



Adellgene®

Fragile X

NÁVOD K POUŽITÍ

Souprava pro stanovení počtu CGC tripletových repetit v genu FMR1 pomocí metody fragmentové analýzy.



Rev. 02 - 2022/05/12



Camino del Pilón 86, Casa 7, Local
50011 – Zaragoza (Spain)



www.bdrdiagnostics.com

Kódy výrobku::
AD-FMR1-25
AD-FMR1-100

UDI-DI
8437016942468
8437016942475

Skladování:
od -18°C do 30°C

Adellgene®

Fragile X



Obsah

1 - Bezpečnostní informace.....	3
2 - Použití.....	3
3 - Souhrn a vysvětlení	3
4 - Principy testu.....	5
5 - Obsah soupravy.....	5
6 - Skladování soupravy.....	5
7 - Vybavení a reagentie, které nejsou součástí soupravy...	6
8 - Odběr a příprava vzorku.....	6
9 - Postup.....	6
10 - Výsledky a interpretace.....	9
11 - Kontrola kvality.....	14
12 - Specifické provedení.....	14
13 - Omezení postupu.....	15
14 - Průvodce problémy.....	16
15 - Odkazy.....	18
16 - Upozornění pro zákazníka.....	18
17 - Kontrola změn.....	19
18 - Vysvětlení symbolů.....	20

1 – Bezpečnostní informace

Přečtěte si prosím celý tento návod k použití a používejte jej během používání aktuální IVD soupravy.

Souprava IVD by měla být používána odborníky se dobrými zkušenostmi s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

V případě pochybností ohledně popisu metody stanovení se poradte s výrobcem. Kontaktujte telefonicky +34 976 094 603 nebo emailovou adresou customersupport@bdrdiagnostics.com.

IVD kit má omezenou životnost. Před použitím sady se ujistěte, že nevypršela doba použitelnosti. Reagencie ze soupravy po datu expirace mohou být znehodnoceny, což by mohlo zhoršit výsledky. Reagencie s prošlou dobou použitelnosti zlikvidujte podle platných předpisů.

Kontaminace vzorku nebo činidla může způsobit nesprávné výsledky. Buďte opatrní při extrakci DNA a manipulaci se vzorky a činidly.

Tato sada se může během přepravy nebo skladování poškodit. V případě podezření na poškození během přepravy soupravu nepoužívejte. Pečlivě dodržujte podmínky skladování popsané na štítku a v návodu k použití.

Zajistěte, aby bylo s odpadem nakládáno v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s odpady může vést ke kontaminaci životního prostředí.

Toxikologické vlastnosti soupravy nebyly do hloubky studovány, proto se doporučuje vyhnout se kontaktu s kůží a sliznicemi. Nepožívejte. Manuální bezpečnostní listy (MSDS) jsou zákazníkům k dispozici na vyžádání.

Ujistěte se, že tato souprava je vhodná pro analýzu požadovanou lékařem.

2 - Použití

Adellgene® Fragile X je poloautomatická in vitro diagnostická souprava určená pro použití v klinických laboratořích pro amplifikaci a detekci CGG tripletových repetitivních (cytosin-guanin-guanin) v 5' nepřeložené oblasti genu pro mentální retardaci fragilního X („Fragile X mentální retardace-1“: FMR1). Zaměřuje se na pomoc při diagnostice klinických onemocnění spojených se syndromem fragilního X (např.: mentální retardace, primární selhání vaječníků, třes / ataxie atd....).

Metoda je založena na amplifikaci genomové DNA extrahované z periferní krve polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s následnou fluorescenční analýzou velikosti PCR fragmentů získaných genetickým analyzátozem.

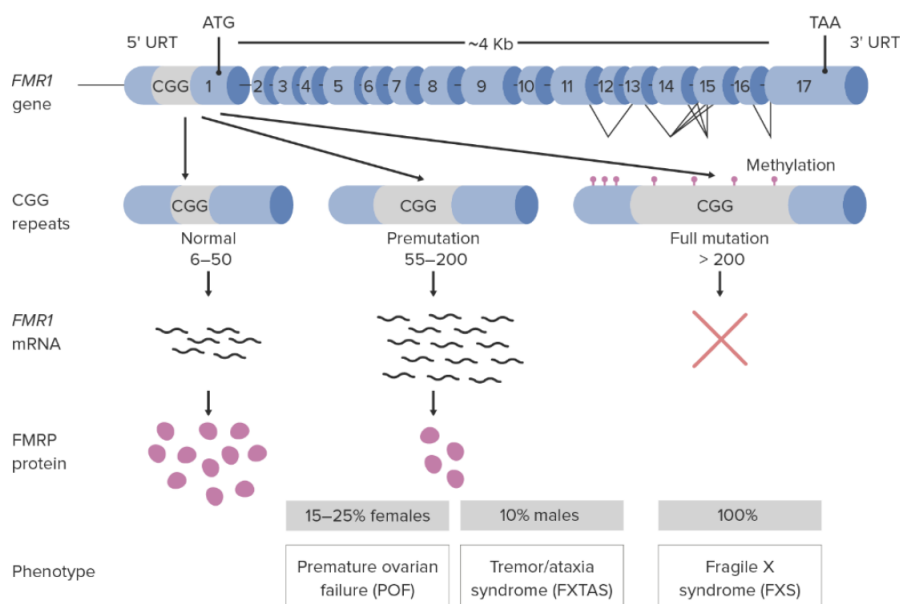
Pacienti, kteří mohou mít prospěch z tohoto určení, jsou ti, kteří jsou doporučeni specialistou. Zamýšleným uživatelem soupravy je technický personál vyškolený k provádění protokolu a interpretaci výsledků popsaných v tomto dokumentu.

3 - Souhrn a vysvětlení

Syndrom Fragilního X (FXS, OMIM # 309550) je onemocnění vázané na X chromozomu, které je hlavně způsobené expanzí tripletových nukleotidů, CGG, lokalizovaných na 5' nepřekládaném regionu genu FMR1 („Fragile X Mental Retardation 1) na chromozomu Xq27 s aberantním metylačním statusem v promotoru genu (Obr. 1 [1]).

V závislosti na počtu repetit tohoto tripletu se rozlišují tři kategorie :

- Zdravé alely: až 45 nebo 55 CGG repetit bez metylace promotoru genu [2].
- Premutační alely: od 45 nebo 55 do 200 opakování CGG, obvykle bez aberantní metylace. V tomto případě jsou jedinci asymptomatictí pro poruchy spojené s FXS, ale mohou být spojeni se dvěma klinickými poruchami: třes/ataxie spojený se syndromem X (FXTAS) a křehký X spojený s primární ovarální insuficiencí (FXPOI), jejichž závažnost závisí na metylaci. stav promotoru [3, 4]. Odhaduje se, že prevalence v obecné populaci je 1 na každých 110–270 žen a 1 na každých 250–810 mužů [1]. Premutační alely jsou navíc nestabilní a mohou se zvětšit během přenosu z matky na potomstvo, což vede k úplné mutaci [5].
- Expandované alely: více než 200 repetit CGG s aberantní metylací promotoru genu. Tento genotyp vede k eliminaci genové exprese v lidském mozku, která je spojena s mentální retardací, autismem a mentálními a emočními změnami. Pacienti s rozšířenými alelami vykazují nápadný fenotyp skládající se z velkých uší a prominentní čelisti [1]. Závažnost kognitivní poruchy u pacientů s FXS není spojena s velikostí plné mutace, ale liší se podle stavu metylace [6].



Obrázek 1. zobrazení typů genu FMR1 a jejich tvorba v závislosti na stupni mutace. Vytlačeno ze [7].

Mnoho alel FMR1 obsahuje vložené sekvenční AGG mezi repetitami CGG. Předpokládá se, že tyto inzerty mohou poskytnout stabilitu DNA a snížit riziko expanze tripletových repetit v příští generaci. Pravděpodobnost expanze opakování CGG u potomků je proto vyšší, když matka nemá inzerci AGG v alele *FMR1* [5, 8].

Jednou z nejběžnějších metod molekulární diagnostiky Fragile X syndromu je Southern blot genomové DNA štěpené restriktivními endonukleázami EcoRI a EagI a hybridizované se specifickou sondou [9, 10]. Přestože tato metoda umožňuje v některých případech kvantifikovat počet opakování tripletu CGG a určit stav metylace, má mnoho nepříjemností. Vyžaduje velké množství vstupní DNA a má pracné a časově náročné protokoly, takže není vhodná pro vysoký počet testů. Navíc neumožňuje určit stav metylace ve většině vzorků DNA extrahované z choriových klků (CVS) kvůli její nízké citlivosti a protože proces metylace je plně dokončen až po desátém týdnu těhotenství [11].

V současné době je PCR nejrozšířenější technologií, která je založena na specifické amplifikaci

postižené oblasti genu. Tento proces však může být narušen v důsledku přítomnosti sekvenční vysoce bohaté na GC v genu FMR1. Pro překonání těchto nedostatků bylo popsáno několik variací v procesu amplifikace. Patří mezi ně použití osmotických adjuvans, modifikovaných nukleotidů a nastavení specifických podmínek procesu PCR [12].

4 - Princip testu

Metoda používaná soupravou Adellgene® Fragile X je založena na specifické amplifikaci 5' nepřeložené oblasti genu FMR1, která obsahuje CGG tripletové repetice, pomocí genomové DNA.

Souprava obsahuje různé primery, z nichž jeden je označen fluoroforem (FAM) pro jeho následnou detekci v genetickém analyzátoru. Později se velikost PCR fragmentů převede na počet CGG repetice pomocí korekčních faktorů pro mobility a velikosti.

5 - Souprava obsahuje

→ Kat.číslo AD-FMR1-25 (25 testů):

- AD-FMR1-PM: Primer Mix . 1 lahvička, 25 µL
- AD-FMR1-POM: Polymerase Mix . 1 lahvička, 12.5 µL
- AD-FMR1-GC: GC-Rich Buffer. 1 lahvička, 300 µL
- AD-FMR1-SL: ROX 1000 Size Ladder. 1 lahvička, 50 µL

→ Kat.číslo AD-FMR1-100 (100 testů):

- AD-FMR1-PML: Primer Mix . 1 lahvička, 100 µL
- AD-FMR1-POML: Polymerase Mix . 1 lahvička, 50 µL
- AD-FMR1-GCL: GC-Rich Buffer. 1 lahvička, 1,2 ml
- AD-FMR1-SLL: ROX 1000 Size Ladder. 1 lahvička, 200 µL

6 - Skladování soupravy

Všechny složky by měly být skladovány při - 18 °C až -30 °C. Při této teplotě jsou stabilní do data expirace

Nezmrazujte/nerozmrazujte lahvičky se směsí primerů (AD-FMR1-PM/AD-FMR1-PML) a směsí polymerázy (AD-FMR1-POM/AD-FMR1-POML) více než dvakrát, protože by to mohlo snížit citlivost testu . Pokud mají být testy provedeny s malým počtem vzorků, doporučuje se použít alikvoty činidel.

Vzhledem k fotosenzitivní povaze činidla se vyhněte trvalému vystavení světlu

7 - Materiál potřebný, ale nedodávaný

→ Reagencie

- Izolační a purifikační činidla pro extrakci DNA. DNA lze extrahovat pomocí jakéhokoli laboratorně ověřeného extrakčního systému, který umožňuje získat doporučené koncentrace a úrovně čistoty pro tento test (viz část Specifické provozní údaje)
- Destilovaná voda bez obsahu DNAázy
- POP-7 polymer (ABI, Ref: 4363785 nebo ekvivalent)
- Vysoce deionizovaný (Hi-Di) formamid (ABI, ref.: 4311320)
- Kalibrátory pro fluorofory FAM a ROX (ABI, ref.: 4345827)

→ Vybavení

- Obecné laboratorní vybavení určené pro techniky PCR
- Termocykler
- Genetický analyzátor s polymerem POP-7 (např.: ABI: 3130/3130xl, 3730/3730xl nebo 3500/3500xl)
- Centrifuga pro PCR destičky/zkumavky
- Vortexový mixér
- Pipety (P1000, P200, P20 a P2) a specifické filtrační špičky pro každou pipetu
- PCR destičky/zkumavky s odpovídajícími kryty/víčky

8 - Odběr vzorku a příprava

Vzorky musí být odebrány v souladu s pokyny k použití odběrového prostředku (není součástí sady) a v souladu s národními a mezinárodními směrnicemi.

Tato souprava by se měla používat pouze se vzorky plné krve konzervovanými antikoagulačními činidly, jako je EDTA nebo citrát. Heparin by mohl interferovat s procesem PCR a je třeba se mu vyhnout.

Nepoužívejte hyperlipemické, hemolyzované, ikterické nebo proteinemické vzorky.

Tato technika je kompatibilní s několika konvenčními systémy extrakce DNA. Před dodáním výsledků s diagnostickými účely proveďte ověřovací test s použitou extrakční metodou.

POZOR !

Všechny biologické a krevní vzorky musí být považovány za potenciálně infekční. Při manipulaci s nimi dodržujte odpovídající základní a univerzální opatření.

9 - Pracovní postup

→ Extrakce DNA

Tato souprava je kompatibilní s jakoukoli standardní metodou extrakce DNA z plné krve konzervované EDTA nebo citrátem. Než však budete pokračovat v obecném protokolu, doporučuje se provést test použité extrakční metody pro posouzení hodnot koncentrace (absorbance 260 nm) a čistoty (poměr absorbance 260/280 nm).

Doporučené množství DNA je 20 - 80 ng (např.: 2 µl DNA o koncentraci 10-40 ng/µl), s poměrem $OD_{260/280} > 1,7$. Získanou DNA lze až do použití skladovat při -20 °C.

→ Příprava a podmínky PCR reakce

VAROVÁNÍ !



- Rozmrazte všechny komponenty začátkem testu.
- Po rozmrazení promíchejte a odstřed'te, aby se celý objem činidla usadil na dně lahvičky.
- Vždy pracujte na ledu nebo chladném bloku a minimalizujte dobu přípravy jak jen to je možné.
- Stanovte práci v pre- a post-PCR prostoru aby se zamezilo kontaminaci.
- Používejte pouze špičky s filtrem a autoklávané nebo strilní zkumavky.
- Vždy noste rukavice a laboratorní plášť.

4. Nakonfigurujte termocykler podle následujícího aplikačního programu:

	Number of cycles	Temperature (°C)	Time (mm:ss)
DENATURATION	1 hold	98	05:00
CYCLES	10 cycles	97	00:35
		62	00:35
		68	04:00
CYCLES	20 cycles	97	00:35
		62	00:35
		68	04:00 + 00:20 each additional cycle
FINAL EXTENSION	1 hold	72	10:00
COOLING	1 hold	4	∞

5. Připravte následující reakční směs pro n+1 vzorků:

Složka	Objem na vzorek (μl)
Primer Mix (AD-FMR1-PM / AD-FMR1/PML)	1,0
GC-Rich Buffer (AD-FMR1-GC / AD-FMR1/GCL)	12,0
Polymerase Mix (AD-FMR1-POM / AD-FMR1-POML)	0.5
Destilovaná voda	4.5
Celkový objem v každé reakci	18,0

6. Reakční směs před rozdělením do zkumavek pro PCR jemně promíchejte 3-5krát pipetováním, aby došlo k úplné homogenizaci.
7. Do každé jamky nebo zkumavky dávkujte 18 µl této reakční směsi.
8. Přidejte 2 µl příslušného vzorku DNA (10-40 ng/µl) nebo vodu v případě kontrolní jamky pro kontaminaci, abyste dosáhli konečného objemu 20 µl.
9. Uzavřete destičku (nebo zkumavky) krycími sklíčky a proveďte krátkou centrifugaci, abyste odstranili případné bubliny. Ujistěte se, že se celý objem usadil na dně zkumavky.
10. Umístěte destičku nebo zkumavky do termocykléru a spusťte program PCR.
11. Po skončení běhu pokračujte v přípravě vzorku pro kapilární elektroforézu nebo uložte produkt PCR při -20 °C.

➔ Příprava vzorku pro kapilární elektroforézu

1. Rozmrazte formamid a velikostní standard ROXTM 1000.
2. Před použitím zkumavky voperujte a roztočte.
3. Připravte následující směs přidáním složek uvedených v tabulce níže pro n+1 vzorků::

Reagencie	Objem na vzorek (µl)
Hi-Di™ Formamide	8,0
ROX 1000 size ladder	1,0
Celkový objem v každé reakci	9,0

12. Roztok promíchejte a odstřed'te, aby se shromáždil.
13. Do každé jamky kapilární elektroforézní destičky dávkujte 9 µl roztoku.
14. Přeneste 1 µl produktu PCR na destičku a promíchejte pipetováním.
15. Destičku uzavřete a odstřed'te, abyste odstranili bublinky.
16. Přeneste destičku do termocykléru.
16. Denaturujte DNA podle níže uvedeného programu:

	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)
DENATURACE	1	95	02:00
CHLAZENÍ	1	4	∞

17. Po skončení běhu přeneste destičku na led a chraňte ji před světlem až do injektu na genetickém analyzátoru. Translated

➔ Moduly genetického analyzátoru

Jsou vhodné následující moduly pro odpovídající genetické analyzátory.

Parameters	Genetic analyser		
	3130/3130xl	3730xl	3500/3500xl
Oven temperature	60°C	63°C	60°C
Current stability	5.0 µA	5.0 µA	5.0 µA
Pre-run voltage	15.0 kV	15.0 kV	15.0 kV
Pre-run time	180 s	180 s	180 s
Injection voltage	2.5 kV	2.5 kV	2.5 kV
Injection time	20 s	20 s	20 s
Voltage number of steps	20 nK	20 nK	40 nK
Voltage step interval	15 s	15 s	15 s
Data delay time	60 s	60 s	1 s
Run voltage	15.0 kV	15.0 kV	8.5 kV
Run time	2400 s	4000 s	4000 s

POZNÁMKA: Modul analyzátoru se může u různých přístrojů lišit a měl by být uživatelem validován.

10 – Výsledky a interpretace

Souprava Adellgene® Fragile X je kvantitativní technika pro stanovení počtu CGG tripletových repetit v 5'UTR genu FMR1. Souprava umožňuje kvantifikovat expanze až do 200 repetit.

Stanovení těchto alel je považováno za obtížné kvůli vysoké koncentraci GC, která vytváří silnou sekundární strukturu, jež brání replikaci této oblasti i při použití Taq polymerázy za vysokých teplot. Souprava Adellgene® Fragile X obsahuje řadu činidel, která umožňují amplifikaci této oblasti a stanovení počtu repetit, což umožňuje rozlišit mezi neexpandovanými, premutovanými a expandovanými jedinci.

Použití markeru molekulární velikosti se známou velikostí fragmentů umožňuje softwaru sekvenátoru vypočítat velikost amplifikovaného produktu přímo, a to prostřednictvím určení velikosti každého píku.

➔ Proces standardizace

Pro standardizaci pohyblivosti fragmentů v konkrétních podmínkách elektroforézy, v nichž se experiment provádí (polymer, genetický analyzátor atd.), se při výpočtu počtu opakování CGG používají dva korekční faktory: korekční faktor velikosti (C0) a korekční faktor specifické pohyblivosti (m0).

Hodnoty C0 a m0 lze vypočítat pomocí sdružené kontrolní DNA (činidlo s korekčním faktorem). Tato kontrola je směsí několika produktů PCR zahrnujících alely FMR1 se známým počtem tripletových

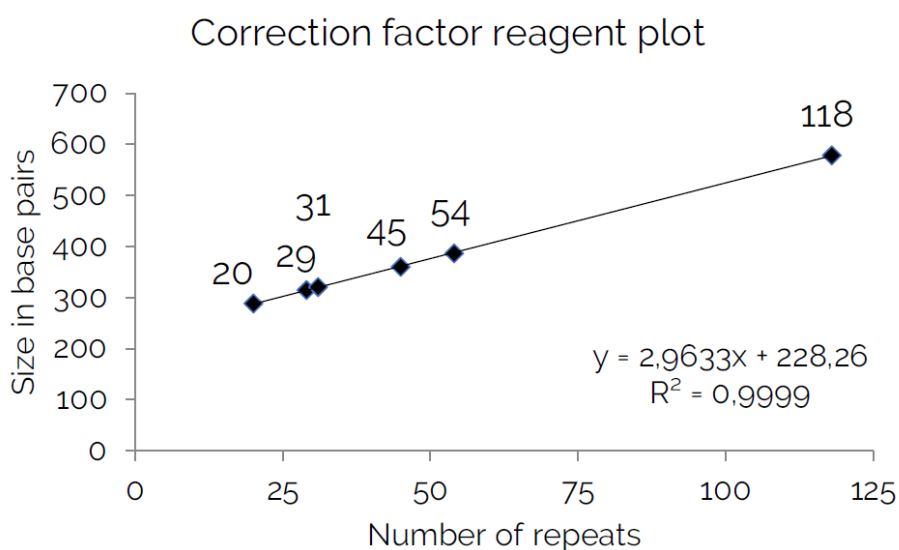
opakování a pohybujících se v celém rozsahu velikosti píků (<200 opakování). Hodnoty C0 a m0 se určí z lineárního přizpůsobení počtu opakování a velikosti fragmentů pro tyto alely.

Katalogové číslo	CGG repetice podle soupravy Adelgene® FragileX
NA20235	29, 45
NA20236	31, 54
NA06891	118
NA20239	20, 199

Tabulka 1 Referenční DNA templáty tvořící činidlo s korekčním faktorem. Další informace naleznete na adrese <https://www.coriell.org/>

Pro výpočet hodnot korekčních faktorů, které se použijí v experimentu, postupujte takto:

1. Analyzujte činidlo s korekčním faktorem v běhu a vypočítejte velikost píků pro každou z alel FMR1. Doporučuje se stanovit průměrnou velikost alel v párech bází ze dvou samostatných běhů.
2. V programu Excel nebo podobném programu vytvořte tabulku s předchozími údaji a počtem tripletových opakování každé alely a vložte rozptylový graf. Proved'te lineární regresi a získejte odpovídající rovnici lineární shody (obrázek 2).

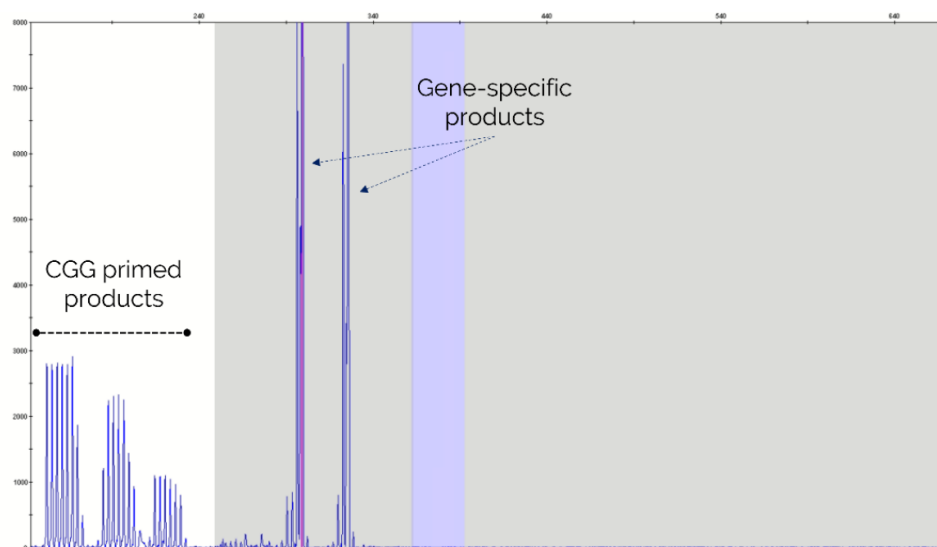


Z rovnice této regresní shody určete korekční faktory: C0 odpovídá průsečíku lineární shody, zatímco m0 odpovídá sklonu přímky. V zobrazeném grafu je C0 = 228,26 a m0 = 2,9633.

$$y = 2,9633x + 228,26 \quad R^2 = 0,9999$$

→ Interpretace elektroferogramů

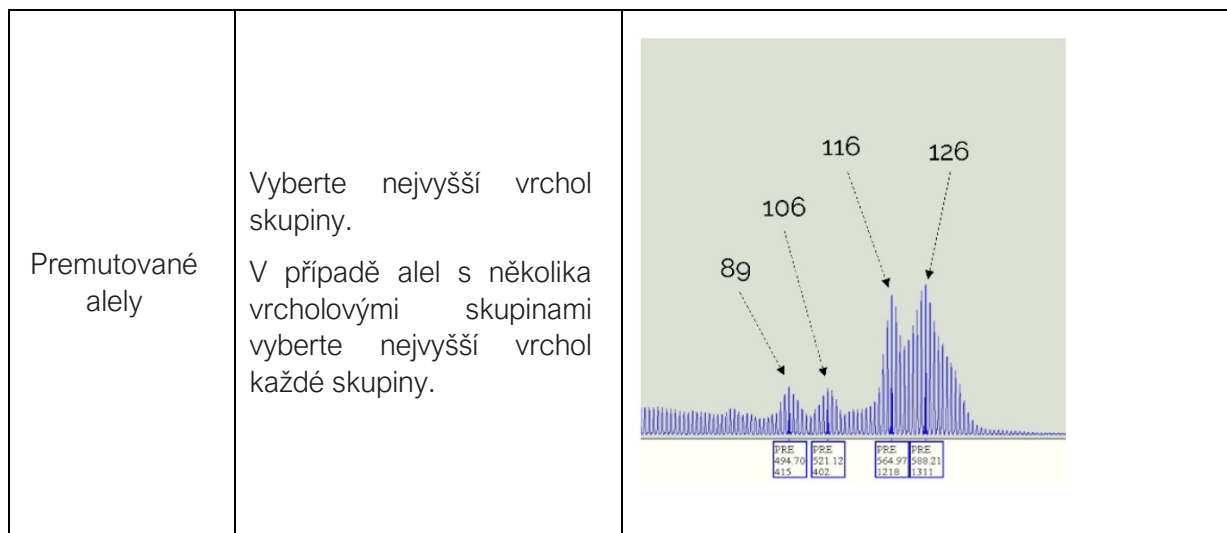
Chcete-li určit počet opakování CGG, identifikujte v elektroferogramech vrcholy produktů specifické pro daný gen v plné délce (odpovídající plné velikosti alel). Zrušte výběr vrcholů CGG žebříčku, aby zůstal vybrán pouze amplifikační produkt specifický pro daný gen. Příklad viz obrázek 3.



Obrázek 3. Elektroferogram identifikující produkty specifické pro daný gen.

Obrázek 4 ukazuje pokyny pro identifikaci hlavních cílových vrcholů mezi vrcholy genově specifických produktů.

Rozsah alel	Pokyny jak vybrat nejvyšší pík	Příklady
Normální až střední	Vyberte nejvyšší vrchol jedné skupiny alel. V případě heterozygotních alel s jedním rozdílem opakování CGG (např. 29/30) nemusí být dvě skupiny alel zcela odděleny. V takovém případě je třeba vybrat dva nejvyšší vrcholy.	



Obrázek 4 Identifikace hlavních píků v elektroforeogramu

→ Výpočet počtu opakování CGG

Pro výpočet počtu repetit odpovídajících každé alele je třeba použít rovnici uvedenou níže:

$$\text{No. of triplet repeats} = \frac{(\text{Peak size} - C_0)}{m_0}$$

Velikost píku (v párech bází)

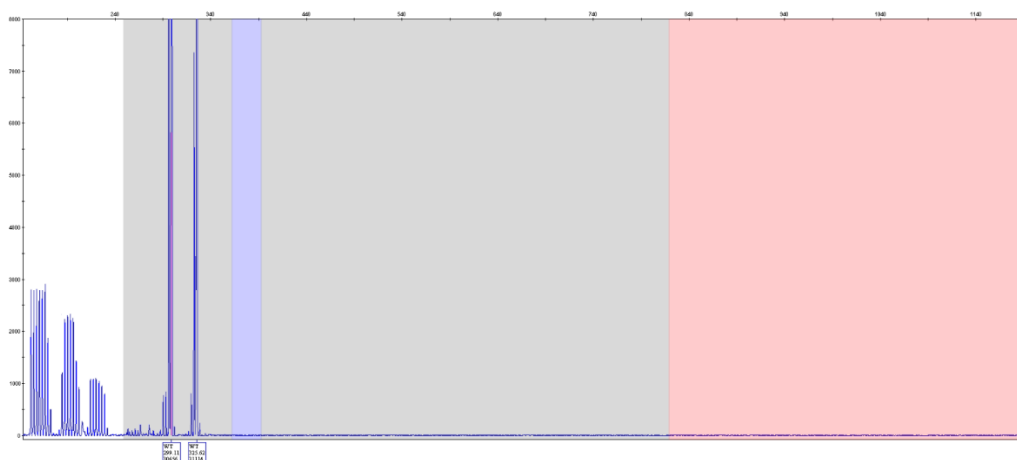
C0 - korekční faktor velikosti

m0 - korekční faktor mobility

Korekční faktory lze určit postupem popsáním v oddíle "Standardizační proces". Tyto hodnoty se mohou v jednotlivých laboratořích lišit, zvažte použití pozitivních kontrol, abyste si ověřili přesnost odhadu počtu opakování při prvním použití soupravy.

→ Výsledky elektroforeogramu

Příklady výsledků elektroferogramů získaných pomocí této soupravy jsou uvedeny na následujících obrázcích: zdravá heterozygotní žena (obrázek 5), heterozygotní žena se zdravou alelou a další premutací nebo rozšířenou alelou (obrázky 6-7) a rozšířený muž (obrázek 8).

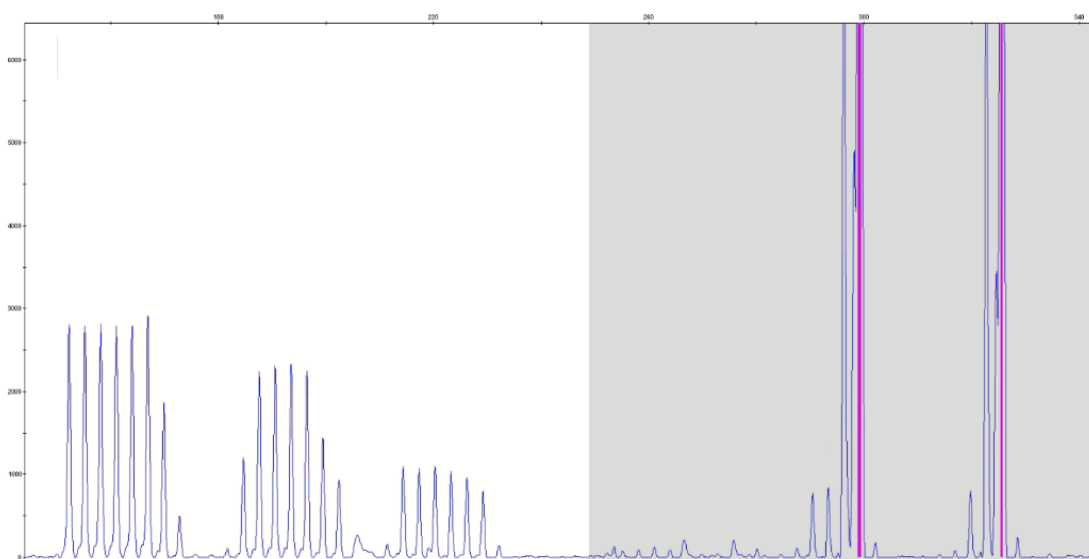


Obrázek.5 : Zdravá heterozygotní žena 22/31 CGG



Primery Adellgene® Fragile X jsou specifické pro CGG repetice a nehybridizují s AGG sekvencemi, které se běžně vyskytují v genu FMR1. Proto signální údolí, která se objevují na elektroforeogramu, odpovídají přítomnosti prokládaných oblastí AGG.

Předpokládá se, že přerušení AGG propůjčují DNA stabilitu a snižují riziko expanze v potomstvu [8]. Obrázek 9 ukazuje vzorek zdravé ženy, který poskytuje vzor složený z CGG a AGG tripletů, jak je uvedeno.



Obrázek 9 Vzorek zdravé ženy vykazující charakteristický vzorec tvořený triplety CGG a AGG

V případě, že se na elektroferogramu objeví saturovaný pík, lze provést nový nástřik zředěním produktů PCR (1:100, 1:200), aby se přesněji stanovila velikost píku.

11 - Kontrola kvality

Vzhledem ke kvantitativní povaze tohoto testu a s cílem zajistit správnou detekci fluorescenčního signálu musí být fluorofory FAM a ROX kalibrovány v genetickém analyzátoru.

Aby bylo možné správně změřit velikost alel, musí být do všech jamek přidán marker molekulové hmotnosti. U všech vzorků (včetně negativní kontroly) musí být detekovány všechny píky markeru molekulové hmotnosti.

V každém kole analýzy by měla být přidána kontrola bez šablony, aby se zajistilo, že test neobsahuje kontaminanty.

12 – Specifická operační data

→ Analytická specifita

Primery této soupravy jsou specifické pro lidský gen pro fragilní xmentální retardaci X (FMR1) (NC_000023.10) a zahrnují oblast opakování CGG v 5'UTR genu (NT_011681.16). Specifická amplifikace této oblasti byla ověřena sekvenováním DNA a testováním vzorků od zdravých jedinců a dobře charakterizovaných pacientů. Nebyly zaznamenány žádné případy zkřížené reaktivity s jiným genem z genomové DNA.

→ Analytická senzitivita

S cílem určit nejvhodnější množství DNA pro tento test bylo provedeno několik testů, při nichž bylo analyzováno pět různých vzorků (ženy zdravé, s premutací a s expanzí ženy a muži s premutací a expanzí), a to v množství od 10 ng do 200 ng. Přiřazení získané velikosti píku bylo nezávislé na použitém množství DNA. Doporučený pracovní rozsah je mezi 20 a 80 ng DNA.

→ Diagnostická specifita

Adellgene® Fragile X je specifický test pro detekci počtu CCG repetice v 5'UTR genu FMR1. Souprava umožňuje kvantifikaci zdravých a premutovaných alel sestávajících z počtu opakování až 200. Umožňuje také vizualizaci expandovaných alel (> 200 opakování CCG).

Mutace (bodové mutace, inserce, delece) v hybridizačních bodech amplifikačních primerů jsou možné a mohou vést k nedostatečnému definování alely. V těchto případech může být k rozlišení alel zapotřebí jiných technologií.

Diagnostická specifita byla hodnocena v jedné externí a jedné interní studii, přičemž bylo analyzováno celkem 34 vzorků s následujícími výsledky:

Typ vzorku	Počet analyzovaných vzorků
2 normální alely (do 45 or 55 CCG repetice)	7
1 premutované alely (45 or 55-200 CCG repetice)	18
1 expandované alely (>200 CCG repetice)	9
Celkový počet analyzovaných vzorků	34

Všechny výsledky se shodovaly s předchozími dostupnými informacemi o těchto vzorcích, které byly dříve analyzovány rutinní metodou zdrojové laboratoře.

→ Diagnostická senzitivita.

Souprava Adellgene® Fragile X dokáže přiřadit počet tripletových repetice CCG až do 200. To umožňuje klasifikovat alely přítomné ve vzorku jedince jako zdravé (do 45 nebo 55 CCG), premutované (45 nebo 55 až 200 CCG) nebo expandované (>200 CCG).

→ Přesnost

Interference

V existující literatuře je popsána řada látek, které mohou být přítomny v periferní krvi a které mohou potenciálně interferovat při PCR a inhibovat aktivitu polymerázy. Proto před provedením testu doporučujeme posoudit čistotu DNA. Většina standardních extrakčních metod umožňuje tyto látky vyloučit, a proto před provedením testu doporučujeme rovněž validovat použitou extrakční metodu.

Pravdivost

Přesnost počtu vypočtených repetice byla stanovena porovnáním velikostí získaných technikou Sangerova sekvenování s touto soupravou. Byla tak stanovena přijatelná variabilita ± 1 repetice pro zdravé alely a ± 3 pro alely, které obsahují 50-200 opakování.

13 - Omezení postupu

- Tato sada dokáže kvantifikovat všechny alely až do 200 repetice CCG.
- Mutace (bodové mutace, inserce, delece) v komplementárních oblastech k sekvenci primerů jsou možné a mohou vést k nedostatečnému určení alely. K rozlišení těchto alel může být zapotřebí jiných technologií.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli provedení, které těmto pokynům neodpovídá, mohou vést ke špatným výsledkům.

- Nepoužívejte soupravu, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnější krabičky nebo jakýkoli jiný případ, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Veškerá manipulace s činidly Adellgene® musí být prováděna v souladu s obecnou správnou laboratorní praxí a musí být přizpůsobena místním předpisům.
- Nemíchejte komponenty z jiných souprav nebo čísel šarží.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti. Prošlé reagenty likvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Termocykler musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán v souladu s pokyny výrobce.
- Údaje a interpretaci výsledků by měl revidovat kvalifikovaný personál.
- Tento výrobek je pomocným nástrojem pro diagnostiku pacientů s podezřením na poruchy související s genem FMR1. Tyto výsledky používejte ve spojení s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených u pacienta.

14 - Průvodce problémy

→ PCR negativní kontrola je pozitivní

- Kontaminace Primer mixu
 - o Opakujte experiment s novými alikvoty Primer mixu, Polymerase mixu/ vody
 - o S komponenty zacházejte podle běžně doporučené praxe, aby nedocházelo ke kontaminacím.
 - o Ověřte podmínky skladování a manipulace
 - o Zlikvidujte kontaminované reagenty
- Kontaminace pre-PCR prostoru
 - o Ověřte všechna opatření v prostoru pre-PCR .
 - o Ověřte možné problémy kontaminace v jiných metodách PCR
 - o Ověřte vlastnosti používaného spotřebního materiálu (zkumavky, pipetovací špičky)
- Chyby pipetování
 - o Ověřte, že vzorky odpovídají pracovnímu protokolu.

→ Nesprávná velikost nebo počet bandů

- Použitá nesprávná souprava
 - o Ověřte, zda používáte odpovídající soupravu
- Nesprávný program termocykleru
 - o Ověřte nastavení termocykleru
- Nesprávná velikost standardu pro kapilární elektroforézu nebo chybná detekce píku
 - o Ověřte že použitý standard je správný
- PCR – kontaminace
 - o Ověřte negativní kontrolu. Pokračujte podle protokolu pro dekontaminaci anebo opakujte PCR abyste identifikovali původ kontaminace.
- Nesprávné nastavení genetického analyzátoru
 - o Ověřte modul analyzátoru

→ Slabý signál elektroforeogramu

- Slabý produkt PCR
 - o Ověřte koncentraci DNA podle doporučených hodnot pro tento test
 - o Vyhněte se používání plné krve, která obsahuje heparin. Pokud je třeba, opakujte extrakci DNA a PCR.
- Nedostatečné množství DNA aplikováno do DNA analyzátoru
 - o Nastavte správné množství produktu.
- Nedostatečné množství přidané směsi primerů a/nebo směsi polymerázy nebo nedostatečné promíchání složek PCR.
 - o Opakujte PCR a ujistěte se, že všechny složky byly správně smíchány a bylo přidáno správné množství.
- Taq polymeráza ztratila aktivitu
 - o Zkontrolujte aktivitu polymerázové směsi.
 - o Opakujte s novou lahvičkou Polymerase Mix.
- Degradace soupravy
 - o Zkontrolujte, zda byla souprava skladována v souladu s pokyny výrobce.
 - o Nezmrazujte/rozmrazujte reagenty více než dvakrát.
 - o V případě potřeby připravte alikvoty reagentů.
 - o Opakujte analýzu s čerstvou dávkou činidel.

→ Vysoká intenzita fluorescence

- Příliš mnoho PCR produktu
 - o Ověřte gel. Zřed'te PCR produkt.
- Nesprávné nastavení genetického analyzátoru
 - o Viz dále
- Chyba pipetování
 - o Ověřte, že je přidán správný objem v každé jamce.

→ Vysoké pozadí (zahlušená základní linie)

- Kontaminace PCR t
 - o Viz výše
- Špatná kvalita PCR produktu
 - o Viz výše

15 - Odkazy

- 1) R. J. Hagerman et al., "Fragile X syndrome," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 3, p. 17065, Sep. 2017, doi: 10.1038/NRDP.2017.65.
- 2) V. Biancalana, D. Glaeser, S. McQuaid, and P. Steinbach, "EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders," *Eur J Hum Genet*, vol. 23, no. 4, pp. 417–425, Apr. 2015, doi: 10.1038/EJHG.2014.185.
- 3) R. Rosario and R. Anderson, "The molecular mechanisms that underlie fragile X-associated premature ovarian insufficiency: is it RNA or protein based?," *Mol Hum Reprod*, vol. 26, no. 10, pp. 727–737, Oct. 2020, doi: 10.1093/MOLEHR/GAAA057.
- 4) P. J. Hagerman and R. J. Hagerman, "Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1338, no. 1, pp. 58–70, Mar. 2015, doi: 10.1111/NYAS.12693.
- 5) S. L. Nolin et al., "Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation alleles," *Am J Med Genet A*, vol. 179, no. 7, pp. 1148–1156, Jul. 2019, doi: 10.1002/AJMG.A.61165.
- 6) C. M. Kraan, D. E. Godler, and D. J. Amor, "Epigenetics of fragile X syndrome and fragile X-related disorders," *Dev Med Child Neurol*, vol. 61, no. 2, pp. 121–127, Feb. 2019, doi: 10.1111/DMCN.13985.
- 7) "Fragile X Syndrome | Concise Medical Knowledge."
<https://www.lecturio.com/concepts/fragile-x-syndrome/> (accessed Apr. 19, 2022).
- 8) S. L. Nolin et al., "Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers," *Genetics in Medicine* 2015 17:5, vol. 17, no. 5, pp. 358–364, Sep. 2014, doi: 10.1038/gim.2014.106.
- 9) M. J. Basehore and M. J. Friez, "Molecular analysis of fragile X syndrome," *Curr Protoc Hum Genet*, vol. 80, no. SUPPL.80, 2014, doi: 10.1002/0471142905.HG0905S80.
- 10) X. Cai, M. Arif, H. Wan, R. Kornreich, and L. J. Edelmann, "Clinical Genetic Testing for Fragile X Syndrome by Polymerase Chain Reaction Amplification and Southern Blot Analyses," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1942, pp. 11–27, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9080-1_2.
- 11) E. Spector, A. Behlmann, K. Kronquist, N. C. Rose, E. Lyon, and H. v. Reddi, "Laboratory testing for fragile X, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)," *Genet Med*, vol. 23, no. 5, pp. 799–812, May 2021, doi: 10.1038/S41436-021-01115-Y.
- 12) H. Karunanathie, P. S. Kee, S. F. Ng, M. A. Kennedy, and E. W. Chua, "PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR," *Biochimie*, vol. 197, pp. 130–143, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2022.02.009.

16 - Upozornění pro zákazníka

- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely in vitro.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie a pokud dojde k závažnému incidentu v souvislosti s použitím soupravy, musí to uživatel nahlásit výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo zemi pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být provedeno v souladu s místními požadavky pro každou zemi.
- Výrobky společnosti Blackhills Diagnostic Resources S.L.U. by neměly být dále prodávány, upravovány za účelem dalšího prodeje nebo používány k výrobě jiných komerčních výrobků bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources S.L.U.
- Všechny informace obsažené v tomto dokumentu mohou doznat změn bez předchozího upozornění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources S.L.U. nenese žádnou odpovědnost za případné chyby v dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době jeho zveřejnění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources S.L.U. v žádném případě nenese odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo odvozené škody vzniklé v důsledku použití tohoto dokumentu. Tento výrobek je určen pro in vitro diagnostické použití.
- Zakoupení tohoto výrobku dává kupujícímu právo na použití jistých patentů firmy ROCHE, potřebných pro provádění vitro diagnostických služeb. Nedává obecný patent nebo jinou licenci jakéhokoliv druhu než toto specifické právo použití.
- FAM™ a ROX™ jsou obchodní známky firmy Life Technologies Corporation
- ROX™ a FAM™ mohou být pokryty jedním nebo více patenty vlastněnými firmou Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto výrobku zahrnuje omezená práva, která nejsou přenosná.
- ADELLGENE je obchodní známka firmy BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.U

17 – Kontrola změn

Verze	Popis změny
Rev. 02	Oprava chyb v psaní a překladu. Nové oddíly: Přesnost, Informace pro bezpečnost, Kontrola změn a Vysvětlení symbolů použitých na etiketách. Informace týkající se určeného uživatele a určeného pacienta. Nový formát dokumentu.

18 – Vysvětlení symbolů použitých na štítku



In vitro diagnostický prostředek



Datum expirace



Katalogové číslo



Obsah stačí pro <n> testů



Číslo šarže



Výrobce



Teplotní omezení



Chraňte před sluncem



Pozitivní kontrola



Prostudujte si elektronický
návod k použití



Tento výrobek splňuje požadavky Evropské Direktivy 98/79/EC pro in vitro diagnostické zdravotnické prostředky