Adellgene®

Fragile X

NÁVOD K POUŽITÍ

Souprava pro stanovení počtu CGC tripletových repetic v genu FMR1 metodou fragmentové analýzy.

Rev. 03 - 2022/12/01

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

www.bdrdiagnostics.com

Kódy výrobku::	UDI-DI	Skladování:
AD-FMR1-25 AD-FMR1-100	8437016942468 8437016942475	od -30˚C do-18˚C

Adellgene®
Fragile X

Obsah

1.	Bezpečnostní informace	3
2.	Použití	3
3.	Souhrn a vysvětlení	3
4.	Principy testu	5
5.	Obsah soupravy	6
6.	Skladování soupravy	6
7.	Vybavení a reagencie, které nejsou součástí soupravy	7
8.	Odběr a příprava vzorku	7
9.	Pracovní postup	7
10.	Výsledky a interpretace	10
11.	Kontrola kvality	16
12.	Specifická operační data	17
13.	Omezení postupu	18
14.	Průvodce problémy	18
15.	Odkazy	19
16.	Upozornění pro zákazníka	19
17.	Kontrola změn	20
18.	Vysvětlení symbolů	21

1 – 1-1 Bezpečnostní informace

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

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

V případě pochybností ohledně popisu metody stanovení se poraďte s výrobcem. Kontaktujte telefonicky +34 976 094 603 nebo emailem na adrese customersupport@bdrdiagnostics.com.

IVD kit má omezenou životnost. Před použitím sady se ujistěte, že nevypršela doba použitelnosti. Reagencie ze soupravy po datu exspirace 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 kvantitativní stanovení CGG tripletových repetic (cytosin-guanin-guanin) v 5' oblasti genu pro mentální retardaci fragilního X („" Fragile X mentální retardace-1": FMR1); v této oblasti nedochází k translaci. Souprava je určena jako 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 analyzátorem.

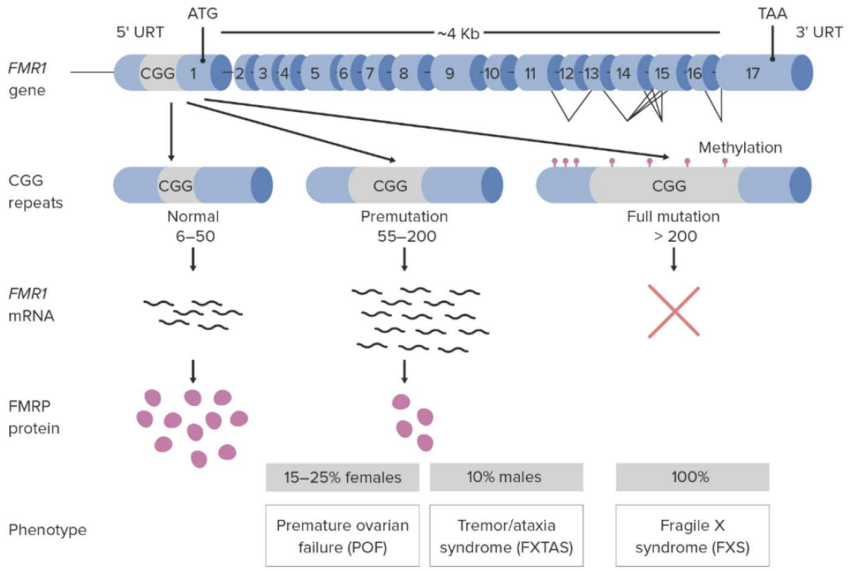
Pacienti, kteří mohou mít prospěch z tohoto určení, jsou ti, kteří jsou doporučeni specialistou. Zamýšleným uživatelem soupravy je technický personál vyškolený k provádění protokolu a interpretaci výsledků popsaných v tomto dokumentu.

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 repetic tohoto tripletu se rozlišují tři kategorie :

- Zdravé alely: až 45 nebo 55 CGG repetic bez metylace promotoru genu Nejběžnější alely obsahují 29 nebo 30 repetic [1].
- Alely střední nebo šedé zóny: 45 až 54 repetic. Alely v tomto rozmezí nejsou spojeny s FXS a lze je považovat za normální. Nebylo pozorováno, že by alely intermediárního typu během jedné generace expandovaly na plnou mutaci, ačkoli byly popsány velmi vzácné případy expanze na premutaci [1,2].
- Premutační alely: od 55 do 200 repetic CGG, obvykle bez aberantní metylace. V tomto případě jsou jedinci asymptomatičtí pro poruchy spojené s FXS, ale mohou být asociováni se dvěma klinickými poruchami: třes/ataxie spojený se syndromem X (FXTAS) a fragilní X spojený s primární ovariální insuficiencí (FXPOI), jejichž závažnost závisí na stavu metylace promotoru [3,4]. Odhaduje se, že prevalence v obecné populaci je 1 na každých 110–270 žen a 1 na každých 250–810 mužů [5]. Premutační alely jsou navíc nestabilní a mohou se zvětšit během přenosu z matky na potomstvo, což vede k úplné mutaci [6].
- Plně zmutované alely: více než 200 repetic 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 expandovanými alelami vykazují nápadný fenotyp skládající se z velkých uší a prodlouženého obličeje [1]. Závažnost kognitivní poruchy u pacientů s FXS není spojena s velikostí plné mutace, ale liší se podle stavu metylace [7].



Obrázek 1. zobrazení typů genu FMR1 a jejich tvorba v závislosti na stupni mutace.

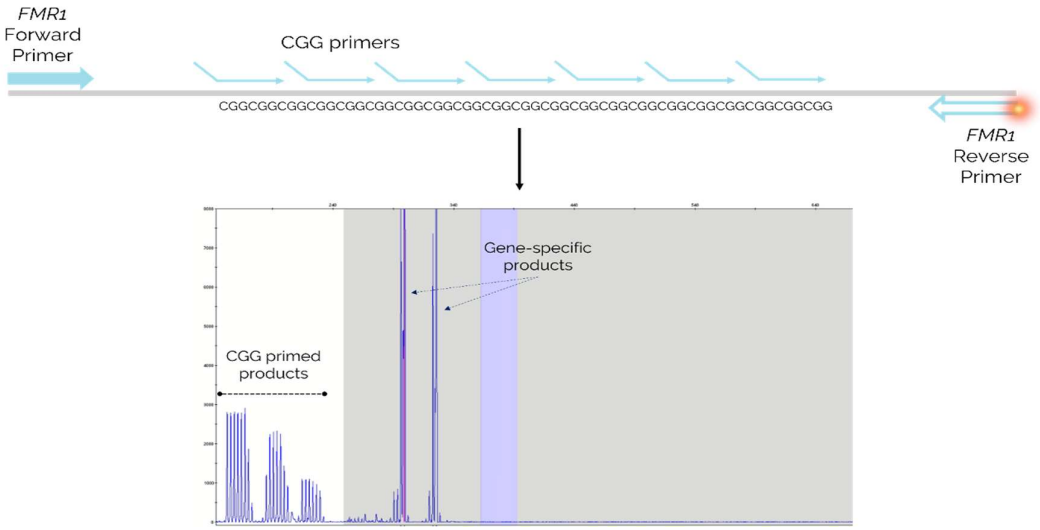
Vytaženo z[11].

Mnoho alel FMR1 obsahuje vložené sekvence AGG mezi repeticemi CGG. Předpokládá se, že tyto inzerce mohou poskytnout stabilitu DNA a snížit riziko expanze tripletových repetic v příští generaci. Pravděpodobnost expanze opakování CGG u potomků je proto vyšší, když matka nemá inzerce AGG v alele *FMR1* [6, 8]

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 TP-PCR (Triplet-Repeat-Primed PCR) z genomové DNA.

Souprava obsahuje různé primery, z nichž jeden je označen fluoroforem FAM. Produkty PCR jsou separovány kapilární elektroforézou (CE) a poté detekovány v genetickém analyzátoru. Později se velikost PCR fragmentů převede na počet CGG repetic pomocí korekčních faktorů pro mobilitu a velikost.


FMR1
Forward
Primer
CGG primers
CGGCGGCGGC

Během CE jsou fragmenty separovány podle velikosti a poté detekovány. Separační matricí pro CE je polymer s limitem rozlišení až 200 CGG. Vzhledem k tomuto vnitřnímu omezení techniky lze detekovat alely přesahující 200 opakování, ale nelze přesně určit jejich velikost, a proto jsou tyto alely identifikovány jako >200 CGG.

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 - 30 ˚C až -18 ˚C. Při této teplotě jsou stabilní do data expirace.

Nezmrazujte/nerozmrazujte lahvičky více než dvakrát, protože by to mohlo snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Pokud mají být testy prováděny pro malé počty vzorků, doporučuje se použít alikvoty činidel, aby se zabránilo většímu počtu cyklů zmrazení/rozmrazení.

Vzhledem k fotosenzitivní povaze činidla se vyhněte trvalému vystavení světlu.

7 - Vybavení a reagencie, které nejsou součástí soupravy

➔ Reagencie

- Izolační a purifikační činidla pro extrakci DNA nejsou součástí . DNA lze extrahovat pomocí jakéhokoli laboratorně ověřeného extrakčního systému, který umožňuje získat doporučené koncentrace a úrovně čistoty pro tento test (viz část Specifické pracovní údaje)
- Kontroly nejsou součástí dodávky, ale doporučuje se je použít při každém běhu. Jako pozitivní kontrola může být použit genetický referenční panel pro syndrom Fragilného X (NIBSC, 08/158)[9] , stejně jako další dobře charakterizované komerčně dostupné buněčné linie DNA[10]
- Destilovaná voda bez obsahu DNAázy
- POP-7 polymer: Kat.č: 4363785, Applied Biosystems™; nebo ekvivalent)
- Vysoce deionizovaný (Hi-Di) formamid: Kat.č.: 4311320 Applied Biosystems™ nebo ekvivalent)
- Souprava kalibrátorů pro fluorofory FAM a ROX (Kat.č 4345827, 4345829: DS-30/31 Matrix Standard Kit (Dye Set D), Applied Biosystems™; nebo ekvivalent

➔ Vybavení

- Obecné laboratorní vybavení určené pro techniky PCR

- Termocykler
- Genetický analyzátor s polymerem POP-7 ™/POP1 ™
    - 3130/3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems™
    - 3730/3730xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems™
    - 3500/3500xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems™
    - SeqStudio™ Genetic Analyzer, Applied Biosystems™
- 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
- Software pro analýzu dat: GeneMapper™ nebo ekvivalent

8 - Odběr a příprava vzorku

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 metoda je kompatibilní s různými konvenčními systémy extrakce DNA. Před dodáním výsledků za diagnostickým účelem proveďte validační 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 obecná opatření.

9 - Pracovní postup

➔ Extrakce DNA

Tato souprava je kompatibilní s jakoukoli standardní metodou extrakce DNA z plné krve konzervované EDTA nebo citrátem. Doporučuje se vyhodnotit koncentraci (OD260) a čistotu (OD260/280) přečištěné DNA. Získaná DNA by měla být až do použití skladována při -20 °C.

Doporučené množství DNA je 20 - 80 ng (µl DNA o koncentraci 10-40 ng/µl), s poměrem OD260/280 ~ 1,8.

➔ Nastavení PCR reakce

VAROVÁNÍ !

- Definujte práci v pre- a post-PCR prostoru, které musí být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Používejte pouze špičky s filtrem a autoklávované sterilní zkumavky.
- Vždy noste rukavice a laboratorní plášť.
- Nechte všechny komponenty plně roztát před začátkem testu. Se směsí polymerázy pracujte na ledu během celého postupu.

1. Rozmrazte směs primerů a GC-Rich Buffer při pokojové teplotě a promíchejte. Polymerázovou směs umístěte na led a po úplném rozmrazení pečlivě promíchejte. Krátce odstřeďte, abyste zachytili objem na dně zkumavek.

   Připravte reakční směs pro n+1 vzorků s použitím množství uvedených v následující tabulce:

Reagent	Objem na vzorek (µl)
Primer Mix	1.0
GC-Rich Buffer	12.0
Polymerase Mix	0.5
Destilovaná voda	4.5
Celkový objem	18.0

   Důkladně promíchejte a odstřeďte, aby se veškerý objem usadil na dně zkumavky.
2. Pipetujte 18 µl této směsi do destiček/zkumavek pro PCR.
3. Do každé jamky přidejte 2 µl DNA (doporučená koncentrace 10-40 ng/µl), abyste dosáhli konečného objemu 20 µl.
4. Uzavřete destičky/zkumavky pomocí vhodného těsnicího prostředku a krátce odstřeďte, aby se veškerý objem usadil na dně jamky. Pokud je to možné, ujistěte se, že v jamkách nejsou žádné bubliny.
5. Umístěte destičky/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru podle popisu v následující části.

➔ Konfigurace termocykleru

1. Nastavte odpovídající amplifikační profil

	Cycles	Temperature (°C)	Time (mm:ss)
Denaturation	1	98	05:00
Cycles	10	97	00:35
		62	00:35
		68	04:00
Cycles	20	97	00:35
		62	00:35
		68	04:00 + **00:20** each additional cycle
Final extension	1	72	10:00
Cooling	1	4	∞

2. Po skončení běhu pokračujte v přípravě vzorku pro kapilární elektroforézu nebo uložte produkt PCR při -20 °C.

➔ Příprava vzorku pro kapilární elektroforézu

VAROVÁNÍ !

CHEMICKÉ NEBEZPEČÍ. S formamidem je třeba zacházet velmi opatrně, protože kontakt s ním může způsobit podráždění a popálení očí, podráždění kůže, vyrážku a poškození reprodukčních orgánů.

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

Reagent	Objem na vzorek (µl)
Hi-Di™ Formamide	8.0
ROX 1000 Size Ladder	1.0
Celkový objem	9.0

Promíchejte roztok a stočte, aby byl výsledný roztok na dně.

3. Do každé jamky CE destičky dávkujte 9 µl roztoku.
4. Přeneste 1 µl produktu PCR na destičku a promíchejte pipetováním 2-3x.
5. Destičku uzavřete a odstřeďte, abyste odstranili bublinky.
6. Přeneste destičku do termocykléru a nastavte následující program:

	Cycles	Temperature (°C)	Time (mm:ss)
Denaturation	1	95	02:00
Cooling	1	4	∞

7. Po skončení běhu přeneste destičku na led a chraňte ji před světlem až do aplikace do genetického analyzátoru.

➔ Nastavení genetického analyzátoru

1. Při nastavení sběru dat v genetickém analyzátoru postupujte podle pokynů výrobce. Ujistěte se, že je přístroj kalibrován pro detekci barviv ROX a FAM.
2. Jako základní protokol použijte výchozí modul běhu pro analýzu dlouhých fragmentů pro konkrétní polymer a délku kapiláry přístroje.
3. Upravte podmínky nástřiku a dobu běhu podle doporučených výchozích hodnot uvedených v tabulce níže.Jsou vhodné následující moduly pro odpovídající genetické analyzátory.

Genetic Analyzer	Capillary length	Injection voltage	Injection time	Run time
3130 /3130xl	36 cm	2.5 kV	20s	2400s
3730/3730xl	50 cm	2.5 kV	20s	4000s
3500/3500xl	50 cm	2.5 kV	20s	4000s
SeqStudio™	28 cm	1.2 kV	7s	6200s

4.
5.

POZNÁMKA: Modul analyzátoru se může u různých přístrojů lišit a finalizace běhu a dávkovací podmínky by měly být uživatelem validovány.

➔ Likvidace

Odpadní produkty je třeba likvidovat v souladu s lokálními nařízeními

10 – Výsledky a interpretace

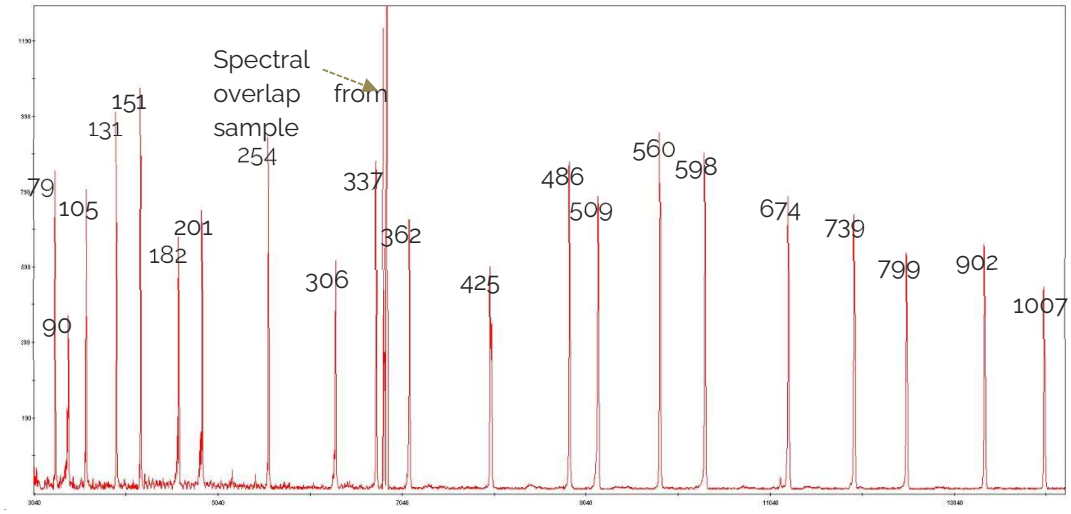
Souprava Adellgene® Fragile X je kvantitativní metoda používaná pro stanovení počtu CGG tripletových repetic v 5'UTR genu FMR1. Souprava umožňuje detekci všech typů alel (normální, střední, premutované a zmutované alely) a kvantifikaci expanze až do 200 repetic.

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 repetic, což umožňuje rozlišit mezi neexpandovanými, premutovanými a expandovanými jedinci.

➔ Interpretace elektroforegramu

Po dokončení běhu CE je třeba výsledky importovat do analytického softwaru, jako je GeneMapper™ nebo ekvivalentní software.

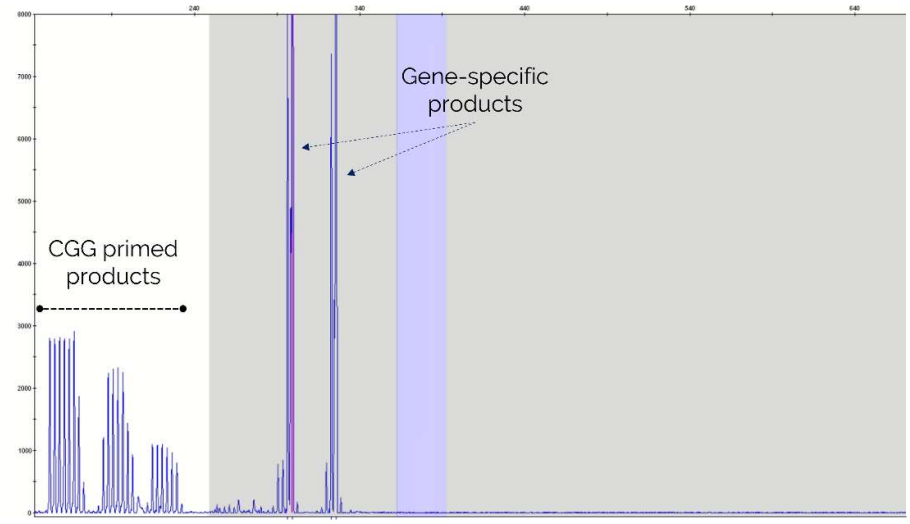
1. Importujte soubory .fsa do softwaru a analyzujte data podle metod analýzy, panelů a velikostních standardů určených pro soupravu Adellgene® Fragile X. Tyto soubory jsou k dispozici na webových stránkách https://www.bdrdiagnostics.com/ nebo je můžete získat od našeho oddělení technické podpory na adrese customersupport@bdrdiagnostics.com. Alternativně lze výsledky analyzovat také pomocí obecných standardních metod.
2. Prohlédněte si píky žebříčku ROX 1000 pro každý vzorek, včetně kontrol. Všech 21 píků by mělo být detekováno a správně označeno, jak je znázorněno na obrázku níže. Velikosti píků žebříčku ROX 1000 jsou následující: 79, 90, 105, 131, 151, 182, 201, 254, 306, 337, 362, 425, 486, 509, 560, 598, 674, 739, 799, 902, 1007 bp.



Obr 4. ROX1000 size ladder peaks/píky žebříčku velikostí

V kanálu ROX lze pozorovat spektrální překryv produktu PCR, který se objevuje mezi píky standardu velikostí. Tento pík by neměl narušovat algoritmus určování velikosti v analytickém softwaru, v opačném případě by měl uživatel zrušit výběr tohoto píku a opravit calling. Vzorky bez správně označeného žebříčku by měly být vyloučeny z další analýzy.

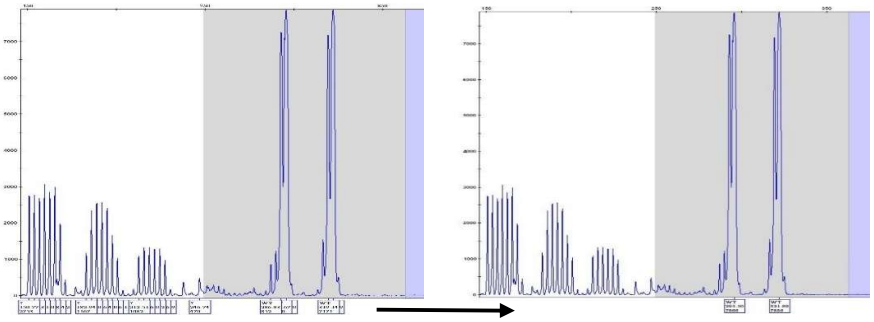
3. Zkontrolujte výsledky kontrol, pokud jsou zahrnuty. Negativní kontrola by neměla v elektrofroreogramu hlásit žádné píky v kanálu FAM a pozitivní kontroly by měly splňovat specifikace. Pokud výsledky kontrol nejsou správné, vzorky by měly být analyzovány znovu.
4. Zkontrolujte výsledky vzorků a určete velikost genově specifických fragmentů.



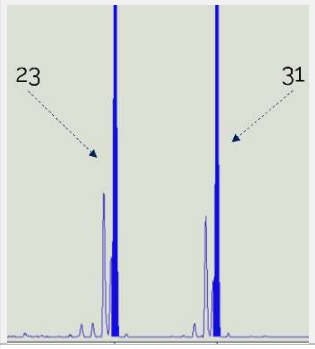
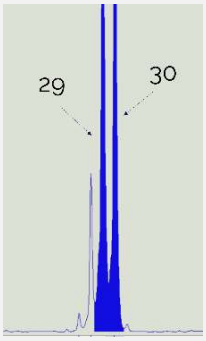
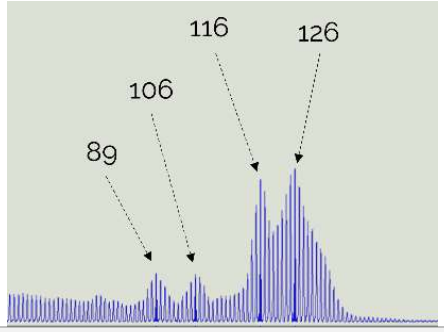
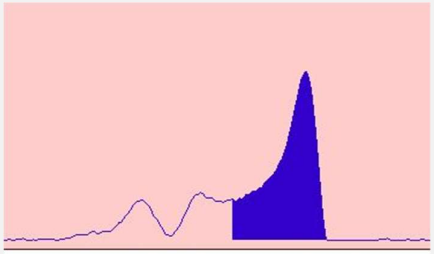
Obr 5. Elektroforegram identifikující genově-specifické produkty.

Chcete-li v elektroforegramech detekovat vrcholy produktů specifických pro daný gen, které odpovídají plné velikosti alel, zrušte výběr vrcholů CGG žebříčku, aby zůstal vybrán pouze produkt amplifikace specifický pro daný gen. Příklad viz obrázek 6. Tyto CGG píky jsou produktem opakovaného navazování primerů v oblasti repetic, čímž vzniká více amplikonů.

V tabulce 1 jsou uvedeny pokyny pro identifikaci hlavních cílových píků mezi ostatními píky produktu.



Obr 6. Elektroforegramy ukazující deselekci genově nespecifických píků.

Allele ranges	Guidelines to select main peaks	Examples
Normální a střední alely	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.	 
Premutační alely	Vyberte nejvyšší vrchol skupiny. V případě alel s několika vrcholovými skupinami vyberte nejvyšší vrchol každé skupiny.	
Zmutované alely	Vyberte skupinu vrcholů s nejvyšším vrcholem. Všechny píky v mutantním rozsahu jsou identifikovány jako >200 CGG	

➔ Výpočet počtu opakování CGG

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

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

Kde C0 je korekční faktor velikosti, m0 - korekční faktor mobility a velikost píku je vyjádřena v párech bází.

Korekční faktory lze určit postupem popsaným v oddíle "Proces standardizace". Tyto hodnoty se mohou v jednotlivých laboratořích lišit, zvažte použití pozitivních kontrol, abyste si ověřili přesnost stanovení počtu repetic při prvním použití soupravy.

Teoretické hodnoty těchto korekčních faktorů jsou následující:

c_0	230
m_0	3

POZNÁMKA: Pro zajištění přesného stanovení počtu CGG repetic se důrazně doporučuje výpočet specifických korekčních faktorů a použití pozitivní kontroly.

➔ Proces standardizace

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

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

Hodnoty C0 a m0 lze vypočítat pomocí poolované kontroly DNA. Tato kontrola by měla být směsí několika produktů PCR zahrnujících alely FMR1 se známým počtem tripletových repetic v rozsahu velikosti vrcholů (<200 opakování). Hodnoty C0 a m0 jsou stanoveny na základě lineárního přizpůsobení počtu repetic a velikosti fragmentů pro tyto alely.

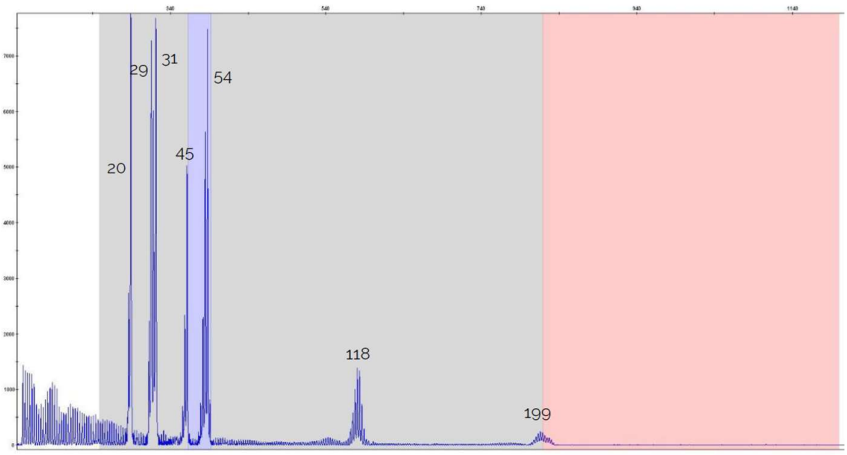
Tuto směsnou kontrolu DNA lze připravit smícháním amplikonů PCR. Viz níže uvedené komerčně dostupné reference.

Katalogové číslor	CGG repetice podle Adellgene® Fragile X kit.
NA20235	29, 45
NA20236	31, 54
NA06891	118
NA20239	20, 199

Tabulka 2 Referenční DNA templáty pro přípravu sdružené kontroly DNA.
Další informace naleznete nahttps://www.coriell.org/

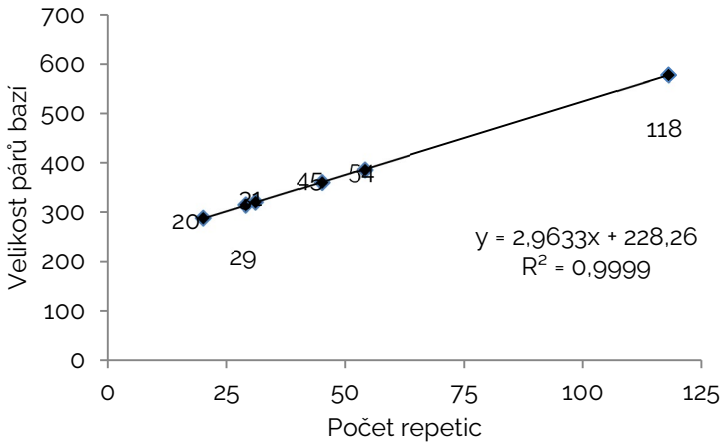
Pro výpočet hodnot korekčních faktorů, které se použijí v experimentu, postupujte následovně:

1. Analyzujte kontrolní směs DNA v běhu a vypočítejte velikost píků pro každou z alel FMR1. Doporučuje se stanovit průměrnou velikost alel v párech bází ze dvou samostatných běhů.



Obr. 7. Poolovaný DNA kontrolní elektroforegram

2. V Excelu nebo podobném programu vytvořte tabulku s velikostí fragmentů a počtem tripletových repetic každé alely a vložte rozptylový graf. Proveďte lineární regresi a získejte odpovídající rovnici lineární přímky (Graf 1).



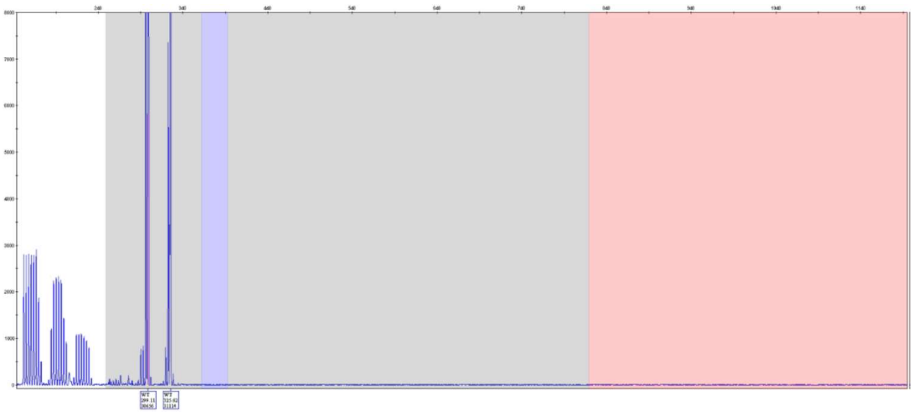
Graf 1. Poolovaný DNA kontrolní plot

Z rovnice této regresní shody se určí korekční faktory: C_0 odpovídá průsečíku lineární přímky, zatímco m_0 odpovídá sklonu přímky. V uvedeném grafu je C0 = 228,26 a m0 = 2,9633.

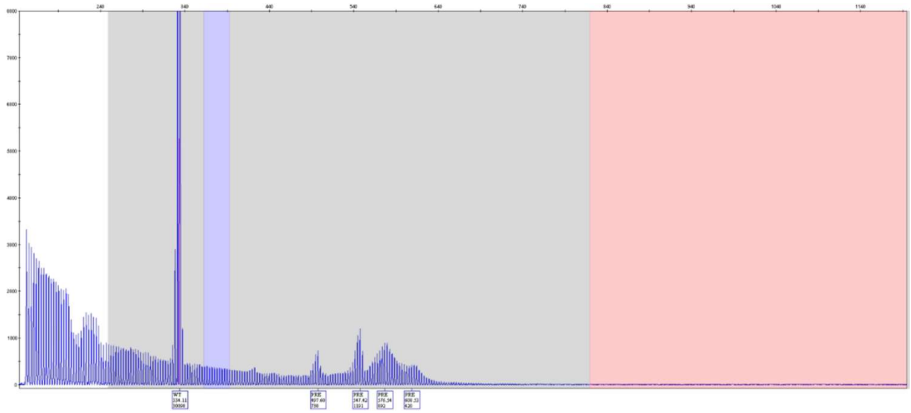
Uživatel může otestovat pravdivost korekčních faktorů pomocí pozitivních kontrol, jako je Genetický referenční panel syndromu Fragilního X (NIBSC, 08/158) a další dobře charakterizované komerčně dostupné buněčné linie DNA [10].

➔ Výsledky elektroforegramu

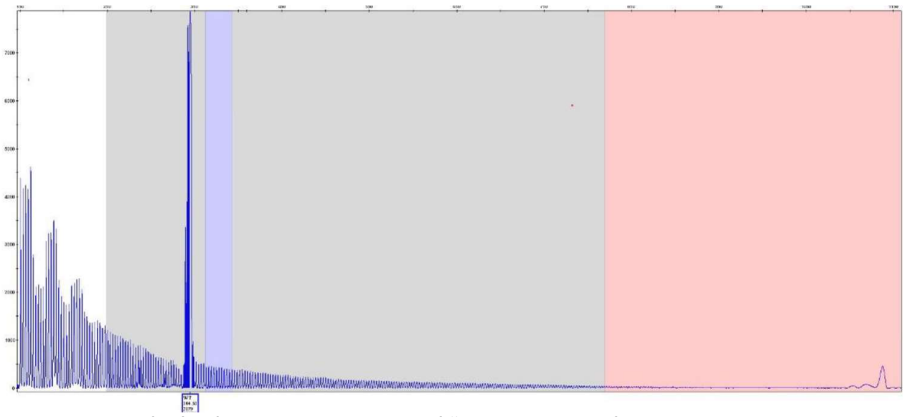
Příklady výsledků elektroforegramů získaných pomocí této soupravy jsou uvedeny na následujících obrázcích: zdravá heterozygotní žena (Obrázek 8), heterozygotní žena se zdravou alelou a další premutací nebo expandovanou alelou (Obrázky 9-10) a muž s expanzí (obrázek 11).



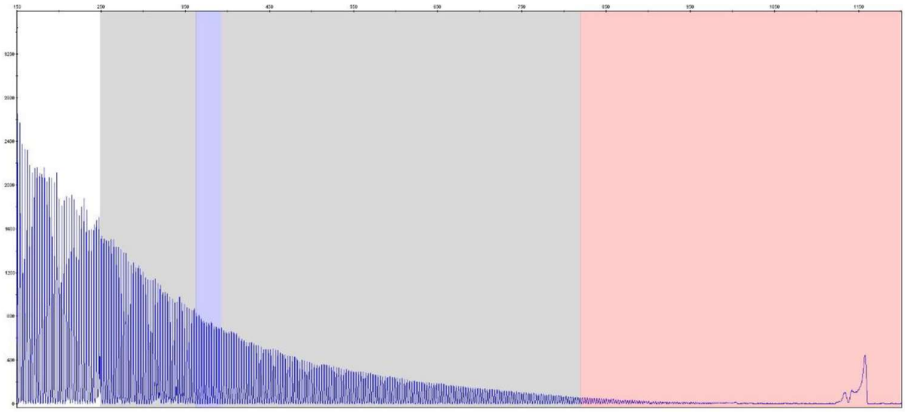
Obrázek.8 : Zdravá heterozygotní žena 22/31 CGG



Obrázek. 9: Heterozygotní žena s permutovanou alelou v mozaice *35/89, 106, 117, 128 CGG*



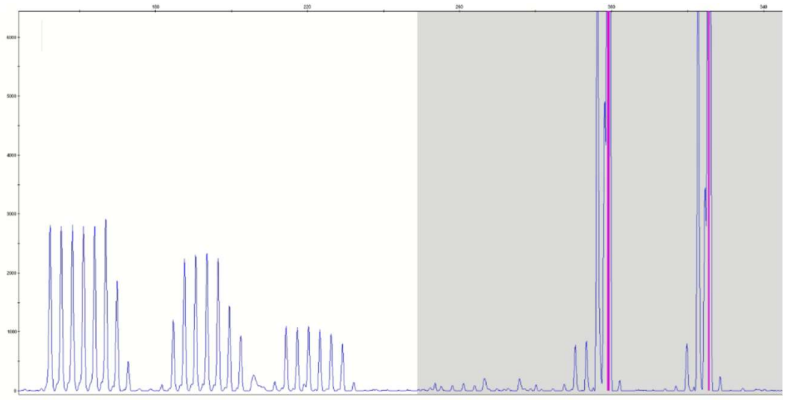
Obrázek. 10: Heterozygotní žena s expanzí *39/>200 CGG*



Obrázek 11: Muž s expanzí

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

Předpokládá se, že přerušení AGG propůjčují DNA stabilitu a snižují riziko expanze v potomstvu [8]. Obrázek 12 ukazuje vzorek zdravé ženy, který poskytuje vzor složený z CGG a AGG tripletů, jak je uvedeno.



Obrázek 12: Vzorek zdravé ženy, který ukazuje charakteristický vzor tvořený amplikony primeru CGG a 2 přerušeními AGG

Profil amplikonů primeru CGG může poskytnout informace o přerušení AGG a sekvenci alel na základě počítání píků a údolí signálu. Ačkoli někdy nemusí být možné na základě tohoto profilu sekvenčně mapovat pozice AGG, nejpravděpodobnější interpretaci lze odvodit s ohledem na nejčastější haplotypy AGG. Specifické rozlišení vzorce AGG může vyžadovat další postupy.

V případě, že se na elektroforegramu objeví saturovaný pík, zvažte nastavení nástřiku a parametrů běhu nebo nový nástřik po zředění produktů PCR (např.1:10), 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 v genetickém analyzátoru kalibrovány.

V každém běhu analýzy by měla být přidána negativní kontrola, aby se zajistilo, že test neobsahuje kontaminanty. Důrazně se také doporučuje použití pozitivní kontroly.

Aby bylo možné správně změřit velikost alel, musí být do všech jamek přidán standard velikosti alel. U všech vzorků (včetně negativní kontroly) musí být detekovány všechny píky standartu velikosti alel.

Negativní kontrola by neměla v elektroforegramu vykazovat žádné píky v kanálu FAM a pozitivní kontroly by měly splňovat specifikace. Pokud výsledky kontrol nejsou správné, vzorky by měly být znovu analyzovány.

12 – Specifická operační data

➔ Analytická specificita

Primery této soupravy jsou specifické pro lidský gen pro Fragilní Mentální 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 expanzíi), 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 specifiita

Adellgene® Fragile X je specifický test pro detekci počtu CCG repetic 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 CGG).

Mutace (bodové mutace, inzerce, 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 specifičnost byla hodnocena v jedné externí a jedné interní studii, přičemž bylo analyzováno celkem 34 vzorků s následujícími výsledky:

Typ vzorku	Počet analyzovaných vzorků
2 normalní alely (do 45 nebor 55 CGG repetic)	7
1 premutační alela (45 nebo 55-200 CGG repetic)	18
1 expandovaná alela (>200 CGG repetic)	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 repetic CGG až do 200. To umožňuje klasifikovat alely přítomné ve vzorku jedince jako zdravé (do 45 nebo 55 CCG), premutované (45 nebo 55 až 200 CGG) nebo expandované (>200 CGG).

➔ 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 repetic byla stanovena porovnáním velikostí získaných technikou Sangerova sekvenování s touto soupravou. Byla tak stanovena přijatelná variabilita 1 repetice pro zdravé alely a 3 pro premutované alely.

13 - Omezení postupu

- Tato sada dokáže kvantifikovat všechny alely až do 200 repetic CGG.
- Mutace a polymorfismy 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 neodpovídají, 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 reagencie likvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Termocykler a genetický analyzátor 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
  - Opakujte experiment s novými alikvoty Primer mixu, Polymerase mixu/ vody
- Kontaminace pre-PCR prostoru
  - Čistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a vyměňujte spotřební materiál a reagencie. Opakujte analýzu.
- Chyby pipetování
  - Při každém přidání DNA do jamky vyměňte špičku pipety. Zkontrolujte, zda vzorek přidaný do jamky odpovídá tomu, co je napsáno v pracovním listu.

➔ Nesprávná velikost nebo počet bandů

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

- Ověřte modul analyzátoru

➔ Slabý signál elektroforegramu

- Nesprávné nastavení genetického analyzátoru
  - Zkontrolujte modul běhu a použitou kalibrační matici. Upravte parametry vstřikování a chodu.
- Nízká kvalita nebo nízká koncentrace vstupní DNA / produktu PCR
  - Upravte koncentraci DNA na doporučené hodnoty pro tento test.
  - Nepoužívejte plnou krev, která obsahuje heparin. V případě potřeby opakujte extrakci DNA a PCR.
  - Upravte množství produktu PCR
- Degradace soupravy
  - Zkontrolujte, zda byla souprava skladována v souladu s pokyny výrobce.
  - Nezmrazujte/nerozmrazujte reagencie více než dvakrát.
  - V případě potřeby připravte alikvoty činidel.
  - Opakujte analýzu s čerstvou dávkou činidel. Slabý produkt PCR

➔ Vysoká intenzita fluorescence

- Příliš mnoho PCR produktu
  - Zřeďte PCR produkt.
- Nesprávné nastavení genetického analyzátoru
  - Zkontrolujte modul běhu a použitou kalibrační matici. Upravte parametry vstřikování a chodu.

➔ Vysoké pozadí (zahlcená základní linie)

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

15 - Odkazy

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/.

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.ento 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
- FAM ™ a ROX ™ 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. 00	První verze dokumentu
Rev. 01	Oprava chyb v odstavci “Postup”.
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..
Rev. 03	Oprava chyb v psaní a překladu. Doplnění dalších informací v oddílech "Zásady postupu" a "Výsledky a interpretace". Změny v doporučených parametrech genetického analyzátoru, přidání přístroje SeqStudio™.

18 - Vysvětlení symbolů použitých na štítku

IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředekice		Datum expirace
REF	Katalogové číslo		Obsah stačí pro <n> testů
LOT	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní omezení		Chraňte před sluncem
	Prostudujte si elektronický návod k použití		
CE	Tento výrobek splňuje požadavky Evropské Direktivy 98/79/EC pro in vitro diagnostické zdravotnické prostředky		