



Adellgene®

Fragile X

NÁVOD K POUŽITÍ

Kit pro stanovení počtu CGG tripletových repetic
v genu *FMR1* fragmentační analýzou

Rev. 05 - 2024/09/19



Blackhills Diagnostic Resources S.L.U
Camino del Pilón 86, Casa 7, Local 50011 –
Zaragoza (Španělsko)



www.bdrdiagnostics.com



Kat. č:
AD-FMR1-25
AD-FMR1-100

UDI-DI
8437016942468
8437016942475

Skladování:
od -30°C do -18°C

Adellgene®

Fragile X

Obsah

1 -	<i>Informace pro bezpečnost</i>	2
2 -	<i>Zamýšlené použití</i>	2
3 -	<i>Shrnutí a vysvětlení</i>	3
4 -	<i>Zásady postupu</i>	4
5 -	<i>Obsah soupravy</i>	5
6 -	<i>Skladování soupravy</i>	5
7 -	<i>Požadované ale nedodávané materiály</i>	6
8 -	<i>Odběr a příprava vzorků</i>	7
9 -	<i>Návod k použití</i>	7
10 -	<i>Výsledky a interpretace</i>	10
11 -	<i>Kontrola kvality</i>	16
12 -	<i>Specifické operační údaje</i>	17
13 -	<i>Omezení postupu</i>	20
14 -	<i>Průvodce odstraňováním potíží</i>	21
15 -	<i>Bibliografie</i>	23
16 -	<i>Upozornění pro kupujícího</i>	24
17 -	<i>Řízení změn</i>	25
18 -	<i>Symbole použité při označování</i>	25

1 - Informace pro bezpečnost

Přečtěte si prosím pozorně tento návod k použití a při používání této IVD soupravy se jím řiďte.

Tuto soupravu IVD by měli používat odborníci s rozsáhlými zkušenostmi s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

V případě jakýchkoli pochybností týkajících se popisu testovací metody se poraďte s výrobcem. Kontaktujte nás telefonicky na čísle +34 976 094 603 nebo na e-mailové adrese customersupport@bdrdiagnostics.com.

Tato IVD souprava má omezenou trvanlivost. Před použitím se ujistěte, že souprava nepřekročila datum expirace, protože činidla by se mohla degradovat a generovat chybné výsledky. Reagencie s prošlou dobou použitelnosti zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.

Kontaminace vzorku nebo činidla může vést k nesprávným výsledkům. Buďte opatrní během procesu extrakce DNA a manipulace s činidly a vzorky.

Tato sada je náchylná k poškození během přepravy nebo skladování. Soupravu nepoužívejte, pokud existuje podezření, že byla poškozena během přepravy. Pečlivě dodržujte podmínky skladování popsané na etiketě a v návodu k použití.

Ujistěte se, že s odpady je nakládáno v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s tímto odpadem může vést ke znečištění životního prostředí.

Toxikologické vlastnosti soupravy nebyly studovány do hloubky, proto se doporučuje vyhnout se kontaktu s kůží a sliznicemi. Nepolykejte. Bezpečnostní listy (MSDS) jsou zákazníkům k dispozici na vyžádání a na webových stránkách výrobce.

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

2 - Zamýšlené použití

Adellgene® Fragile X je poloautomatická diagnostická souprava *in vitro* pro použití v klinických laboratořích umožňující kvantitativní stanovení počtu tripletových CGG repetic v 5' nepřekládané oblasti genu pro mentální retardaci fragilního X ("Fragile X mental retardation-1", *FMR1*; nebo *FXS*), sloužící jako pomůcka při klinické diagnostice onemocnění spojených se syndromem fragilního X, syndromem fragilního X-asociovaného třesu/ataxie (FXTAS) a primární ovariální nedostatečnosti spojené s fragilním X (FXPOI).

Souprava umožňuje kvantifikaci velikosti zdravých, intermediárních, premutantních a expandovaných alel o velikosti menší než 200 repetic. Expanze více než 200 repetic lze detekovat, ale ne kvantifikovat.

Postup je založen na amplifikaci genomové DNA, extrahované z plné krve a/nebo bukalního výtěru, pomocí Triplet Repeat Primed polymerázové řetězové reakce (TP-PCR) s fluorescenčními primery, následné analýze velikosti amplifikovaných fluorescenčních fragmentů v kapilárním sekvenátoru a přepočtu velikosti fragmentu na odpovídající počet repetic.

Pacient doporučený příslušným zdravotnickým specialistou (např. neurologem) může být podroben tomuto určení, s přihlédnutím ke slučitelnosti prezentovaných symptomů (zejména pro FXS: opoždění vývoje, mentální postižení, charakteristické kraniofaciální rysy, porucha

autistického spektra, hyperaktivní a/nebo impulzivní chování; pro FXTAS: pozdní nástup, progresivní mozečková ataxie a/nebo záměrný třes; a pro FXPOI: hypergonadotropní hypogonadismus před dosažením věku 40 let) a/nebo rodinná anamnéza.

Zamýšleným uživatelem této soupravy je technický personál vyškolený a kvalifikovaný k provádění protokolu popsaného v návodu k použití a interpretaci jeho výsledků.

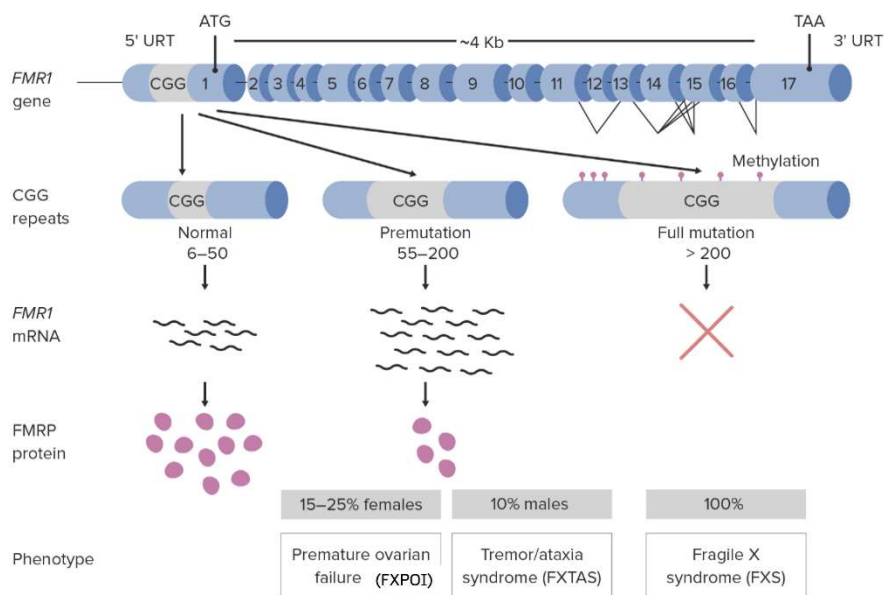
3 - Shrnutí a vysvětlení

Syndrom fragilního X (FXS, OMIM #300624) je onemocnění vázané na X založené hlavně na genomové expanzi tripletu nukleotidů CGG (cytosin-guanin-guanin), který se nachází v 5' nepřekládané oblasti genu Fragile X Mental Retardation 1 (*FMR1*) na chromozomu Xq27, a aberantního methylačního stavu promotoru genu (obr. 1)¹.

Na základě počtu triolových repetit lze stanovit čtyři kategorie:

- Zdravé alely: méně než 45 repetit CGG bez metylace promotoru genu. Nejběžnější alely obsahují 29 nebo 30 repetit. ¹
- Alely střední nebo šedé zóny: od 45 do 54 repetit CGG. Alely v tomto rozmezí nejsou spojeny s FXS a lze je považovat za normální. Nebylo pozorováno, že by intermediární alely expandovaly do plné mutace v jedné generaci, i když byly popsány velmi vzácné případy expanze na premutaci. ^{1,2}
- Premutační alely: od 55 do 200 repetit CGG, bez aberantní metylace. V tomto případě jsou jedinci asymptomatictí pro poruchy spojené s FXS, ale mohou být spojeny se dvěma klinickými poruchami: Třes/ataxie spojená se syndromem fragilního X (FXTAS) a fragilní X-spojená s primární ovariální insuficiencí (FXPOI), jejíž závažnost závisí na stavu metylace promotoru ^{3,4}. Odhaduje se, že prevalence v obecné populaci je 1 z každých 130-250 žen a 1 z každých 250-810 mužů⁵. Premutační alely jsou navíc nestabilní a mohou se zvětšovat během přenosu matky na potomky, což vede k úplné mutaci.⁶
- Úplné mutační alely: více než 200 repetit CGG, s aberantní hypermethylací promotoru genu. Tento genotyp vede k potlačení genové exprese v lidském mozku, což je spojeno s mentální retardací, autismem a duševními a emocionálními změnami. Pacienti s rozšířenými alelami vykazují nápadný fenotyp skládající se z velkých uší a prodlouženého obličej¹. Závažnost kognitivního poškození u pacientů s FXS není spojena s velikostí plné mutace, ale mění se se stavem metylace.⁷

Mnoho alel *FMR1* obsahuje rozptýlené AGG sekvence mezi repetitami CGG. Předpokládá se, že tyto inserce mohou propůjčit stabilitu DNA a snížit riziko expanze tripletových repetit v další generaci. Proto je pravděpodobnost expanze repetit CGG u potomků vyšší, pokud matka nevykazuje AGG inserce v alele *FMR1*. ^{6,8}



Obrázek 1. Zobrazení typů genu *FMR1* a jejich produkce v závislosti na stupni mutace. Převzato z odkazu 11.

4 - Zásady postupu

Tento test je založen na kapilární sekvenční analýze velikosti fluorescenčních fragmentů získaných technologií Triplet-Repeat PCR (TP-PCR).

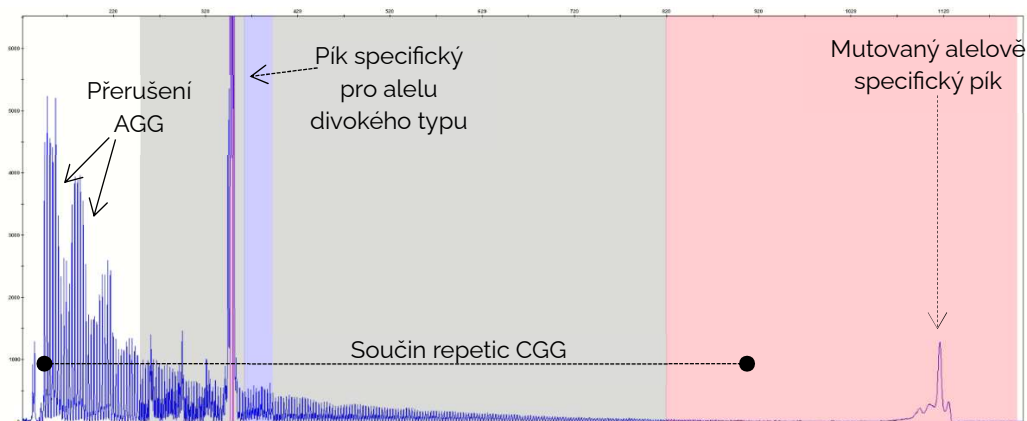
Pro amplifikaci TP-PCR se používá:

- Pár primerů pro amplifikaci fragmentu genu *FMR1* se zajímavými repetitivními tripletů CGG. Jeden ze primerů tohoto páru je na 5' konci označen fluoroforem FAM.
- Třetí komplementární primer s tripletovou sekvencí CGG.

Reakce TP-PCR generuje v závislosti na repetitivních v analyzované DNA amplifikované fragmenty různých velikostí značené FAM. Tyto fragmenty jsou následně separovány podle své velikosti v přístroji pro kapilární elektroforézu (CE). Kapilární elektroforézní analýza produktů TP-PCR generuje:

- Alelově specifické píky mají být identifikovány a převedeny na počet repetitivních CGG pomocí korekčních faktorů pro velikost (c_0) a mobilitu (m_0).
- Primované píky CGG repetitivních ("stutter" peak pattern) odpovídají jednotlivým PCR amplikonům z každé kombinace komplementárního primeru s reverzním primerem. Tyto píky jsou od sebe vzdáleny 3 páry bází.

Komplementární primer s tripletovou sekvencí CGG se nehybridizuje s přerušeními AGG. Přítomnost přerušení AGG vytváří ostré poklesy (propady) v intenzitě vzoru "zadrhávání".



Obrázek 1. Elektroferogram získaný pomocí soupravy Adellgene® Fragile X

Tímto testem je možné následující:

- Detekce a určení velikosti alel s méně než 200 repeticemi CGG.
- Detekce alel s více než 200 CGG repeticemi, ale neurčení jejich velikosti. Tyto alely by měly být identifikovány jako >200 CGG repetice.
- Odvodí počet přerušeni AGG z profilu repetice CGG.

5 - Obsah soupravy

→ AD-FMR1-25 (25 testů)

- AD-FMR1-PM: 1 lahvička x 250 µl Primer Mix – modrý uzávěr
- AD-FMR1-MM: 1 lahvička x 200 µl Master Mix – červené víčko
- AD-FMR1-C+: 1 lahvička x 15 µl Positive Control– zelené víčko
- AD-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank– průhledný uzávěr
- AD-RED-X: 1 lahvička x 25 µL Red 1000 Size Ladder– neprůhledná hnědá lahvička

→ AD-FMR1-100 (100 testů)

- AD-FMR1-PML: 1 lahvička x 1000 µl Primer Mix – modrý uzávěr
- AD-FMR1-MML: 1 lahvička x 800 µl Master Mix – červené víčko
- AD-FMR1-C+: 1 lahvička x 15 µl Positive Control– zelené víčko
- AD-RB: 1 lahvička x 100 µl Reaction Blank– průhledný uzávěr
- AD-RED-L: 1 lahvička x 100 µL Red 1000 Size Ladder– neprůhledná hnědá lahvička

6 - Skladování soupravy

Všechny součásti soupravy by měly být po obdržení skladovány v teplotě -30 °C až -18 °C, s výjimkou komponent AD-RED-X/L, které by měly být po prvním použití skladovány při 4°C. Za těchto podmínek si souprava zachovává svou funkčnost až do data expirace uvedeného na štítku.

Neprovádějte více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení na lahvičkách patřících k soupravě, protože to může snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Pokud má být test proveden na malém

počtu vzorků, doporučuje se rozdělit složky na poměrné části (aliquoty), aby se snížil počet cyklů zmrazení/rozmrazení.

Vzhledem k fotosenzitivní povaze činidla se vyhněte trvalému vystavení světlu.

7 - Požadované ale nedodávané materiály

→ Obecné

- Jednorázové rukavice
- Laboratorní plášť

→ Spotřební zboží

- Špičky s filtrem (P1000, P20, P2)
- 1,5 ml autoklávované zkumavky
- PCR destičky/zkumavky kompatibilní s použitým přístrojem s odpovídajícími uzávěry/kryty.

→ Činidla

- Polymer POP-7 (odkaz: 4363785, Applied Biosystems™), Spectrum Compact Polymer7 (odkaz: CE237A, Promega™) nebo ekvivalentní
- Vysoce deionizovaný (Hi-Di) formamid (odkaz: 4311320, Applied Biosystems™) nebo ekvivalentní

→ Vybavení

- Vírový mixér (Vortex)
- Odštědivka na destičky/zkumavky na PCR
- Mikropipety (P1000, P20, P2)
- Spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Scientific™) nebo ekvivalentní
- Termocyklery. Validováno bylo následující vybavení:
 - VeritiPro™ a VeritiFlex™ Thermal Cycler, 96-Well, Applied Biosystems™
 - Biometra Analytik Jena T Profesionální termocykler PCR W/Module 96 070-91
- Přístroje pro kapilární elektroforézu. Validovány byly následující přístroje:
 - Pro polymer POP-7:
 - 3130xl Genetický analyzátor, Applied Biosystems™ (*)
 - 3500xl Genetický analyzátor, Applied Biosystems™ (*)
 - Pro polymer POP-1:
 - Genetický analyzátor SeqStudio, Applied Biosystems™
 - Pro kompaktní polymer Spectrum7:
 - Spectrum Compact CE systém, Promega™ (*)

(*) Zařízení musí být kalibrováno pro fluorofory FAM a ROX (DS-30 Matrix Standard kit, Dye Set D, 4345827 ThermoFisher; nebo ekvivalent).

8 - Odběr a příprava vzorků

Vzorky musí být odebrány v souladu s návodem k použití použitého prostředku (není součástí sady) a odpovídajícími národními a mezinárodními směnicemi.

Tento test by měl být proveden s genomovou DNA extrahovanou z bukalního výtěru nebo plnou krví odebranou ze zkumavek s EDTA antikoagulanciem nebo citrátem (viz bod 12).

Tato technika je kompatibilní s několika systémy extrakce DNA. Byly testovány některé potenciálně rušivé látky, které by mohly ovlivnit výsledky (viz bod 12). Před vydáním výsledků pro diagnostické účely musí být provedena validační zkouška použitou extrakční metodou.



POZOR!

Všechny biologické vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční. Při manipulaci s nimi je třeba dodržovat odpovídající základní a obecná opatření.

9 - Návod k použití

→ Vyhodnocení výchozí DNA

Doporučuje se zkontrolovat koncentraci (absorbance při 260 nm) a čistotu (absorbanční poměr 260/280 nm a A260/230) vstupní DNA pomocí spektrofotometru. Vzorky musí splňovat hodnoty A260/280 > 1.8 a A260/230 > 1.3. Vzorky s hodnotami poměrů nižšími než stanovené hodnoty musí být znovu extrahovány.

Pro optimální výkon se doporučuje upravit počáteční koncentraci DNA na 16 ng/μl.

→ Příprava amplifikační reakce



POZOR!

- Definujte pracovní prostory před a po PCR, které by měly být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Připravte si amplifikační reakci v pre-PCR oblasti.
 - Noste jednorázový laboratorní plášť a rukavice.
 - Pracujte na ledu nebo na studené podložce. Minimalizuje se doba, která uplyne mezi přípravou reakce a zahájením zkoušky.
 - Doporučuje se, aby do každého běhu byly přiloženy Reaction Blank (negativní kontrola) Positive Control (pozitivní kontrola) dodávané se soupravou.
1. Před zahájením testu rozmrazte lahvičky Primer Mix (PM), Master Mix (MM), Reaction Blank (RB) a Positive Control (C+). Vortexujte PM lahvičku a jemně promíchejte MM lahvičku. Krátce odstředte, aby se celý objem shromáždil na dně lahviček.
 2. Pro n vzorků (+10 % přebytek) připravte následující reakční směs:

Činidlo	Objem na vzorek (μl)
Master Mix	8
Primer Mix	10

Dobře promíchejte a krátce odstředte, aby se veškerý obsah uložil na dno zkumavek.

3. Přidejte 18 μl reakční směsi do každé zkumavky/jamky na PCR destičce.
4. Do každé zkumavky/jamky přidejte 2 μl DNA (doporučená koncentrace 16 ng/μl), RB nebo C+.
5. Zkumavky uzavřete nebo utěsněte destičku PCR pomocí vhodného těsnění, krátce promíchejte a odstředte, aby se celý objem nanest na dno jamky.
6. Nakonfigurujte amplifikační program, jak je uvedeno v následující části.

→ Konfigurace termocykleru

1. Zvolte teplotní rámec termocykleru v rozsahu **3 až 3,9°C/s**.
2. Nastavte následující amplifikační program:

Počet cykl.	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)
1	98	05:00
5	99	00:45
	62	00:45
	68	04:00 + 20 s navíc v každém cyklu
25	99	00:45
	64	00:45
	68	04:00 + 20 s navíc v každém cyklu
1	72	30:00
1	4	∞

3. Umístěte zkumavky/destičku do termocykleru a spusťte test.

Po amplifikaci pokračujte přípravou vzorku pro kapilární elektroforézu. Pokud nepokračujete přímo se sekvenováním, skladujte PCR produkty při 4°C po dobu maximálně 1 týdne nebo při -20°C po delší dobu.

→ Příprava vzorků pro kapilární elektroforézu



OPATRŇE!

S formamidem by se mělo zacházet s extrémní opatrností, protože může způsobit podráždění kůže, dýchacích cest a očí. Vyhněte se vdechování jeho par tím, že s nimi budete manipulovat v dostatečně větraných digestořích.

1. Rozmrazte formamid. Rozmrazte AD-RED-X/L, pokud jej používáte poprvé. Pokud to není poprvé, vyjměte toto činidlo z chladničky. Před použitím zkumavky promíchejte a odstředte.
2. Pro n vzorků + 10% přebytek připravte následující reakční směs:

Činidlo	Objem na vzorek (μl)
Hi-Di™ formamid	11
AD-RED-X/L	1
Celkový objem	12

Směs se homogenizuje a krátce se odstřeďuje tak, aby byl celý objem na dně zkumavky.

3. Přidejte 12 μl směsi do každé jamky CE destičky.
4. Přidejte 2 μl amplifikačního produktu a 5 krát promíchejte pipetou, aby bylo zajištěno důkladné promíchání.
5. Elektroforézní destička se uzavře vhodným krytem a krátce se odstřeďuje, aby se zajistilo, že celý objem bude uložen na dně jamky. Zkontrolujte, zda na něm nejsou žádné bubliny.
6. Vložte destičku do termocykleru a nastavte následující denaturační program:

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)
1	95	05:00
1	4	05:00
1	4	∞

7. Jakmile je denaturace dokončena, udržujte destičku při 4°C chráněnou před světlem, dokud nebude vstříkována do přístroje pro kapilární elektroforézu. Za těchto podmínek je přípravek stabilní až 24 hodin.

→ Konfigurace kapilárního sekvenátoru

1. Při konfiguraci získávání dat postupujte podle pokynů výrobce přístroje. Přístroj musí být kalibrován pro detekci fluoroforů FAM a ROX.

2. Jako základní protokol použijte výchozí *pracovní modul Fragment Analysis* pro konkrétní polymer a délku kapiláry přístroje.
3. Přizpůsobte podmínky vstřikování a dobu chodu konkrétním přístrojům, kde bude analýza prováděna. Intenzita piků se liší mimo jiné v závislosti na vstupní koncentraci gDNA, tepelném cyklu a teplotní rychlosti použité během kroku zesílení, stejně jako na přístroji pro kapilární elektroforézu. V následující tabulce jsou uvedena nastavení použitá k dosažení hodnot uvedených v části 12:

Parametry	Kapilární sekvenátor			
	3130xl	3500xl	SeqStudio	Spektrum Compact
Provozní napětí	15.0 kV	15.0 kV	7000 V	14.0 kV
Doba běhu	2800 s	2600 s	2300 s	6000 s
Vstřikovací napětí	2.5 kV	2.5 kV	2500 V	4.0 kV
Doba vstřikování	30 s	20 s	20s	20 s
Teplota pece	60°C	60°C	-	60°C
Poly Fill Vol.	7300 kroky	-	-	-
Stabilita proudu	5.0 µA	-	-	-
Předprovozní napětí	15.0 kV	15.0 kV	-	-
Doba před spuštěním	180 s	180 s	-	-
Napětí Počet kroků	20 nK	-	-	-
Interval kroku napětí	15 s	-	-	-
Doba zpoždění dat	60 s	60 s	-	-

Předchozí nastavení jsou saturační podmínky zaměřené na dosažení citlivé detekce mutovaných alel s vyšší velikostí. Za těchto podmínek by se piky specifické pro wild-type alelu s menší velikostí mohly jevit jako nasycené, což může bránit jejich přesnému určení. V těchto případech se doporučuje zkrátit dobu injekce o 50 % až 75 %, dokud se hodnoty intenzit piků wild-type alely neupraví podle použitého nástroje pro kapilární elektroforézu.

→ Zneškodňování odpadu

Všechny odpadní produkty musí být zlikvidovány v souladu s místními předpisy.

10 - Výsledky a interpretace

→ Prezentace výsledků

Analýza výsledků se provádí pomocí specifického softwaru použitého kapilárního sekvenátoru podle návodu výrobce k použití.

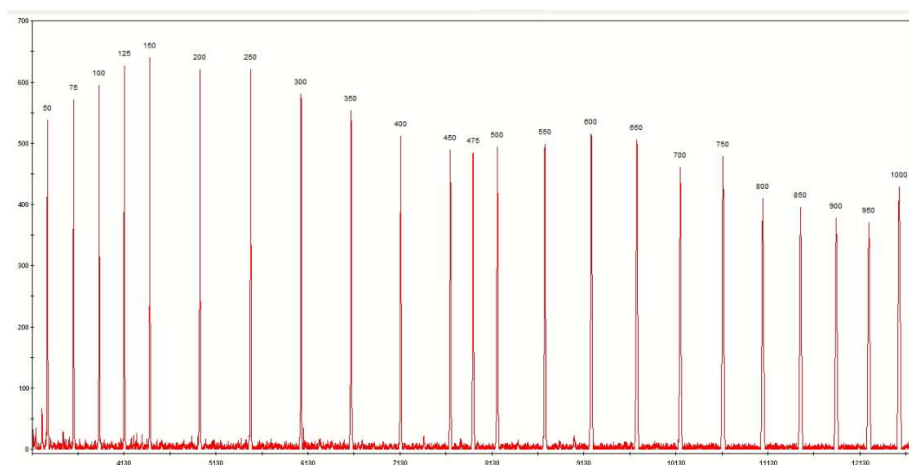
Výsledky spuštění kapilární elektroforézy (soubory *.fsa) je nutné importovat do analytického softwaru, jako je GeneMapper™ nebo ekvivalentní. Výsledky by měly být analyzovány v souladu s návodem k použití výrobce softwaru a v souladu s metodou analýzy a konfigurací sady značek velikosti pro Adellgene® Fragile X. Použití panelů s rozsahy repetice stanovenými na základě GeneReviews¹² **iError! No se encuentra el origen de la referencia.** a na hodnotách c_0 a m_0 získaných v našich instalacích může usnadnit prezentaci výsledků. Tyto soubory jsou k dispozici na vyžádání z e-mailové adresy customersupport@bdrdiagnostics.com.

Přítomnost markeru molekulové hmotnosti

Aby bylo možné provést správné určení velikosti alel, je nezbytné přidat marker molekulové hmotnosti (AD-RED-X/L) do všech jamek, které budou analyzovány v kapilárním sekvenátoru. Píky odpovídající markeru molekulové hmotnosti by tedy měly být detekovány ve všech analyzovaných vzorcích včetně pozitivní kontroly a slepé reakce (Positive Control a Reaction Blank).

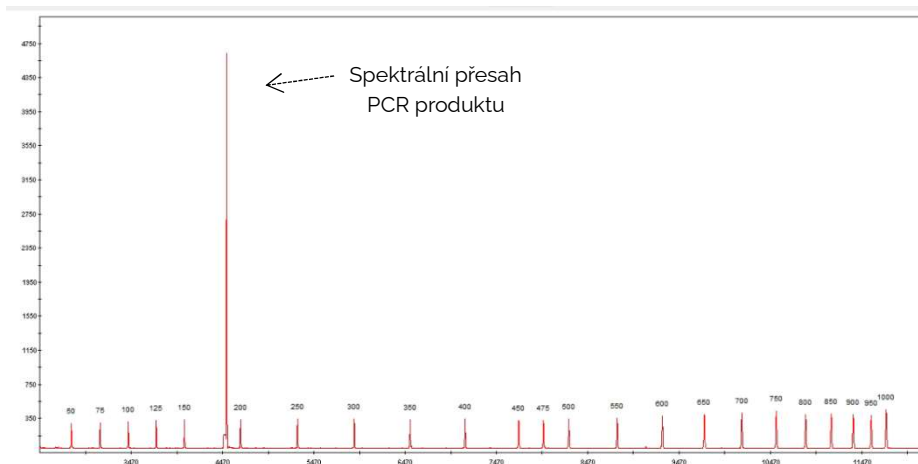
Elektroferogram ROX kanálu všech testovaných jamek by měl ukazovat 23 piků (od 50 do 1000 bp) od markeru molekulové hmotnosti. Velikost piků je následující: 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 a 1000 základních párů.

Před identifikací piků je nutné zkontrolovat, zda se marker molekulové hmotnosti chová podle očekávání ve všech analyzovaných vzorcích. 23 piků musí být detekováno a označeno správně, jak je znázorněno na následujícím obrázku.



Obrázek 2. Píky značky AD-RED-X/L

V některých případech lze pozorovat spektrální přesah PCR produktu v ROX kanálu, který se objevuje mezi píky velikostního markeru. Existence tohoto piků by neměla být v rozporu s algoritmem kalibrace velikosti analytického softwaru. Pokud přesahuje, odznačte tento pik a ručně opravte přiřazení piků značky.



Obrázek 3. Píky markeru AD-RED-X/L se spektrálním překryvem PCR

Jamky, které mají méně než 23 piků velikosti markeru, by měly být z analýzy vyloučeny a znovu testovány.

Jakmile je ověřeno správné chování markeru molekulové hmotnosti každého vzorku, pokračuje se vizualizací a výběrem piků na elektroferogramech, jak je uvedeno níže.

Vizualizace TP-PCR reakce

Po CE by měly být v kanálu FAM pozorovány signály z amplifikovaných fragmentů generovaných reakcí TP-PCR:

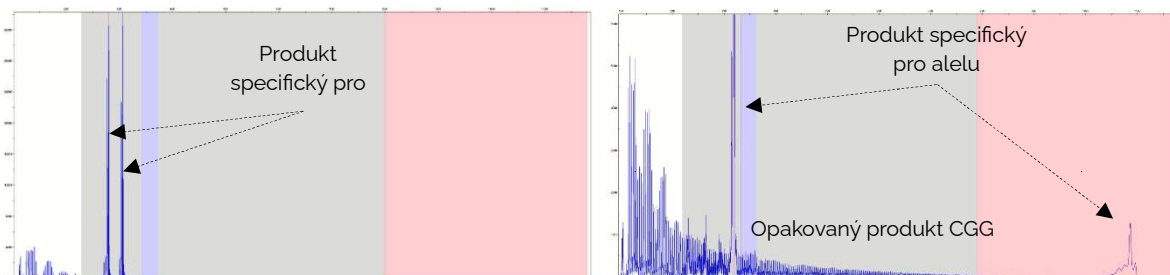
- Alelově specifické píky by měly překročit hodnoty intenzity uvedené v následující tabulce:

Kapilární sekvenátor	Mezní hodnota (RFU)
3130xl	50
SeqStudio	175
3500xl	175
Spektrum Compact	175

- Vzory "kockání" naznačují přítomnost repetice CGG. Intenzita fluorescence vzoru "stutter" může být nižší než intenzity stanovené pro píky specifické pro alely, jak je podrobně uvedeno v následující tabulce:

Kapilární sekvenátor	Mezní hodnota (RFU)
3130xl	10
SeqStudio	50
3500xl	50
Spektrum Compact	50

Typické elektroforetické vzory pro TP-PCR reakci jsou znázorněny na následujících obrázcích.



Obrázek 4. Elektroferogramy odpovídající vzorku se dvěma alelami divokého typu (vlevo) a vzorku s jednou alelou divokého typu a druhou mutovanou alelou s >200 CGG (vpravo) získané pomocí soupravy Adellgene® Fragile X

→ Identifikace píků

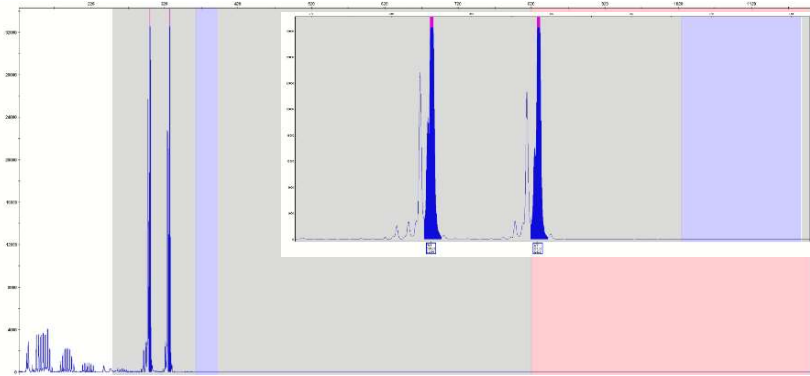
Tvar alelově specifických píků závisí na jejich poloze v elektroferogramu. Proto je pro identifikaci těchto píků třeba vzít v úvahu jejich velikost.



VAROVÁNÍ!

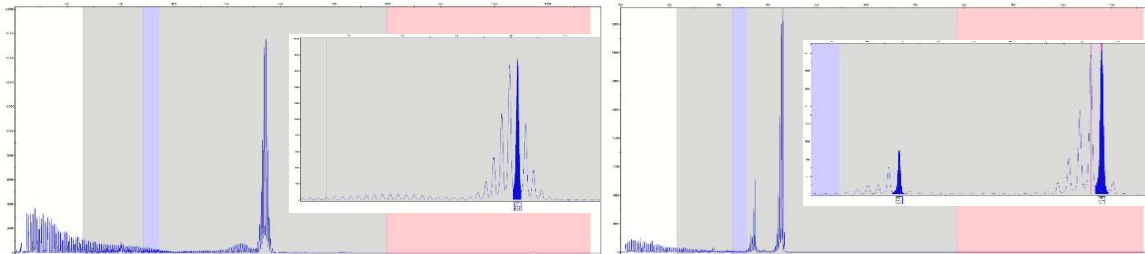
Tato sada je navržena tak, aby detekovala mutované alely, které jsou větší než alely divokého typu. Z tohoto důvodu se intenzita fluorescence alel divokého typu může jevit jako nasycená. V těchto případech může být pro správné přiřazení velikosti nasycených píků nutné znovu analyzovat v kapilárním sekvenátoru amplifikovaný produkt po zředění vodou v poměru 1:100 za použití výše popsaných podmínek vstřikování nebo znovu analyzovat v kapilárním sekvenátoru původně připravenou směs zkrácením doby vstřikování o 50 % až 75 %.

Píky alel s nízkým počtem repetic se objevují v levé části elektroferogramu jako píky s vysokou fluorescenční intenzitou (nasycené), kterým předcházejí píky nižší intenzity. Alelově specifický pík je považován za nejvyšší pík skupiny píků, obvykle vrchol zcela vpravo. V případě vzorků s alelami, které se liší v několika repeticích, jsou pozorovány dva píky podobné intenzity, kterým předcházejí píky nižší intenzity. Vyberte dva intenzivnější vrcholy jako alelově specifické.



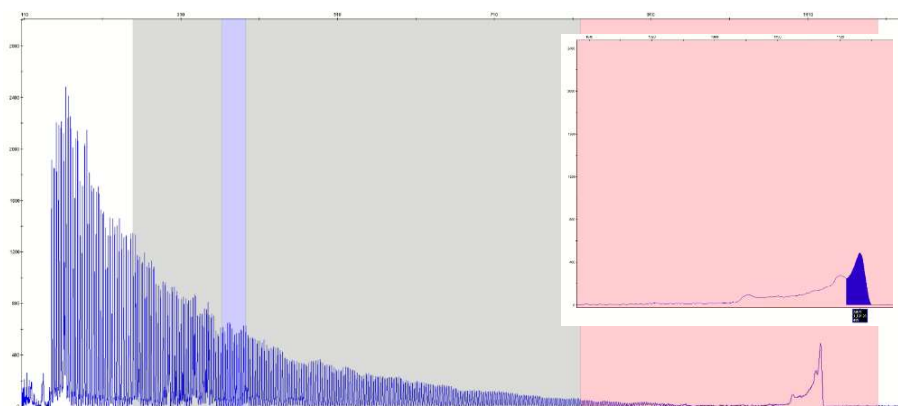
Obrázek 5. Elektroferogram vzorku heterozygota s alelami divokého typu lišícími se ve více než 1 repetici.

Jak se velikost alel (a počet repetic) zvyšuje, tvar píků se mění a stává se shlukem nebo shluky píků. Alelově specifický signál je doprovázen signálem "stutter" píku od začátku panelu k poslednímu shluku píků. Jako alelově specifický pik vyberte nejvyšší vrchol každého shluku píků.



Obrázek 6. Elektroferogram premutovaného vzorku (<200 repetic CGG) (vlevo). Signál "stutter" "sekaného" píku je pozorován od začátku panelu a dosáhne posledního shluku píků.

Alely s vysokým počtem repetic (>200 CGG) se jeví jako hora naskládaných vrcholů. Jako alelově specifický pik vyberte nejvyšší vrchol. V těchto případech by měl být také pozorován „stutter“ "zadržávající" vzor píků od začátku panelu, který slábne s rostoucí velikostí fragmentu a ztrácí se dříve, než se objeví hora naskládaných vrcholů.



Obrázek 7. Elektroferogram homozygotního mužského vzorku s mutovanými alelami (>200 repetit CGG). Na konci panelu je pozorován pik složený z naskládaných píků a odpovídající mutované alele. V těchto případech je "stutter" "zasekávající" vzorec vrcholů pozorován od začátku panelu a ztratí se dříve, než se objeví hora naskládaných vrcholů.

Páry bází alelově specifických piků by měly být převedeny na počet repetic, jak je uvedeno v následující části.



VAROVÁNÍ!

Píky odpovídající počtu repetic CGG většímu než 200 by měly být kategorizovány jako repetice >200 CGG, bez ohledu na počet repetic získaných při výpočtu.

→ Výpočet počtu repetic tripletů

Páry bází sledovaného piků se získají porovnáním s velikostí fragmentů markerů molekulové hmotnosti. Fragmenty s repeticemi CGG a fragmenty markeru molekulové hmotnosti mají různou mobilitu, takže; Pro správný převod párů bází na počet repetic je nutné použít korekční faktory velikosti (c_0) a korekční faktor mobility (m_0). Základní páry piků by měly být převedeny na počet repetic CGG pomocí následujícího vzorce:

$$\text{Počet tripletových repetic} = \frac{(\text{Párů bází piků} - c_0)}{m_0}$$



VAROVÁNÍ!

Hodnoty c_0 a m_0 se liší v závislosti na faktorech, jako je kapilární sekvencer, délka kapiláry, typ polymeru a provozní podmínky. Aby byl zajištěn přesný odhad počtu repetic, doporučuje se před použitím soupravy vypočítat specifické korekční faktory c_0 a m_0 na základě vzorků se známým počtem repetic.

Následující tabulka ukazuje hodnoty m_0 a c_0 vypočtené v našich zařízeních:

Přístroj	m_0	c_0
3130xl	3,0233	232,04
SeqStudio	3,0218	233,18
3500xl	3,0281	232,87
Spektrum Compact	3,0317	229,01

Alely piků, pro které je získáno číslo větší než 200 repetic, musí být kategoricky typizovány jako >200 CGG repetic, bez ohledu na jejich polohu na elektroferogramu.

→ Interpretace výsledků

V závislosti na počtu získaných repetic a rozsazích navržených v GeneReviews¹² **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, alely lze klasifikovat podle následující tabulky:

Klasifikace alel	Počet. repetic CGG
Normální	5-44
Intermediární (šedá zóna nebo hraniční)	45-54
Premutace	55-200
Plná mutace	>200

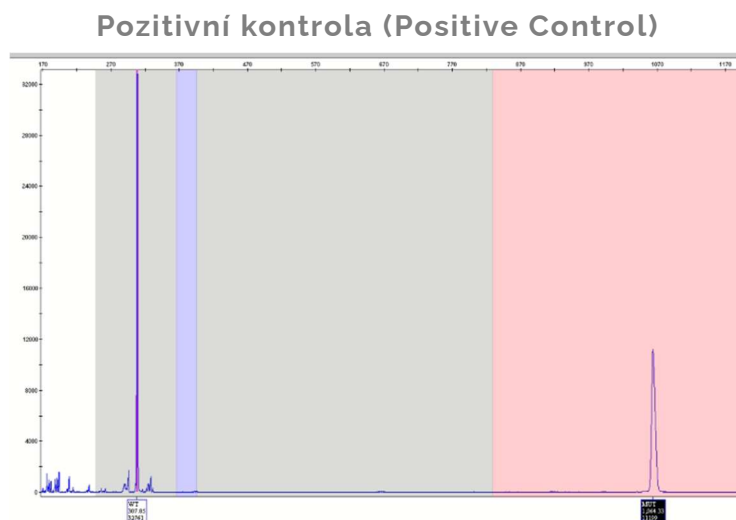
Rozsah reportovatelných repetic CGG je mezi 5 a 200 repeticemi. Nad 200 repetic by měly být alely kategoriicky přiřazeny jako >200 CGG repetic.

11 - Kontrola kvality

Souprava obsahuje Reaction Blank (slepu reakci) a Positive Control (pozitivní kontrolu), které musí být součástí každého testu. Pokud se kontrolní vzorky chovají podle očekávání, je to záruka správného fungování každé reakce.

U jamek se Reaction Blank (slepým vzorkem) by se v ROX kanálu pro marker molekulové hmotnosti mělo objevit pouze 23 piků.

U elektroferogramu Positive Control (pozitivní kontroly) by mělo být přítomno 23 piků v kanálu ROX z markeru molekulové hmotnosti a dva píky v kanálu FAM ekvivalentní fragmentu 25 repetic a dalšímu fragmentu >200 repetic, jak je znázorněno na následujícím obrázku.



Obrázek 8. Kontrolní elektroferogram pozitivní kontroly (Positive Control) soupravy Adellgene® Fragile X

Pokud se kontrolná vzorky testu chovají podle očekávání, pokračujte v interpretaci výsledků podle pokynů v předchozí části tohoto dokumentu.

Výsledky jsou považovány za neplatné a měly by se opakovat, pokud:

- Fluorescenční signál je pozorován v kanálu FAM v jamkách Reaction Blank (slepé rakce)

- Očekávané signály/očekávané velikosti nejsou pozorovány v jamkách pro Positive Control (pozitivní kontrolu).
- Nesprávné chování markeru molekulové hmotnosti ROX. Tyto vzorky by měly být považovány za pochybné a musí být znovu analyzovány.

12 - Specifické operační údaje

→ Analytická specifčnost

V rámci aktivit zaměřených na stanovení analytické specifcity byla provedena interní studie se vzorky genomové DNA, jejichž počet repetice CGG byl dříve stanoven jiným systémem než Adellgene®. Počet repetice získaných pomocí soupravy Adellgene® Fragile X je v naprosté shodě s repeticemi získanými alternativní metodou, jak je uvedeno v tabulce níže:

Počet repetice CGG	Počet testovaných alel	Shoda výsledku*
Normální (CGG ₅₋₄₄)	151	Ano
Střední (CGG ₄₅₋₅₄)	9	Ano
Premutace (CGG ₅₅₋₂₀₀)	41	Ano
Plná mutace (CGG _{>200})	9	Ano

*Podle kritérií tolerance stanovených pro tuto sadu (±1 repetice pro ≤57 repetice CGG; ±3 repetice CGG mezi 58–120 repeticemi; ±5 % 121–200 repetice CGG; NA >200 repetice CGG).

Kromě toho bylo *in silico* analyzováno zarovnání různých primerů proti genomové databázi DNA. Nebyla detekována žádná nespecifická uspořádání a nebyla hlášena žádná zkřížená reaktivita s genomovou DNA.

Přítomnost variant ve vazebných místech primerů může ovlivnit získané výsledky. Syntetické plazmidy obsahující následující varianty ve vazebných místech primerů byly testovány ve třech vyhotoveních s touto sadou Adellgene® : rs1405653254, rs1327127886, rs111485627, rs1557174013 a rs371928026. Přítomnost variant nemá vliv na velikost (páry bází) alelově specifického píku v použitých plazmidech. Přítomnost variant rs1405653254 (C→G,T), rs1327127886 (C→T,A) nebo rs111485627 (G→C) je spojena s výrazným poklesem fluorescence alelově specifického píku v použitých plazmidech.

Byl také analyzován vliv některých potenciálně interferujících látek na výsledky získané pomocí této soupravy Adellgene®. Látky byly přidány do genomové DNA, která byla následně analyzována pomocí soupravy. Ztráta rozšířené alely a/nebo ztráta „stutter“/„krtavého“ signálu je pozorována v přítomnosti některých interferujících látek při koncentracích vyšších než IC50. Následující tabulka podrobně popisuje hodnoty IC50 nastavené pro tuto sadu:

Interferující substance	IC ₅₀
Hemoglobin	1,12 g/l
Imunoglobulin G	0,47 g/l
FeCl ₃	0,80 mM
Heparin	10,1 mg/l
Citrát	2,8 mM
K ₂ -EDTA	5,91 mM
Ethanol	13,97 %
Trazodon	0,25 g/l

Přítomnost potenciálně rušivých látek musí být eliminována během kroků extrakce a čištění DNA. Před vydáním diagnostických výsledků má být provedena validace metody extrakce a purifikace.

→ Analytická citlivost

Mez detekce byla stanovena jako množství mutované alely (>200 repetit CGG), které může být detekováno v pozadí wild-type alely. Za tímto účelem byly připraveny různé směsi z mutovaného vzorku a homozygotního vzorku divokého typu, s následujícím obsahem 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5% a 1% v mutované alele a při zachování množství celkové DNA na 32 ng. Alelově specifický mutovaný pik byl pozorován nad stanovenou mezní hodnotou v přítomnosti 2,5 % mutované alely, což odpovídá detekci 0,8 ng mutované alely v přítomnosti 31,2 ng divoké alely. Detekční limit, který zajišťuje robustní a reprodukovatelnou detekci mutované alely s více než 200 CGG repetit, je stanoven na 5% mutované alely v přítomnosti 95% wild-type alely.

Vzorky se známým počtem repetit byly testovány v celém rozsahu repetit. Minimální počet repetit, které je souprava schopna detekovat, je 5 repetit CGG. Linearita je stanovena mezi 5 a 200 repeticemi. Alely s více než 200 repeticemi musí být kategoricky identifikovány jako >200 CGG.

Byl proveden sériový test ředění (mezi 32 a 1 ng vstupní DNA (**)) 2 mutantních vzorků (CGG>200). Každá úroveň ředění byla testována ve trojím vyhotovení. Minimální množství DNA, které poskytuje přesné výsledky, bylo stanoveno na 4 ng.

Vzorky mutantů (CGG>200) byly analyzovány v sériovém ředění, pokrývající koncentrace mezi 512 a 32 ng (**). Adekvátní výkon byl pozorován v celém rozsahu testované DNA. Při vyšších vstupních koncentracích DNA může být pro určení párů bází piků divokého typu nutné znovu analyzovat směs v kapilárním sekvenátoru s použitím kratšího času vstříkávání. Přesnost týkající se počtu repetit nebyla ovlivněna množstvím výchozí DNA.

Pro optimální reakční výkon se doporučuje přidat do směsi 32 ng DNA (2 µl DNA při 16 ng/µl). Souprava funguje správně, bez úpravy podmínek vstříkávání, v rozmezí koncentrací mezi 20 a 100 ng.

(**) Koncentrace DNA byla měřena spektrofotometrem Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

→ Přesnost

Studie opakovatelnosti spočívá v měření variability v rámci testu analýzou vzorků s alelami pokrývajícími rozsah velikostí, které je souprava schopna detekovat (normální, premutantní a mutované alely). Každý vzorek byl analyzován duplicitně.

Souprava Adellgene® Fragile X vykazovala 100% opakovatelnost.

Studie reprodukovatelnosti umožňuje posoudit variabilitu mezi experimenty, šaržemi a přístroji. Do této studie byly zahrnuty vzorky s alelami pokrývajícími rozsah velikostí, které je souprava schopna detekovat (normální, premutantní a mutované alely). Čtyři šarže činidla byly testovány na dvou různých přístrojích v různých dnech.

Souprava Adellgene® Fragile X vykazovala 100% reprodukovatelnost.

Blížkost počtu repetit CGG vypočítaných pomocí této soupravy k těm, které byly vypočteny pomocí referenční Sangerovy metody, byla vyhodnocena ve vzorcích s maximálním počtem 101 repetit. Výsledky získané pomocí této soupravy jsou mezi šaržemi stabilní a jsou ekvivalentní výsledkům získaným Sangerovým sekvenováním.

Přesnost vypočteného počtu repetit závisí na velikosti a morfologii piků. Všechna čísla repetit byla určena pomocí nejvyššího vrcholu shluku piků. Přesnost z hlediska počtu repetit byla stanovena v neprospěch Sangerové v rozmezí od 5 do 101 repetit. Mezi 102 a 200 repetitami CGG byla přesnost porovnávána s počtem jednotlivých piků CGG ve vzoru "stutter" koktání. Při výskytu nad 200 repetit CGG by měly být alely kategoricky identifikovány jako >200. Jsou stanoveny následující tolerance:

Počet opakování CGG	Tolerance v počtu repetit CGG
≤57	± 1
58-120	± 3
121-200	± 5%
> 200	NA

Kromě toho byla přesnost soupravy vyhodnocena testováním 5 vzorků z mezinárodního standardu WHO pro Syndrom Fragilního X 1. mezinárodního genetického referenčního panelu Národního institutu pro biologické standardy a kontrolu (kód NIBSC: 08/158). Každý vzorek byl testován duplicitně ve čtyřech šaržích reagentů, pomocí dvou různých nástrojů.

ID vzorku	Kategorický genotyp	Řada NIBSC CGG	Adellgene® CGG repetice	Celkový počet testů	Celkový počet měření	% v očekávaném rozmezí
07/120	Žena, wild-type	19-24	22	8	16	100%
		28-33	31	8		
07/122	Žena, premutace	30-36	34	8	16	100%
		100-132	105 106	4 4		

			115	7		
			116	1		
07/168	Žena, plná mutace	33-41	39	8	16	100%
		300-401 (*)	>200	8		
07/170	Můž, plná mutace	353-960 (*)	>200	8	8	100%
07/174	Můž, premutace	97-127	111	8	16	100%
			119	8		

(*) Počet repetic je větší než 200 repetic CGG. Adellgene® Fragile X klasifikuje jakoukoli alelu s více než 200 CGG repeticemi jako >200 CGG repetic.

Souprava správně klasifikuje a dimenzuje mezinárodní referenční standardy pro Fragilní X od Světové zdravotnické organizace (WHO) a Národního institutu pro biologické standardy a kontrolu (NIBSC).

➔ Diagnostická specifita a senzitivita

Vzorky DNA byly analyzovány pomocí této soupravy v různých externích laboratořích. Počet repetic CGG byl stanoven jinou metodikou než Adellgene®. Byly získány následující výsledky:

Počet repetic CGG	Počet testovaných alely	Shoda výsledku*
Normální (CGG5-44)	58	Ano
Střední (CGG45-54)	5	Ano
Premutace (CGG55-200)	15	Ano
Plná mutace (CGG>200)	7	Ano
Totální	85	Ano

*Podle kritérií tolerance stanovených pro tuto sadu (± 1 repetic pro ≤ 57 repetic CGG; ± 3 repetic CGG mezi 58–120 repeticemi; ± 5 % mezi 121–200 repeticemi CGG; NA >200 repetic CGG).

Existuje 100% shoda mezi výsledky získanými pomocí soupravy Adellgene® Fragile X a genotypy získanými pomocí jiného systému pro stanovení počtu tripletových repetic CGG v genu *FMR1*.

13 - Omezení postupu

- Souprava dokáže detekovat alely s počtem repetic od 5 a kvantifikovat až do 200.
- Tato sada neumožňuje přesné určení počtu a místa přerušení AGG. Pro rozlišení těchto alel jsou doporučeny další analýzy.
- Přítomnost variant v oblastech, kde se primery hybridizují, může mít za následek nedostatečnou definici alely nebo náhlý pokles intenzity (viz bod 12). Pro rozlišení těchto alel mohou být nezbytné jiné technologie.
- Doporučení obsažená v tomto dokumentu musí být přesně dodržována. Jakákoli odchylka od těchto doporučení může vést k chybám ve výsledcích.

- Soupravu nepoužívejte, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnějšího boxu nebo jakýkoli jiný incident, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Veškerá manipulace s činidly Adellgene® musí být prováděna v souladu s obecnou správnou laboratorní praxí, která by měla být přizpůsobena místním předpisům.
- Nemíchejte komponenty z jiných sad a/nebo šarží.
- Soupravu nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti. Reagencie s prošlou dobou použitelnosti zlikvidujte v souladu s platnými místními předpisy.
- Veškeré laboratorní vybavení použité k provedení této zkoušky musí být kalibrováno a/nebo udržováno v souladu s doporučeními výrobce a musí být používáno podle jeho návodu k použití.
- Interpretace získaných výsledků musí být vždy pod dohledem kvalifikovaného personálu.
- Kit není kvantitativní, proto v přítomnosti jediného alelově specifického piku by měla být genotypizace uvedena jako pravděpodobná/nejpravděpodobnější/konzistentní s homozygotem, protože možnost nedetekování jedné z alel nemohla být vyloučena.
- Tento produkt je pomocným nástrojem pro diagnostiku pacientů s podezřením na Fragilní X. Tyto výsledky použijte společně s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených na pacientovi.

14 - Průvodce odstraňováním potíží

→ Signál je detekován v reakčním Reaction Blank (slepém vzorku)

- Chyba dávkování (pipetování).
 - Špičku pipety vyměňte pokaždé, když přidáte DNA do jamky.
 - Zkontrolujte, zda vzorek přidatý do jamky odpovídá vzorku zaznamenanému na listu.
- Kontaminace injekční lahvičky se směsí primerů Primer Mix / Master Mix / Reaction Blank.
 - Test opakujte s novými poměrnými podíly.
- Místo přípravy PCR je kontaminované.
 - Čistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a měňte spotřební materiál a činidla. Test opakujte.

→ V žádném testovaném vzorku není detekován žádný signál nebo je intenzita velmi nízká

- Injekční parametry kapilárního sekvenátoru a/nebo PCR protokolu nejsou vhodné:
 - Zkontrolujte protokoly vstřikování a amplifikace vzorku. Zkontrolujte použitou matici.
- Uvedená množství každého z činidel nebyla přidána do reakční směsi/Špatné promíchání složek reakcí:

- Opakujte reakci PCR/kapilární elektroforézy a ujistěte se, že všechny složky byly přidány a smíchány ve vhodném množství.
- Činidlo nefunguje správně.
 - Ujistěte se, že je souprava skladována při vhodné teplotě (mezi -30 °C a -18 °C) a chráněna před světlem. Vyhněte se zbytečným cyklům zmrazování/rozmrazování. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.

➔ Slabý nebo neexistující signál v jakémkoli testovaném vzorku

- Špatná kvalita použitého vzorku DNA:
 - Zkontrolujte hodnotu absorbance A260/230 a vyřadte vzorky s hodnotami nižšími než 1,2. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Nevhodná koncentrace DNA.
 - Upravte koncentraci DNA na doporučený rozsah koncentrace.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad limitem detekce.
- Nedostatečné množství PCR produktu vstříknutého do DNA analyzátoru:
 - Upravte množství produktu PCR.
 - Znovu analyzujte vzorek prodloužením doby vstřikování do kapilárního sekvenátoru.
- Nebyl přidán žádný vzorek:
 - Opakujte test přidáním vzorku.
- Přítomnost polymorfismů nebo mutací na vazebných místech primerů:
 - Kontaktujte naše oddělení technické podpory prostřednictvím e-mailové adresy customersupport@bdrdiagnostics.com.
- Přítomnost interferujících látek může vést ke ztrátě rozšířené alely a/nebo ke ztrátě vzoru "stutter" a/nebo ke ztrátě signálu divoké alely:
 - Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte test s novým vzorkem DNA a extrakcí.

➔ Vysoká intenzita fluorescence

- Chyba při pipetování:
 - Ověřte, zda je objem přidáný do každé jamky správný.
- Příliš mnoho PCR produktu:
 - Zředte produkt PCR.
 - Znovu analyzujte vzorek zkrácením doby vstřikování do kapilárního sekvenátoru.
- Nesprávné parametry v kapilárním sekvenátoru:
 - Zkontrolujte parametry vstřikování kapilárního sekvenátoru a v případě potřeby je upravte.

→ Problémy v ukazateli velikosti

- 23 vrcholů značky velikosti není správně přiřazeno:
 - Ručně opravte a přiřadte píky správné velikosti v souladu se schématem popsáním v bodě 10 této příručky.
- Ve značce velikosti je více než 23 vrcholů:
 - Některé z těchto vrcholů nepatří ke značce. Vrcholům značky přiřadte správnou velikost v souladu se schématem popsáním v bodě 10 této příručky.
- Ve značce velikosti je méně než 23 vrcholů:
 - Zvyšte dobu běhu tak, aby byly detekovány všechny vrcholy značky.
 - Opakujte sekvenování vzorku z PCR produktu. Před přípravou sekvenační směsi se ujistěte, že je formamid rozmražen/použití správného objemu velikostního markeru/je správně promíchán/ v jamce nejsou žádné bubliny.

→ Přítomnost více piků, než se očekávalo

- Použití nesprávné sady
 - Zkontrolujte, zda byla použita správná sada.
- Velikostní značka se nechová podle očekávání během kapilární elektroforézy/nesprávné alokace piků.
 - Prohlédněte si vrcholy značek velikosti.
- Kontaminovaný PCR produkt:
 - Zkontrolujte elektroferogram reakčního Reaction Blank (slepého vzorku)
- Nevhodné parametry při kapilární elektroforéze.
 - Zkontrolujte parametry a použitou spektrální matici.
- Kontaminovaná výchozí DNA:
 - Test se opakuje s novým vzorkem.
- Vzorek s mozaikou.

15 - Bibliografie

- 1) Biancalana, V., Glaeser, D., McQuaid, S. & Steinbach, P. 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* 23, 417–425 (2015).
- 2) Monaghan, K. G., Lyon, E. & Spector, E. B. ACMG standards and guidelines for fragile X testing: A revision to the disease-specific supplements to the standards and guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine* 15, 575–586 (2013).
- 3) Rosario, R. & Anderson, R. The molecular mechanisms that underlie fragile X-associated premature ovarian insufficiency: is it RNA or protein based? *Mol Hum Reprod* 26, 727–737 (2020).
- 4) Hagerman, P. J. & Hagerman, R. J. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1338, 58–70 (2015).
- 5) Lozano, R., Rosero, C. A. & Hagerman, R. J. Fragile X spectrum disorders. *Intractable Rare Dis Res* 3, 134 (2014).
- 6) Nolin, S. L. 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* 179, 1148–1156 (2019).

- 7) Kraan, C. M., Godler, D. E. & Amor, D. J. Epigenetics of fragile X syndrome and fragile X-related disorders. *Dev Med Child Neurol* 61, 121–127 (2019).
- 8) Nolin, S. L. et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genetics in Medicine* 2015 17:5 17, 358–364 (2014).
- 9) Hawkins, M. et al. Preparation and validation of the first WHO international genetic reference panel for Fragile X syndrome. *European Journal of Human Genetics* 2011 19:1 19, 10–17 (2010).
- 10) Wilson, J. A. et al. Consensus characterization of 16 FMR1 reference materials: A consortium study. *Journal of Molecular Diagnostics* 10, 2–12 (2008).
- 11) Fragile X Syndrome | Concise Medical Knowledge. <https://www.lecturio.com/concepts/fragile-x-syndrome/>.
- 12) Hunter JE, Berry-Kravis E, Hipp H, et al. FMR1 Disorders. 1998 Jun 16 [Updated 2024 May 16]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>





16 - Upozornění pro kupujícího

- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely *in vitro*.
- Pokud je tato sada používána v jakémkoli členském státě Evropské unie, pokud dojde k nějakému incidentu souvisejícímu s jejím používáním, musí to uživatel nahlásit výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo země pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země by mělo být prováděno v souladu s místními požadavky každé země.
- *Souhrn bezpečnosti a funkční způsobilosti* (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný všem uživatelům soupravy (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).
- Produkty Blackhills Diagnostic Resources S.L.U. nesmí být dále prodávány, upravovány pro další prodej nebo používány k výrobě jiných komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources S.L.U.
- Informace v tomto dokumentu mohou být změněny bez předchozího upozornění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. nepřebírá žádnou odpovědnost za jakékoli chyby, které mohou být nalezeny v tomto dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době jeho zveřejnění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. za žádných okolností nenesou odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo následné škody vyplývající z použití tohoto dokumentu.
- Zakoupením tohoto produktu získáváte kupujícímu práva podle určitých patentů společnosti Roche, které se používají pouze k poskytování diagnostických služeb. Nákupem se neuděluje žádný obecný patent ani jiná licence jakéhokoli druhu kromě tohoto konkrétního práva na užívání nákupem.
- FAM™ a ROX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- FAM™ a ROX™ mohou být chráněny jedním nebo více patenty vlastněnými společností Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto produktu zahrnuje omezená, nepřevoditelná práva.
- GeneMapper™ je registrovaná ochranná známka společnosti Applied Biosystems.
- Adellgene® je ochranná známka společnosti Blackhills Diagnostic Resources S.L.U.

17 - Řízení změn

Verze	Popis úpravy
Rev. 00	Vytvoření dokumentu
Rev. 01	Oprava části "Zásady postupu"
Rev. 02	Oprava typografických a překladových chyb. Nové sekce: "Přesnost", "Bezpečnostní informace", "Řízení změn" a "Symboly použité při označování". Informace týkající se zamýšleného uživatele a cílové populace. Nový formát dokumentu.
Rev. 03	Oprava chyb v překladu. Více informací v sekcích "Zásady postupu" a "Výsledky a interpretace". Změny doporučených parametrů genetického analyzátoru, včetně přístroje SeqStudio.
Rev. 04	Pouze pro výzkumné účely (RUO). Změna obsahu, formátu a prezentace stavebnice. Zahrnutí pozitivní kontroly (Positive Control), slepé reakce (Reaction Blank). Změna protokolu a reakčních objemů. Změna v interpretaci výsledků. Změna markeru molekulární velikosti. Změna údajů o výkonu. Změna validovaných nástrojů.
Rev. 05	Změna označení CE - podle IVDR je přidáno číslo notifikované osoby (NB). V odstavci 13 je přidáno nové omezení. Je aktualizované „Zamýšlené použití“. Oprava chyby v odstavci 17 "Řízení změn".

18 - Symboly použité při označování

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Datum spotřeby
	Katalogové číslo		Obsahuje dostatečné množství pro <n> testy
	Kód šarže		Výrobce
	Teplotní limit		Uchovávejte mimo dosah světelných zdrojů
	Positive Control		Nahlédněte do elektronického návodu k použití
	Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 o <i>in vitro</i> testech. diagnostický zdravotnický prostředek		