Os reagentes devem ser sempre resfriados adequadamente durante as etapas de trabalho (2 - 8 °C).

**Tabela 3:** Exemplo para o cálculo e produção da mistura principal para 10 reações

Código do kit	Componentes da Mistura Principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Misture a Mistura Principal e depois centrifugue por pouco tempo.

### 9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µL da mistura principal em cada tubo de ensaio (placas).

**Amostras:** Adicione 5 µL de eluato a cada mistura principal pré-pipetada.

**Controles:** Adicione 5 µL de **Control A** a cada mistura principal pré-pipetada.

Adicione 5 µL de **Control B** a cada mistura principal pré-pipetada.

Selar as placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o instrumento de PCR em tempo real. Inicie o PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (ver Tabela 4 e Tabela 5).

## 9.3 Configurações do dispositivo

### 9.3.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®GENE, o kit RIDA®GENE Lac Intol foi verificado no perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro. A transcrição inversa, portanto, vem em primeiro lugar no perfil universal.

**Tabela 4:** Perfil de PCR em tempo real universal para o LightCycler® 480 II

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

**Tabela 5:** Perfil de RT-PCR em tempo real universal para ABI 7500 Fast Dx e CFX96™ Dx

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

## 9.4 Configuração do canal de detecção

**Tabela 6:** Seleção dos canais de detecção adequados

Dispositivo de PCR em tempo real	Deteccção	Canal de deteccção	Indicação
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	C13910 (TS)	465/510	<b>É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).</b>
	C13910T (Mut)	533/580	
	G22018 (TS)	533/610	
	G22018A (Mut)	618/660	
<b>Applied Biosystems ABI 7500 Fast Dx</b>	C13910 (TS)	FAM	<b>Defina o corante de referência passiva ROX como nenhum.</b>
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (TS)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	C13910 (TS)	FAM	-
	C13910T (Mut)	VIC	
	G22018 (TS)	ROX	
	G22018A (Mut)	Cy5	

## 10. Controle de qualidade – indicação de instabilidade ou expiração de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software de análise do instrumento de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. O **Control A** e o **Control B** devem indicar os resultados corretos (consulte a Tabela 7).

O **Control A** e o **Control B** estão os dois presentes em uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu$ L. É usado em uma quantidade total de  $5 \times 10^3$  cópias em cada execução de PCR.

**Tabela 7:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	FAM	ROX	VIC	Cy5	Gene-alvo Ct
Controle A	+	+	-	-	Ver Certificate of Analysis
Controle B	-	-	+	+	Ver Certificate of Analysis

\* + = positivo  
- = negativo

Se ambos os controles, **Control A** e **Control B**, não estiverem de acordo com as especificações, toda a execução do PCR deve ser repetida. Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

## 11. Interpretação dos resultados

Os resultados da amostra são interpretados de acordo com a Tabela 8.

**Tabela 8:** Interpretação dos resultados\*

Detecção de				Resultado
C13910 (TS)	C13910T (Mut)	G22018 (TS)	G22018A (Mut)	
+	-	+	-	Homozigotos do tipo selvagem 13910 Homozigotos do tipo selvagem 22018
+	-	+	+	Homozigotos do tipo selvagem 13910 Heterozigotos 22018
+	+	-	+	Heterozigotos 13910 Homozigotos com mutação 22018
+	+	+	-	Heterozigotos 13910 Homozigotos do tipo selvagem 22018
+	+	+	+	Heterozigotos 13910 Heterozigotos 22018
-	+	+	-	Homozigotos com mutação 13910 Homozigotos do tipo selvagem 22018
+	-	-	+	Homozigotos do tipo selvagem 13910 Homozigotos com mutação 22018
-	+	-	+	Homozigotos com mutação 13910 Homozigotos com mutação 22018
-	+	+	+	Homozigotos com mutação 13910 Heterozigotos 22018
-	-	+ / -	+ / -	inválido
+ / -	+ / -	-	-	inválido
-	-	-	-	inválido

\* + = positivo  
- = negativo

**Nota:** Quando o LightCycler® 480 II (Roche), o CFX96™ Dx (Biorad) e o ABI 7500 Fast Dx (Applied Biosystems) são usados, o nível de fluorescência de um sinal verdadeiramente positivo no canal VIC deve ser de pelo menos 20 % do sinal de fluorescência do Controle B. Para uma avaliação mais definitiva, recomenda-se estabelecer o limite para este limite (20 % de Controle B).

A execução de PCR não pode ser avaliada se os controles não exibirem amplificação no sistema de detecção. Toda a execução do PCR deve ser repetida.



A execução de PCR não pode ser avaliada se a amostra não exibir amplificação no sistema de detecção. Neste caso, ou o DNA não foi adicionado ou um DNA modelo inadequado (qualidade, inibidor de PCR) foi usado. A amostra extraída deve ser re-amplificada, ou o isolamento e a limpeza da amostra devem ser melhorados.

## 12. Limitações do método

1. O teste RIDA®GENE Lac Intol detecta C13910 e G22018 e/ou seus possíveis SNP (polimorfismos de nucleotídeo único) C13910T e G22018A no gene humano *MCM6* a partir de amostras de sangue total humano com EDTA. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta a história médica e os sintomas do paciente.
3. Este teste é válido apenas para amostras de sangue humano total com EDTA.
4. A extração, transporte, armazenamento e manuseio inadequados de amostras pode produzir resultados falso-negativos.
5. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos.
6. As trocas de base individuais são detectadas para a tecnologia SNP utilizada. Isto pode afetar negativamente o nível de fluorescência do ponto final.
7. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais. Os usuários devem seguir as instruções do fabricante com precisão ao realizar o teste.
8. A Lei de Diagnóstico Genético (GenDG) alemã exige uma explicação completa e consentimento por escrito dos pacientes para todas as análises genéticas de acordo com a GenDG.

## 13. Características de desempenho

### 13.1. Características de desempenho clínico

#### 13.1.1 Especificidade analítica

##### Substâncias interferentes

A presença de inibidores de PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados inválidos. Assim, os efeitos de diferentes substâncias que poderiam estar presentes nas respectivas amostras devido à sua utilização generalizada devem ser testados.

As substâncias que poderiam potencialmente influenciar significativamente os resultados do teste foram examinadas em concentrações elevadas (simulação do pior caso) em uma tela de interferência.

Não foram determinadas nenhuma interferências para as substâncias listadas na Tabela 9.

**Tabela 9:** Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Heparina Medunasal 500 I.U. Ampolas (heparina)	15 U/mL
Colesterol	3 mg/mL
Bilirrubina	0,1 mg/mL
Hemoglobina	0,2 mg/mL
K <sub>2</sub> EDTA	1,8 mg/mL

#### 13.1.2 Precisão

A precisão do kit Lac Intol foi determinada para os seguintes níveis de avaliação.

**Precisão *Intraensaio*:** Determinação de sete amostras de controle usando 20 réplicas, cada uma no LightCycler® 480 II sob condições idênticas.

**Precisão *Interensaio*:** Determinação de sete amostras de controle em 20 execuções em duplicidade em dez dias de trabalho (duas execuções por dia) realizadas por dois técnicos diferentes em condições reproduzíveis.

Os testes de precisão intra e interensaio foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os dados de precisão foram determinados com sete amostras de controle, bem como o controle A e o controle B associados ao ensaio.

O coeficiente de variação máximo obtido das medições com o kit RIDA®GENE Lac Intol no LightCycler® 480 II foi de 8,72 %.

**Tabela 12:** Resultados da precisão do kit Lac Intol para o canal FAM.

Valor médio Ct/CV		<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
1	Ct	23,3	23,4	22,9	23,6	24,2	24,2	24,0
	CV (%)	0,84 %	1,10 %	2,52 %	3,34 %	2,46 %	2,27 %	2,99 %
2	Ct	23,4	23,6	23,2	23,8	24,1	24,3	24,1
	CV (%)	1,46 %	0,95 %	1,80 %	2,22 %	2,37 %	2,20 %	2,44 %
3	Ct	23,6	23,8	23,6	23,9	24,2	24,6	24,2
	CV (%)	0,67 %	1,02 %	1,18 %	2,80 %	2,22 %	2,34 %	2,83 %
4	Ct	24,4	24,6	24,5	24,3	24,5	25,0	24,6
	CV (%)	1,41 %	1,01 %	1,14 %	2,91 %	2,46 %	2,63 %	2,96 %
5	Ct	24,1	24,2	23,9	24,0	24,3	24,6	24,3
	CV (%)	0,88 %	1,13 %	0,96 %	2,78 %	2,42 %	2,01 %	2,59 %
6	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

**Tabela 13:** Resultados da precisão do kit Lac Intol para o canal VIC.

Valor médio Ct/CV		<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	28,0	27,0	27,5	28,4	28,9	28,1	28,5
	CV (%)	1,81 %	2,13 %	3,62 %	2,71 %	2,70 %	4,38 %	3,58 %
3	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
4	Ct	31,2	29,4	28,9	28,5	29,1	28,3	28,7
	CV (%)	5,35 %	8,72 %	1,75 %	2,42 %	2,03 %	3,86 %	3,15 %
5	Ct	28,7	28,0	27,3	27,2	27,3	27,0	27,2
	CV (%)	2,41 %	6,02 %	3,44 %	1,75 %	1,73 %	2,84 %	2,21 %
6	Ct	27,5	26,5	26,8	26,9	26,9	26,8	26,9
	CV (%)	1,40 %	1,33 %	0,97 %	1,30 %	1,46 %	1,34 %	1,37 %
7	Ct	25,9	25,8	25,6	26,5	26,7	26,2	26,5
	CV (%)	0,87 %	1,36 %	0,88 %	1,63 %	1,04 %	1,75 %	1,75 %

**Tabela 14:** Resultados da precisão do kit Lac Intol para o canal ROX.

Valor médio Ct/CV		<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
1	Ct	23,4	23,2	23,3	24,0	24,4	24,5	24,3
	CV (%)	0,95 %	1,08 %	1,89 %	2,47 %	2,16 %	2,07 %	2,46 %
2	Ct	23,7	23,5	24,0	24,4	24,5	24,8	24,6
	CV (%)	1,00 %	0,81 %	1,56 %	1,98 %	2,07 %	1,69 %	2,06 %
3	Ct	23,6	23,4	23,9	24,2	24,4	24,9	24,5
	CV (%)	0,64 %	1,35 %	1,46 %	2,43 %	2,25 %	2,23 %	2,61 %
4	Ct	24,7	25,1	24,7	24,8	25,0	25,3	25,1
	CV (%)	1,22 %	1,24 %	1,28 %	2,52 %	2,34 %	2,33 %	2,53 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
6	Ct	24,2	24,4	24,0	24,4	24,4	24,6	24,4
	CV (%)	0,94 %	1,32 %	1,10 %	2,71 %	2,40 %	2,60 %	2,57 %
7	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

**Tabela 15:** Resultados da precisão do kit Lac Intol para o canal Cy5.










Valor médio Ct/CV		<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	Ct	25,5	26,0	28,3	25,7	26,1	27,0	26,3
	CV (%)	1,06 %	1,54 %	4,10 %	2,74 %	3,19 %	3,69 %	4,06 %
4	Ct	25,9	26,2	26,2	26,2	26,4	27,4	26,7
	CV (%)	1,62 %	2,90 %	1,54 %	3,48 %	2,86 %	3,19 %	3,95 %
5	Ct	25,3	25,6	25,7	25,7	25,8	26,5	26,0
	CV (%)	0,95 %	1,84 %	0,61 %	2,17 %	2,11 %	1,75 %	2,55 %
6	Ct	25,5	25,8	25,7	26,0	26,0	26,4	26,1
	CV (%)	1,29 %	1,03 %	0,99 %	3,33 %	2,59 %	3,05 %	3,07 %
7	Ct	25,4	25,5	25,8	25,4	25,5	26,1	25,7
	CV (%)	0,90 %	1,16 %	0,86 %	2,28 %	1,94 %	2,28 %	2,58 %

## 14. Histórico de versões





Número da versão	Seção e designação
2022-05-11	Versão da edição

## 15. Explicação dos símbolos

### Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte o manual de operação
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

### Símbolos específicos do teste

	Mistura de reação
	Taq Polymerase
	Controle A
	Controle B

## 16. Referências

1. Toca MDC, Fernández A, Orsi M, Tabacco O, Vinderola G. Lactose intolerance: myths and facts. An update. *Arch Argent Pediatr*. 2022;120(1):59-66.
2. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*. 2019;68(11):2080-91.
3. Morelli L, Amrani N, Goulet O, Lukito W. Lactose Intolerance Clinical Symptoms, Diagnosis and Treatment. *Global Diabetes Open Access Journal*. 2019;1(1):1-10
4. Catanzaro R, Sciuto M, Marotta F. Lactose Intolerance—Old and New Knowledge on Pathophysiological Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2021;3:499-509.
5. Anguita-Ruiz A, Aguilera CM, Gil Á. Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients*. 2020;12(9).
6. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005