

Devyser CFTR Core

Kat. č.: 8-A031

Pro *in vitro* diagnostiku

Návod k použití



OBSAH	2
1. SEZNÁMENÍ SE SYSTÉMEM DEVYSER CORE	4
Použití	4
Obsah soupravy	4
Postup	4
Background	4
Princip metody	4
2. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ	5
3. SYMBOLY POUŽITÉ NA NÁLEPKÁCH	6
4. POTŘEBNÝ MATERIÁL	7
4.1 Součástí kitu	7
Konfigurace	7
Složky	7
4.2 Požadované položky, které nejsou v soupravě	7
Příprava reagensí	7
Extrakce DNA	7
Amplifikace	7
Detekce	7
Size Standard	8
4.3 Dye Set Calibration	8
5. SKLADOVÁNÍ A POŽADAVKY NA POUŽITÍ	9
6. POŽADAVKY NA VZOREK	10
Klinické vzorky	10
DNA extrakce a měření	10
Extrakce DNA z plné krve	10
Extrakce DNA ze suché kapky	10
Extrakce DNA z amniové tekutiny a choriových klků	11
Postup a skladování	11
Kontroly	11
7. INSTRUKCE PRO POUŽITÍ	12
7.1 Postup Devyser CFTR Core	12
7.2 Příprava vzorků a amplifikace PCR	12
Příprava vzorků	12
Přidání vzorku	12
Amplifikace	13
7.3 Detekce	13
Příprava vzorků	13
Příprava vzorku pro kapilární elektroforézu	14
Příprava přístroje	14
Run Modules	14
8. ANALÝZA DAT	16
8.1 Doporučení správné laboratorní praxe	16
8.2 Analýza dat	16
8.3 Kit Devyser CFTR Core	16
Normální alely	16
Mutantní alely	16
8.4 Vyhodnocení	16
Cut off signály píků (RFU)	16
Sizing DNA fragmentů	17

Polythymidine (poly-T) identifikace	17
Cross-mix ID markery	17
Identifikace cross-mix vzorků	17
Zdravé (nemutované) alely	17
Heterozygótní mutace	17
Homozygótní mutace	18
Alel specifické výjimky	18
Normální (zdravý) F508	18
F508del mutace	18
2183AA>G	20
R347H	20
R117C/R117H složený heterozygot	20
R347P/R347H složený heterozygot	20
2183AA>G/2184insA složený heterozygot	20
2184insA & 2183AA>G	21
F508del/I507de složený heterozygot	21
G551D/R553X složený heterozygot	21
I336K homozygótní mutant	21
F508del homozygótní mutant	21
L1065P homozygótní mutant	21
CFTRdele2,3 (21 kb)	22
Nepřímá detekce krátkých inzercí a delecí (indels)	22
Mutace v místě nasedání primeru a polymorfismy	22
Troubleshooting	27
Artefakty PCR	27
Elektroforetické artefakty	28
Copy number varianty	28
9. VÝKONOSTNÍ CHARAKTERISTIKY	30
Sensitivita	30
Specifita	30
Reproducibilita	30
Klinické hodnocení	30
Cross Reactivita	31
10. LIMITACE POSTUPU	32
11. UPOZORNĚNÍ KUPUJÍCÍMU	33
12. REFERENCE	34
13. KONTAKTNÍ INFORMACE	35
14. HISTORIE REVIZÍ	36

1. SEZNÁMENÍ SE SYSTÉMEM DEVYSER CORE

Update servis k návodu k použití (IFU update service)

Přihlaste se k IFU update service a budete emailem upozorněni na novou verzi návodu k použití.

Pro přihlášení navštivte www.devyser.com/ifu-subscription

Použití

Kit Devyser CFTR Core je určen pro *in vitro* kvalitativní genotypizaci zdravých a mutantních alel v genu pro transmembránový regulátor cystické fibrózy (CFTR) v lidské genomové DNA.

Tento produkt není určen pro samostatnou diagnostiku cystické fibrózy.

Obsah soupravy

Kit Devyser CFTR Core obsahuje reagentie připravené k použití pro PCR amplifikaci genetických markerů.

Postup

DNA extrakce:

Kit Devyser CFTR Core byl validován s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, kat. č. 51104) pro extrakci DNA z lidské krve, suchých kapek a amniové tekutiny; QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, kat. č. 51304) pro extrakci DNA z biopsií choriových klků.

Amplifikace:

Kit Devyser CFTR Core byl validován s použitím Life Technologies/ABI GeneAmp® System 9700.

Detekce:

Genetické analyzátoři Applied Biosystems (ABI 310, 3100, 3130, 3500, 3730) podporující detekci Dye Set DEV-5.

Background

Cystická Fibróza je dědičné onemocnění postihující děti a mladé dospělé. Od objevu genu CFTR v roce 1989 (1.), bylo popsáno více než 1900 mutací a variant v genu CFTR (2.). Mutace v CFTR genu může způsobit respirační onemocnění. Další CFTR poruchy způsobené nefunkčností transmembránového regulátoru CF zahrnují kongenitální bilaterální absenci vas (CBAVD), akutní recidivující nebo chronickou pankreatitidu a šířící-se bronchiektázie (3, 4.).

Princip metody

Kit Devyser CFTR Core je založen na multiplexní alelicky specifické PCR amplifikaci a detekci zdravých, nemutovaných, a mutovaných alel v CFTR genu. Alelicky specifická PCR amplifikace generuje fluorescenčně značené fragmenty, které jsou analyzovány kapilární elektroforézou na Genetickém analyzátoru. Amplifikované fragmenty jsou identifikovány podle délky a fluorescenční barvy.

2. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A.

Devyser CFTR Core byl validován při použití celkového amplifikačního o objemu 12,5 µL. Změna reakčního objemu může vést k nesprávným výsledkům.

B.

Předejděte mikrobiální kontaminaci při vyjímání alikvotů z reakčních zkumavek. Doporučujeme používat špičky s filtry.

C.

Nemíchejte reagenty z různých šarží ani z různých zkumavek stejné šarže.

D.

Nepoužívejte soupravu s prošlou záruční lhůtou.

E.

Nepoužívejte otevřené nebo poškozené reagenční zkumavky.

F.

Práce v laboratoři má postupovat jedním směrem. Začíná přípravou reagentů, postupující do prostoru pro extrakci DNA, do prostoru pro amplifikaci DNA a nakonec do prostoru pro detekci. Přípravu reagentů a extrakci DNA provádějte v oddělených prostorech. Přístroje i spotřební materiál mají být lokalizovány pouze v příslušném prostoru a nesmí se přenášet mezi těmito oddělenými prostory. V příslušném prostoru používejte rukavice a při jeho opouštění je vyměňte za nové. Přístroje ani spotřební materiál pro přípravu reagentů nepoužívejte pro extrakci DNA. Přístroje a spotřební materiál pro amplifikaci a detekci nepřenášejte mimo tyto prostory.

G.

Nakládání s reagenty a vzorky, jejich použití, skladování a likvidace musí splňovat požadavky ČSN pro nakládání s biohazardním materiálem.

H.

Při práci se vzorky a reagenty soupravy používejte nepudrované rukavice, laboratorní plášť a ochranu očí. Po skončení práce se vzorky a reagenty si řádně omyjte ruce.

3. SYMBOLY POUŽITÉ NA NÁLEPKÁCH

LOT

Šarže



Exspirace



Počet testů



Skladujte při teplotě nižší nebo rovné

REF

Katalogové číslo



Výrobce

IVD

In vitro diagnostický medicínský prostředek

4. POTŘEBNÝ MATERIÁL

4.1 Součástí kitu

Konfigurace

Kit Devyser CFTR Core obsahuje reagentie pro analýzu 48 vzorků.

Složky

Tabulka 1. Komponenty, které jsou součástí kitu Devyser CFTR Core.

Barva víčka	Barva Zkumavky	Štítek	Katal.č.	Obsah soupravy
Oranžová	Čirá	PCR Activator	4-A018	2
Žlutá	Hnědá	Core 1	4-A166	1
Bílá	Hnědá	Core 2	4-A167	1

4.2 Požadované položky, které nejsou v soupravě

Příprava reagentů

- Plast pro termocyklér
- Použijte pipetu a špičky s filtrem nebo dávkovací pipetu s vyměnitelnými špičkami
- Nepudrované chirurgické rukavice

Extrakce DNA

- Reagentie a přístroje dle požadavků výrobce extrakční soupravy
- Pipeta nebo dispenzor a špičky s filtry
- Nepudrované chirurgické rukavice

Amplifikace

- Thermal Cycler: Life Technologies/ABI GeneAmp® PCR System 9700. Při použití jiného PCR cycleru musí být dodržen ramp: ohřev 1,6 °C/s, chlazení 1,6 °C/s.
- Pipeta nebo dispenzor a špičky s filtry
- Nepudrované chirurgické rukavice

Detekce

- Life Technologies/ABI Genetic Analyzer (ABI 310, 3100, 3130, 3500, 3730)
- Performance optimized polymers: POP-4™ a POP-7™
- Hi-Di™ Formamide, čistota pro genetickou analýzu
- 1x Genetic Analyzer Buffer
- Pipeta nebo dispenzor a špičky s filtry
- Nepudrované chirurgické rukavice

Size Standard

560 SIZER ORANGE (Devyser kat. číslo.: 8-A402) nebo GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard (Life Technologies kat. číslo 4366589).

4.3 Dye Set Calibration

ABI 3100, 3130, 3730:

Použijte DEV-5 Dye Set MultiCap kit (Devyser kat. číslo: 8-A401) s nastavením "Any5Dye" Dye Set.

ABI 3500:

Použijte DEV-5 Dye Set MultiCap kit (Devyser kat. číslo: 8-A401) pro vytvoření dye setu DEV-5.

ABI 310 Matrix file generation:

Použijte DEV-5 Dye Set SingleCap kit (Devyser kat. číslo: 8-A400). Zvolte soubor modulu "GS STR POP4 (1 mL) G5.md5".

Detailní instrukce pro Dye set kalibraci je možno stáhnout z Download sekce na webu:

<http://devyser.com/downloads#dev-5-singlecap> a

<http://devyser.com/downloads#dev-5-multicap>

5. SKLADOVÁNÍ A POŽADAVKY NA POUŽITÍ

A.

Skladujte všechny komponenty při maximální teplotě -18°C.

B.

Reakční Master Mixy (připravené přidáním Core 1 a Core 2 do zkumavek s PCR aktivátorem) mohou být uchovávány při +2 až +8°C 7 dní a pod -18°C 90 dnů. Vyvarujte se opakovanému rozmrazování a zmrazování.

C.

Likvidace zbytků reagensů musí být v souladu s legislativou ČR.

D.

Nemíchejte reagensie z různých šarží.

6. POŽADAVKY NA VZOREK

Klinické vzorky

Kit Devyser CFTR Core je určen pro použití s lidskou genomovou DNA izolovanou z plné krve, amniové tekutiny, choriových klků a suchých kapek.

DNA extrakce a měření

Kit Devyser CFTR Core byl validován s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, kat. č. 51104) pro extrakci DNA z lidské krve, suchých kapek a amniové tekutiny (AF); QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, kat. č. 51304) pro extrakci DNA z biopsií choriových klků (CV).

Pokud použijete jinou extrační metodu pro izolaci DNA je nutná validace s kitem Devyser CFTR Core před použitím výsledků k diagnostickým účelům. Konzistentní výsledky jsou dosaženy při dodržení doporučených podmínek PCR a podmínek analýzy (viz sekce 7.2 - 7.3) a s koncentrací DNA mezi 2,5 a 25 ng/PCR reakci (1 - 10 ng genomové DNA/ μ L vzorek). Pro optimální výsledky je vhodné upravit koncentraci purifikované DNA na 5 ng/ μ L v 0,1xTE pufru nebo vodě (PCR grade kvality).

Koncentrace a čistota DNA je důležitá pro úspěšné testování kitem Devyser CFTR Core. DNA nesmí být kontaminována proteiny, solemi a dalšími PCR inhibitory (např. Zbytkovým ethanolem z extrakce DNA). Nedostatečná kvalita DNA může způsobit neúspěšnou amplifikaci nebo zvýšit signál nežádoucího pozadí během detekce. Přesné a reprodukovatelné měření koncentrace DNA je důležitá, protože přidáním příliš mnoho DNA do PCR reakce může způsobit falešně pozitivní výsledky a příliš malé množství DNA v PCR reakci může naopak způsobit selhání PCR amplifikace a detekce. Kvalitní DNA je důležitá pro přesné a reprodukovatelné stanovení koncentrace DNA ve vzorku.

Vzhledem k odchylkám mezi technikami kvantifikace DNA je důležité, aby si uživatel ověřil, že jím používaná technika kvantifikace DNA dává důvěryhodné výsledky, které korelují se skutečnými výsledky získanými při použití kitu Devyser CFTR Core. Uživatel si musí být vědom změn a omezení různých metod kvantifikace DNA.

Všechny koncentrace uvedené v tomto manuálu byly stanoveny pomocí Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, cat.# Q32851/Q32854). Koncentrace DNA stanovená Qubit® dsDNA HS Assay Kit může být odlišná od koncentrace DNA změřené jinými metodami.

Extrakce DNA z plné krve

Kit byl testován s DNA izolovanou z plné lidské krve pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat.# 51104). Použijte protokol se vstupním objemem 200 μ L čerstvé plné krve a elucí pomocí 200 μ L elučního pufru. Změřte koncentraci purifikované DNA a zřeďte vzorek na 5 ng/ μ L.

Extrakce DNA ze suché kapky

Konzistentní výsledky lze dosáhnout s DNA extrahované ze suché kapky pomocí protokolu pro suché kapky uvedeném v manuálu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat.# 51104). Použijte protokol pro suché kapky se vstupním materiálem 2 terčiky ≥ 3 mm v průměru a elucí pomocí 25 - 50 μ L elučního pufru.

Extrakce DNA z amniové tekutiny a choriových klků

Konzistentní výsledky lze dosáhnout s DNA extrahované z amniové tekutiny pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat.# 51104). Použijte protocol se vstupním objemem 1 ml amniové tekutiny. Centrifugujte celý objem a peletu použijte jako vstupní material pro extrakci DNA. Eluujte do 25-100 µL elučního pufru podle toho, jak velká je vstupní peleta. Změřte koncentraci purifikované DNA.

Konzistentní výsledky lze dosáhnout s DNA extrahované z choriových klků pomocí QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, cat.# 51304). Změřte koncentraci purifikované DNA a zřeďte vzorek na 5 ng/µL.

Postup a skladování

Dle pokynů výrobce.

Kontroly

CFTR zdravá DNA kontrola (Aleický ladder)

Doporučujeme použít zdravou DNA kontrolu (nemutovanou DNA) pro každý run jako aleický ladder pro mix Core 1.

Negativní kontrola

Doporučujeme použít negativní kontrolu (bez DNA) v každém runu. Pokud detekujete píky v mixu Core 1 a Core 2, tak to indikuje kros kontaminaci PCR produktem.

Mutovaná pozitivní kontrola

Vzorky se známou CFTR mutací mohou být použity jako pozitivní kontrola.

7. INSTRUKCE PRO POUŽITÍ

7.1 Postup Devyser CFTR Core

Každý kit Devyser CFTR Core obsahuje reagentie pro 48 vzorků. Reakční master mixy připravte ještě před přípravou vzorků, pokud provedete celou metodu v jediném dni. Pouze pokud extrahujete vzorky DNA den předem, připravte master mixy až den poté.

Devyser CFTR Core byl validován při použití celkového amplifikačního o objemu 12,5 μL . Změna reakčního objemu může vést k nesprávným výsledkům.

Reakční Master Mix se připravuje přidáním směsi Core 1 a Core 2 do zkumavek s PCR Aktivátorem. Ujistěte se, že jsou oba Core 1 and Core 2 před použitím kompletně rozmrazeny.

1. Stočte krátce každou zkumavku. V tomto kroku zkumavky nevortexujte.
2. Přidejte 500 μL příslušného Core 1 a Core 2 do zkumavek s PCR Aktivátorem.
3. Opatrně promíchejte reakční master mix několikerým nasátím pipetou od spodu zkumavky.
4. Vortexujte aktivované reakční mixy a lehce stočte. Smíchaný reakční master mix je stabilní při $+2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 7 dní a při méně než $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 90 dní. Vyvarujte se opakovanému rozmrazování a zmrazování.
5. Napipetujte 10 μL smíchaného master mixu do PCR zkumavek.
6. Uzavřete zkumavky a krátce je stočte.
7. Pokračujte krokem 7.2.

7.2 Příprava vzorků a amplifikace PCR

Příprava vzorků

Pokud použijete jinou extrační metodu pro izolaci DNA je nutná validace s kitem Devyser CFTR Core před použitím výsledků k diagnostickým účelům. Konzistentní výsledky jsou dosaženy při dodržení doporučených podmínek PCR a podmínek analýzy (viz tabulka 2 - 5) a s koncentrací DNA mezi 2,5 and 25 ng/PCR reakci (1,5 - 10 ng genomové DNA/ μL vzorek).

Pro optimální výsledky je vhodné upravit koncentraci purifikované DNA na 5 ng/ μL v 0,1xTE pufru nebo vodě (PCR grade kvality).

Vzorky obsahující koncentraci DNA pod 1 ng/ μL může mohou být analyzovány zvýšením počtu PCR cyklů z 29 na 31 cyklů. Neanalyzujte vzorky s koncentrací DNA nad 3 ng/ μL s použitím 31 počtu PCR cyklů, protože to může způsobit falešně pozitivní signály.

Přidání vzorku

V prostoru odděleném od prostor pro přípravu reagentů a amplifikaci a detekci. Každý klinický vzorek musí být otestován mixem Core 2 za účelem detekce mutací, na které je tento kit zacílen. Pro zjištění jestli je detekovaná mutace heterozygótní nebo homozygótní je nutné dotestovat vzorek i mixem Core 1.

1. Přidejte 2,5 μL vzorku (1 - 10 ng genomové DNA/ μL vzorku) do každé PCR zkumavky se smíchaným reakčním master mixem Core 1 a Core 2 (z kroku 7.1).
2. Zkumavky uzavřete a krátce stočte.

Amplifikace

Kit Devyser CFTR Core byl validován s použitím Life Technologies/ABI GeneAmp® System 9700. Jiné PCR cyclery musí být otestovány a zhodnoceny, že mohou být použity pro diagnostiku kitem Devyser Core. PCR cyclery by měly být pravidelně kalibrovány a udržovány tak, aby byly přesné.

Pro Life Technologies GeneAmp® PCR System 9700, nastavte “ramp speed” na “MAX”.

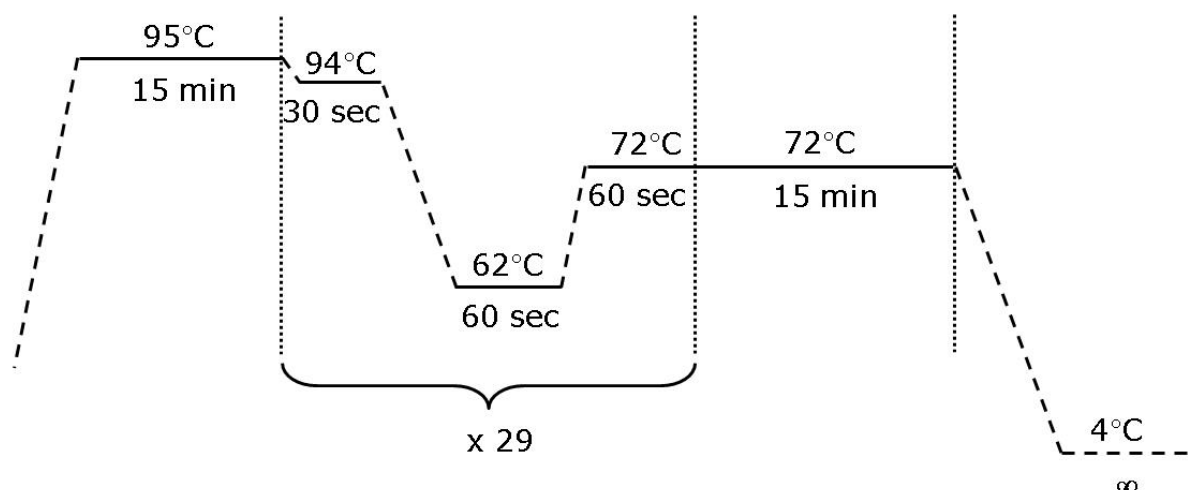
Pro Life Technologies Veriti® Thermal cycler nastavte “ramp speed” na “9700 mode”.

Pro použití jiných PCR termocyklerů použijte tento ramping:
Ohřev 1,6 °C/s, chlazení 1,6 °C/s.

Amplifikační prostor:

Naprogramujte termocykler pro amplifikaci dle následujícího teplotního profilu (přečtěte si manuál pro podrobné informace o programování termocykleru):

95°C 15 min
94°C 30 sec - 62°C 60 sec - 72°C 60 - sec for 29 cycles
72°C 15 min
4°C FOREVER



1. Nastavte reakční objem 13 μ L.
2. Nastavte ramping na (ohřev 1,6 °C/s, chlazení 1,6 °C/s).
3. Spust'te amplifikaci (doba trvání cca 2,5 h).
4. Po amplifikaci vyjměte zkumavky s amplifikační reakcí z termocykleru, vložte je do stojánku. Krátce stočte. Opatrně sejměte víčka, abyste zabránili kontaminaci aerosolem. Amplifikovaný materiál nepřenášejte do před-amplifikačních prostor. Amplifikovaný materiál musí zůstat v amplifikačním a detekčním prostoru.

7.3 Detekce

Příprava vzorků

Řiďte se manuály pro příslušný analyzátor ABI ohledně údržby a nastavení přístroje. Před spuštěním analýzy soupravou Devyser CFTR Core, přístroj musí být kalibrován na Dye Set DEV-5.

Detaily v sekci 4.3.

Příprava vzorku pro kapilární elektroforézu

1. Připravte nanášecí směs smícháním 2 µL velikostního standardu (560 SIZER ORANGE) s 100 µL Hi-Di™ Formamidu (směs stačí pro 6 jamek/zkumavek).
2. Vortexujte 15 s.
3. Do jamek mikrotitrační destičky (nebo do jednotlivých zkumavek v případě ABI310) napipetujte po 15 µl nanášecí směsi před vložením do analyzátoru.
4. Přidejte 1,5 µL PCR amplifikátu vzorku do příslušné jamky nebo zkumavky s ELFO nanášecí směsí.
5. Uzavřete destičku nebo zkumavky.
6. Krátce centrifugujte destičku nebo zkumavky a ujistěte se, že v roztoku nejsou žádné bublinky.
7. Vložte destičku nebo zkumavky do ABI Genetického analyzátoru.

Příprava přístroje

Připravte si pracovní protokol s využitím software analyzátoru s následujícím nastavením:

- Sample ID
- Dye Set: Any5Dye/DEV-5
- Doporučený Run Module: Viz tabulky 2-5 pro různé polymery a přístroje

Run Modules

Množství PCR produktu nasátého do kapiláry může být upraveno změnou injekčního napětí a injekční doby.

Tabulka 2. Nastavení Run modulu pro ABI310 (module file “GS STR POP4 (1 mL G5.md5”).

Run Parameters	POP-4
Capillary length	47 cm
Run temperature	60 °C
Injection voltage	10 kV
Injection time	5 s
Run voltage	15 kV
Run time	30 min

Tabulka 3. Nastavení Run modulu pro ABI 3100/3130.

Run Parameters	POP-4/POP-7
Capillary length	36 cm
Run temperature	60 °C
Injection voltage	1,5 kV
Injection time	20 s
Run voltage	15 kV
Run time	1500 s

Tabulka 4. Nastavení Run modulu pro ABI 3500.

Run Parameters	POP-7
Capillary length	50 cm
Run temperature	60 °C
Injection voltage	1,6 kV
Injection time	15 s
Run voltage	19,5 kV
Run time	1500 s

Tabulka 5. Nastavení Run modulu pro ABI 3730.

Run Parameters	POP-7
Capillary length	36 cm
Run temperature	60 °C
Injection voltage	1,6 kV
Injection time	15 s
Run voltage	15 kV
Run time	1500 s

8. ANALÝZA DAT

8.1 Doporučení správné laboratorní praxe

Doporučení správné laboratorní praxe pro molekulární diagnostiku cystické fibrózy a CFTR příbuzné poruchy byly stanoveny, viz odkazy 5-7 v kapitole 12.

8.2 Analýza dat

Každý jedinec má dvě kopie (alely) CFTR genu a je považován za homozygota pro danou sekvenci DNA, pokud mají obě alely stejnou sekvenci. Jedinec je považován za heterozygota pro danou sekvenci DNA, pokud se dvě alely liší v dané sekvenci.

8.3 Kit Devyser CFTR Core

Kit Devyser CFTR Core se používá pro kvalitativní analýzu mutací v CFTR genu. Analýza se provádí dvěma oddělenými Italia v2 mixy (Core 1 a Core 2). Mix Core 1 detekuje nemutované, zdravé alely. Odpovídající mutantní alely jsou detekovány mixem Core 2. Všechny nalezené nemutované a mutované alely jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7. Mix Core 2 umožňuje také stanovení poly-T oblast v intronu 9 (IVS8) v genu CFTR (tabulka 2 a obrázek 1). V případě, že detekujeme alelu 5T, je možné detekovat i počet repetitivních TG (tabulka 8 a obrázek 1).

Pro zjištění jestli je detekovaná mutace heterozygótní nebo homozygótní je nutné testovat vzorek oběma mixy. Nepřímá detekce krátkých inzercí a delecí (indely) vyžaduje analýzu výsledků mixem Core 1.

Mix Core 1 a Core 2 zahrnují i analýzu dvou polymorfních STR markerů (ID marker), které umožňují identifikaci obou mixů u analyzovaného vzorku. ID markery amplifikují STR marker na chromozomech 13 a 18 s využitím stejných primerů u obou mixů Core 1 i Core 2.

Normální alely

PCR fragmenty zdravých DNA sekvencí detekujeme jako modré a zelené píky v elektroferogramu mixu Core 1 (tabulka 6).

Mutantní alely

PCR fragmenty mutantních DNA sekvencí detekujeme jako modré a zelené píky v elektroferogramu mixu Core 2 (tabulka 7).

8.4 Vyhodnocení

Cut off signály píků (RFU)

Doporučujeme, aby byl určen cutoff range pro každý přístroj. Nepoužívejte nižší cutoff hodnotu než 200 rfu (ABI 310, 3100 a 3130) a 500 rfu (ABI 3730, 3500). Neanalyzujte vzorky, které mají píky na horní hranici detekce.

Dále doporučujeme analyzovat jen takové vzorky, které mají signál ID markerů v mezích nad cutoff hodnotou a pod horní hranicí detekce.

Pokud jsou signály ID markerů příliš nízké, tak může být DNA vzorku v PCR reakci příliš nízká. Pokud jsou signály ID markerů příliš vysoké, tak může být množství DNA vzorku v PCR reakci příliš

vysoké. Nepřítomnost ID markerů ve vzorku ukazuje na selhání analýzy. Pokud mají ID markery velmi nízké nebo velmi vysoké RFU, měl by být vzorek analyzován s opatrností.

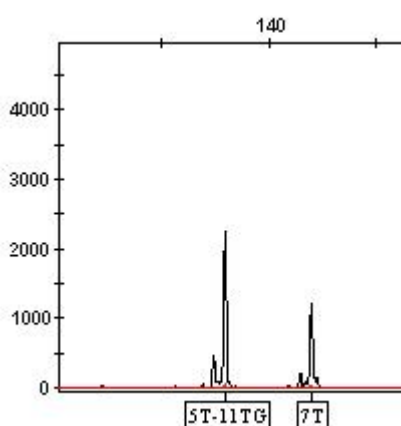
Sizing DNA fragmentů

PCR fragmenty získané analýzou kitem Devyser CFTR Core analyzujte společně s ladderem 560 SIZER ORANGE a softwarem pro fragmentační analýzu (např. GeneMapper).

Polythymidine (poly-T) identifikace

PCR fragmenty polymorfismů 5T, 7T a 9T v intronu 9 (IVS8) a exonu 10 detekujeme jako černé píky elektroferogramu mixu Core 2. Počet TG repetic v poly-T oblasti detekujeme ve fragmentu 5T (viz tabulka 8 a obrázek 1).

Obrázek 1. Sizing poly-T oblasti umožňuje stanovení poly-T a TG repetic.



Cross-mix ID markery

PCR fragmenty reprezentující cross-mix sekvenční ID markerů detekujeme jako červené píky v elektroferogramu v obou mixech Core 1 a Core 2.

Identifikace cross-mix vzorků

Délka cross-mix ID markerů detekovaných v mixech Core 1 a Core 2 u jednoho vzorku musí být srovnatelné. Každý vzorek musí mít identický profil ID markerů v mixech Core 1 a Core 2. Rozdílné ID markery v obou mixech u jednoho vzorku ukazují na pomíchání mixů z dvou různých vzorků. Nepřítomnost ID markerů ve vzorku ukazuje na selhání analýzy.

Zdravé (nemutované) alely

Vzorek je vyhodnocen jako zdravý (nemutovaný) pro danou alelu, pokud je pík této alely detekován v mixu Core 1 a stejný pík příslušné alely není detekován v mixu Core 2.

Heterozygótní mutace

Vzorek je vyhodnocen jako heterozygótní pro danou alelu, pokud jsou přítomny píky dané alely v obou mixech Core 1 i Core 2.

Homozygótní mutace

Vzorek je vyhodnocen jako homozygótně mutovaný pro danou alelu, pokud je pík této alely detekován v mixu Core 2 a stejný pík příslušné alely není detekován v mixu Core 1.

Alel specifické výjimky

Normální (zdravý) F508

Homozygótní zdravý F508 (obrázek 2A)

1. Normální (zdravé) fragmenty alely F508 a alely 1677 jsou detekovány ve standardní délce v mixu Core 1 (obrázek 2A).
2. Fragment mutované alely F508del není detekován v mixu Core 2.

F508del mutace

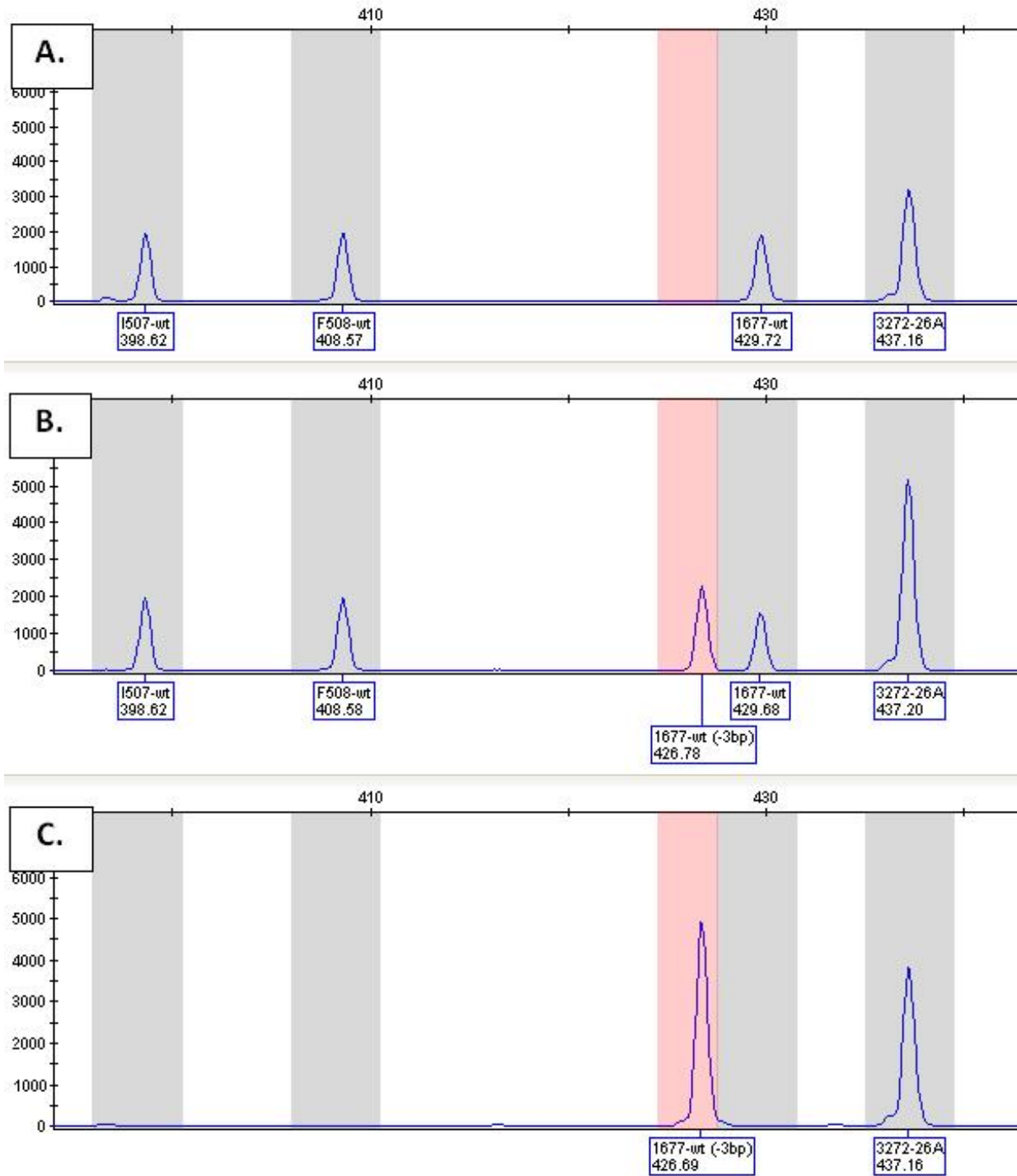
Heterozygótní F508del mutace, F508del/normální (zdravá), (obrázek 2B a 3)

1. Oba normální (zdravé) fragmenty alely F508 a I507 jsou detekovány v mixu Core 1 (obrázek 2B).
2. Normální (zdravý) fragment 1677 je detekován v příslušné délce v mixu Core 1 (obrázek 2B)
3. Druhý fragment alely 1677 je detekován v mixu Core 1, ale fragment je kratší o 3 bp než standardní fragment alely 1677 (fragment alely 1677 je kratší o 3 bp než standardní fragment kvůli delecí 3 bp v pozici 508, která je detekována jako stejný PCR fragment, obrázek 2B).
4. Fragment alely F508del je detekován v mixu Core 2 (obrázek 3).

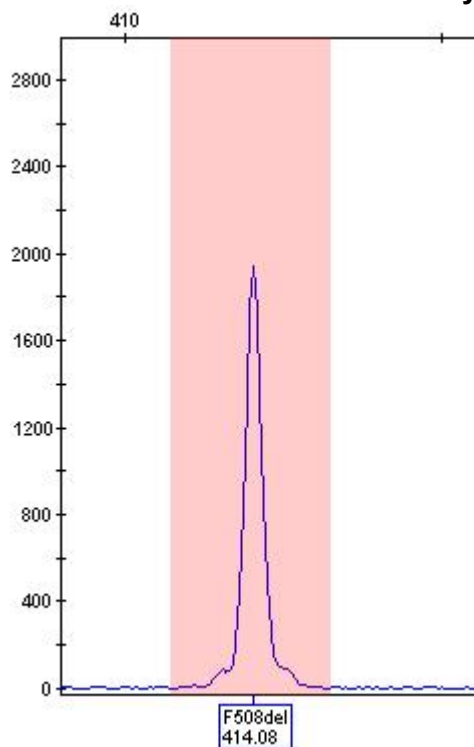
Homozygótní F508del mutace, F508del/F508del (obrázek 2C).

1. Normální (zdravý) fragment alely F508 není detekován v mixu Core 1 (obrázek 2C).
2. Normální (zdravý) fragment alely I507 není detekován v mixu Core 1 (obrázek 2C).
3. Fragment alely 1677 je detekován v mixu Core 1, ale fragment je kratší o 3 bp než standardní fragment alely 1677 (fragment alely 1677 je kratší o 3 bp než standardní fragment kvůli delecí 3 bp v pozici 508, která je detekována jako stejný PCR fragment, obrázek 2C).
4. Normální fragment alely 1677 ve standardní délce není detekován v mixu Core 1 (obrázek 2C).
5. Fragment alely F508del je detekován v mixu Core 2 (obrázek 3).

Obrázek 2. Detekce normální (zdravé) alely F508 v mixu CFTR Core 1.



Obrázek 3. Detekce mutovaná alely F508del v mixu Devyser CFTR Core 2.



2183AA>G

Pokud u vzorku detekujeme mutaci 2183AA>G v mixu Core 2, následující podmínky musí být splněny:

Mutovaná alela 2183AA>G je detekována jako dva odlišné fragmenty cca 18bp od sebe v mixu Core 2 (viz tabulka 2 detaily délky fragmentů).

R347H

Pokud u vzorku detekujeme mutaci R347H v mixu Core 2, následující podmínky musí být splněny:

Mutovaná alela R347H je detekována jako dva odlišné fragmenty v mixu Core 2. Druhý výrazně slabší fragment má stejnou délku jako mutovaná alela R347P.

R117C/R117H složený heterozygot

Normální alela na pozici R117 je detekována jedním oligonukleotidem v mixu Core 1. V případě složeného heterozygotu s genotypem R117C/R117H fragment normální alely chybí v mixu Core 1.

R347P/R347H složený heterozygot

Normální alela na pozici R347 je detekována jedním oligonukleotidem v mixu Core 1. V případě složeného heterozygotu s genotypem R347P/R347H fragment normální alely chybí v mixu Core 1.

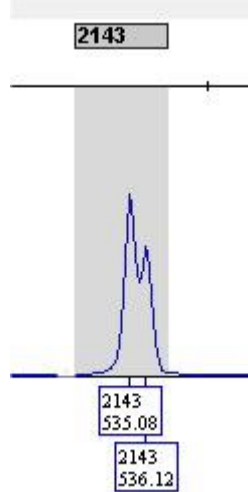
2183AA>G/2184insA složený heterozygot

Normální alela na pozici 2183_2184 je detekována jedním oligonukleotidem v mixu Core 1. V případě složeného heterozygotu s genotypem 2183AA>G/2184insA fragment normální alely chybí v mixu Core 1.

2184insA & 2183AA>G

Pokud je vzorek heterozygótní pro mutaci 2184insA nebo 2183AA>G lze nalézt dvojitý pík v pozici 2143 v mixu Core 1. (obrázek 4).

Obrázek 4. Dvojitý pík v markeru 2143, v Core 1



F508del/I507de složený heterozygot

V případě složeného heterozygota s genotypem F508del/I507del budou chybět příslušné fragmenty normálních alel u markerů F508 a I507.

G551D/R553X složený heterozygot

V případě složeného heterozygote s genotypem G551D/R553X fragment normální alely chybí v mixu Core 1.

I336K homozygótní mutant

Pokud u vzorku detekujeme homozygótní mutaci I336K, obě normální alely I336 a T338 budou chybět v mixu Core 1.

F508del homozygótní mutant

Pokud u vzorku detekujeme homozygótní mutaci F508 delece, obě normální alely F508 a I507 budou chybět v mixu Core 1.

L1065P homozygótní mutant

U vzorku heterozygótních pro mutaci L1065P, nebude přítomen pík normálních alel L1065 a R1066 v mixu Core 1.

CFTRdele2,3 (21 kb)

Fragmenty alely G85 / G85E se nacházejí v exonu 3 a detekce se projeví ve vzorcích nesoucích CFTRdele2,3 (21 kb). Například normální alelový fragment G85 nebude přítomen v případě homozygotního CFTRdele2,3 (21kb).

Nepřímá detekce krátkých inzercí a delecí (indels)

Mutace způsobené krátkými inzercemi a delecemi (indels) mezi dvěma protilehlými primery budou mít za následek změny velikosti u všech fragmentů produkovaných těmito primery. Indel mutace mohou být tedy nepřímo detekovány v Core 1, přestože jsou přímo detekovány v Core 2. Dva příklady nepřímých mutací detekovaných v mixu Core 1 jsou uvedeny v obrázku 5 (3659delC) a obrázku 6 (394delTT). Přesnou identitu detekovaných indels není možno určit pomocí kytu Devyser CFTR Core. Doporučujeme, aby indels byly sekvenovány, aby bylo možno zjistit jejich přesnou identitu. Úplný seznam indel mutací nepřímo zjištěných v Core 1 lze stáhnout v download sekci na adrese:

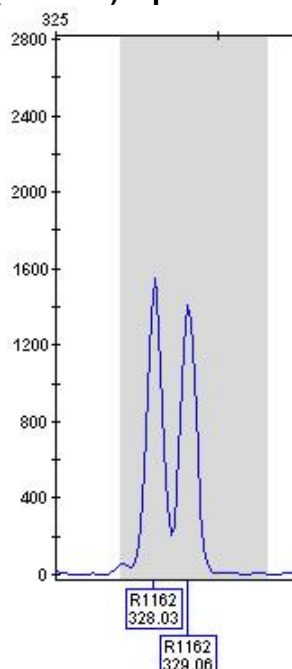
<http://devyser.com/downloads#devyser-cftr-core>.

Mutace v místě nasedání primeru a polymorfismy

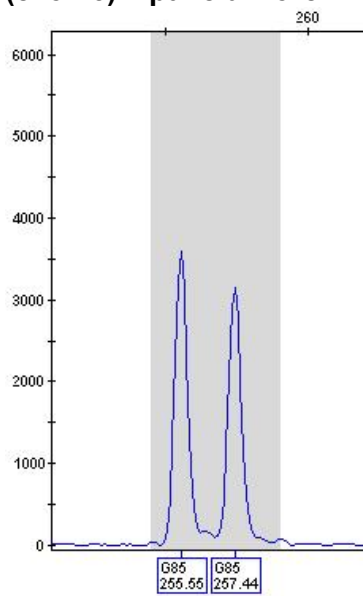
Mutace v místě nasedání primerů a polymorfismy mohou ovlivnit funkci jednotlivých PCR primerů použitých v kytu Devyser CFTR Core. Úplný seznam mutací a polymorfismů, které nebyly konkrétně testovány kitem Devyser CFTR Core lze stáhnout v sekci download na adrese:

<http://www.devyser.com/downloads#devyser-cftr-core>

Obrázek 5. Falešná delece 3659delC způsobená posunem 1 bp size u R31162 amplikonu (exon 22) v panelu Core 1.



Obrázek 6. Falešná delece 394delTT způsobené posunem 2 bp size u G85 ampliconu (exon 3) v panelu Core 1.



Normální (zdravé) alely detekované v mixu Core 1.

Tabulka 6. Normální (zdravé) alely detekované v mixu Core 1.

Normální alely jsou uvedeny dle očekávané délky PCR fragmentů. Umístění CFTR genů uvedené v tabulce 6 je stejné jako uvádí databáze mutací cystické fibrózy². Použité názvy alel jsou odvozeny od původních názvů mutací a cDNA uvedených v tabulce 7.

Číslo alely	Normální alela (Core 1)	Umístění v CFTR genu ²	cDNA	Barva píku	Délka fragmentu (bp)
1	3120+1G	Intron 18	c.2988+1G	Zelená	115
2	711+1G	Intron 5	c.579+1G	Modrá	159
3	CFTRdele2,3_wt	Intron 1 - Exon 3	c.273+10250_10251TT	Modrá	168
4	621+1G	Intron 4	c.489+1G	Zelená	181
5	1717-1G	Intron 11	c.1585-1G	Zelená	208
6	3849+10kbC	Intron 22	c.3717+12191C	Modrá	222
7	2789+5G	Intron 16	c.2657+5G	Modrá	235
8	1898+1G	Intron 13	c.1766+1G	Zelená	239
9	G542	Exon 12	c.1624G	Zelená	248
10	G85	Exon 3	c.254G	Modrá	256
11	Y1092	Exon 20	c.3276C	Modrá	272
12	G551	Exon 12	c.1652G	Zelená	275
13	R553	Exon 12	c.1657C	Zelená	287
14	3659	Exon 22	c.3528C	Modrá	293
15	N1303	Exon 24	c.3909C	Modrá	298
16	R560	Exon 12	c.1679G	Zelená	308
17	R117	Exon 4	c.349C and c.350G	Zelená	320
18	R1162	Exon 22	c.3484C	Modrá	328
19	L1077	Exon 20	c.3230T	Modrá	333
20	R1066	Exon 20	c.3196C	Modrá	351
21	L1065	Exon 20	c.3194T	Modrá	359
22	W1282	Exon 23	c.3846G	Modrá	367
23	R347	Exon 8	c.1040G	Zelená	372
24	T338	Exon 8	c.1013C	Zelená	396
25	I507	Exon 11	c.1519_1521ATC	Modrá	398
26	F508	Exon 11	c.1521_1523CTT	Modrá	408
27	I336	Exon 8	c.1007T	Zelená	416
28	1677	Exon 11	c.1545_1546TA	Modrá	429
29	R334	Exon 8	c.1000C	Zelená	433
30	3272-26A	Intron 19	c.3140-26A	Modrá	436
31	1078	Exon 8	c.948T	Zelená	461
32	2183_2184AA	Exon 14	c.2051_2052AA	Modrá	499
33	2143	Exon 14	c.2012T	Modrá	535
ID1	ID marker 1	Chr. 13	-	Červená	227-320
ID2	ID marker 2	Chr. 18	-	Červená	322-413

Obsáhlý seznam mutací INDEL, které budou mít vliv na velikost fragmentů detekovaných v mixu Core 1, je možné stáhnout v sekci ke stažení na adrese:
<http://www.devysser.com/downloads#devyser-cftr-core>

Velikost fragmentů alel se může při elektroforéze lišit v závislosti na přístroji, typu použitého polymeru, na typu použitého size markeru.

Žluté píky jsou obvykle zobrazovány jako černé píky v softwaru pro fragmentační analýzu (např. GeneMapper).

Délky fragmentů alel uvedených v této tabulce jsou založeny na pozorovaných délkách fragmentů získaných pomocí ABI 3500, POP-7 polymeru a 560 SIZER ORANGE.

Mutované alely detekované v mixu Core 2

Tabulka 7. Mutované alely detekované v mixu Core 2.

Mutantní alely jsou uvedeny dle očekávané délky PCR fragmentů. Starší názvy mutací a názvy cDNA uvedené v tabulce 7 jsou uvedeny v seznamu mutací CFTR⁸, pokud nejsou uvedeny žádné další odkazy.

Mutantní alela (Core 2), Název ⁸	Příslušná normální alela v mixu Core 1	cDNA ⁸	Barva píku	Délka fragmentu (bp)
3120+1G>A	1	c.2988+1G>A	Zelená	115
711+1G>T	2	c.579+1G>T	Modrá	164
621+1G>T	4	c.489+1G>T	Zelená	181
1717-1G>A	5	c.1585-1G>A	Zelená	206
CFTRdele2,3(21kb)	3	c.54-5940_ 273+10250del21kb	Modrá	212
3849+10kbC>T	6	c.3718-2477C>T c.3717+12191C>T ²	Modrá	223
2789+5G>A	7	c.2657+5G>A	Modrá	236
1898+1G>A	8	c.1766+1G>A	Zelená	238
G542X	9	c.1624G>T	Zelená	248
G85E	10	c.254G>A	Modrá	257
Y1092X(C>A)	11	c.3276C>A	Modrá	269
G551D	12	c.1652G>A	Zelená	275
R553X	13	c.1657C>T	Zelená	286
3659delC	14	c.3528delC	Modrá	292
N1303K	15	c.3909C>G	Modrá	298
R560T	16	c.1679G>C	Zelená	306
R117H	17	c.350G>A	Zelená	318
R1162X	18	c.3484C>T	Modrá	326
L1077P	19	c.3230T>C	Modrá	335
R117C	17	c.349C>T	Zelená	342
R1066C	20	c.3196C>T	Modrá	353
L1065P	21	c.3194T>C	Modrá	360
W1282X	22	c.3846G>A	Modrá	368

R347H	23	c.1040G>A	Zelená	364
R347P	23	c.1040G>C	Zelená	373
I507del	25	c.1519_1521delATC	Modrá	398
T338I	24	c.1013C>T	Zelená	399
F508del	26	c.1521_1523delCTT	Modrá	414
I336K	27	c.1007T>A	Zelená	416
1677delTA	28	c.1545_1546delTA	Modrá	427
R334W	29	c.1000C>T	Zelená	430
3272-26A>G	30	c.3140-26A>G	Modrá	434
1078delT	31	c.948delT	Zelená	458
2183AA>G	32	c.2051_2052delAAinsG	Modrá	496, 514
2184insA	32	c.2052_2053insA	Modrá	516
2143delT	33	c.2012delT	Modrá	534
5T (9-13TG)	-	c.[1210-12[5];1210-34TG[9-13]]	Žlutá	124-136
7T	-	c.1210-12[7]	Žlutá	140-157
9T	-	c.1210-12[9]	Žlutá	167-182
ID marker 1	ID1	Chromosome 13	Červená	227-320
ID marker 2	ID2	Chromosome 18	Červená	322-413

Velikost fragmentů alel se může při elektroforéze lišit v závislosti na přístroji, typu použitého polymeru, na typu použitého size markeru.

Žluté píky jsou obvykle zobrazovány jako černé píky v softwaru pro fragmentační analýzu (např. GeneMapper).

Délky fragmentů alel uvedených v této tabulce jsou založeny na pozorovaných délkách fragmentů získaných pomocí ABI 3500, POP-7 polymeru a 560 SIZER ORANGE.

Tabulka 8. 5T_TG alely detekovány v mixu Core 2.

5T_TG repetice	Očekávané délky fragmentů (bp)	Barva píku
5T_9TG	126	Žlutá
5T_10TG	128	Žlutá
5T_11TG	130	Žlutá
5T_12TG	132	Žlutá
5T_13TG	134	Žlutá

Velikost fragmentů alel se může při elektroforéze lišit v závislosti na přístroji, typu použitého polymeru, na typu použitého size markeru.

Žluté píky jsou obvykle zobrazovány jako černé píky v softwaru pro fragmentační analýzu (např. GeneMapper).

Délky fragmentů alel uvedených v této tabulce jsou založeny na pozorovaných délkách fragmentů získaných pomocí ABI 3500, POP-7 polymeru a 560 SIZER ORANGE.

Troubleshooting

Pokud je elektroferogram nízké kvality, data není možné vyhodnotit. PCR produkt můžeme opakovaně nanést do analyzátoru a analyzovat znovu.

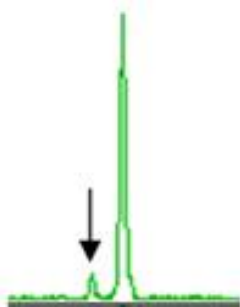
Výskyt neprůkazných výsledků, je možný z mnoha důvodů:

- » Překryv barevného signálu mezi kanály
- » Elektroforetické spiky
- » Kontaminace DNA: druhý genotyp, PCR amplikony
- » Koncentrace DNA je příliš vysoká, nebo příliš nízká.
- » DNA použitá v PCR je degradovaná.

Artefakty PCR

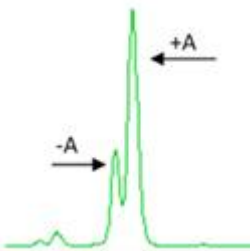
Stutter píky (obr. 7) jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jednu nebo několik repetit menší, než aktuální STR alela. Typický stutter pík má obsah menší, než 15% vůči příslušnému STR píku.

Obrázek 7. Stutter pík je označen šipkou.



-A píky (obr. 8) jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jeden pár bazí kratší, než PCR produkt s plnou délkou (+A píky).

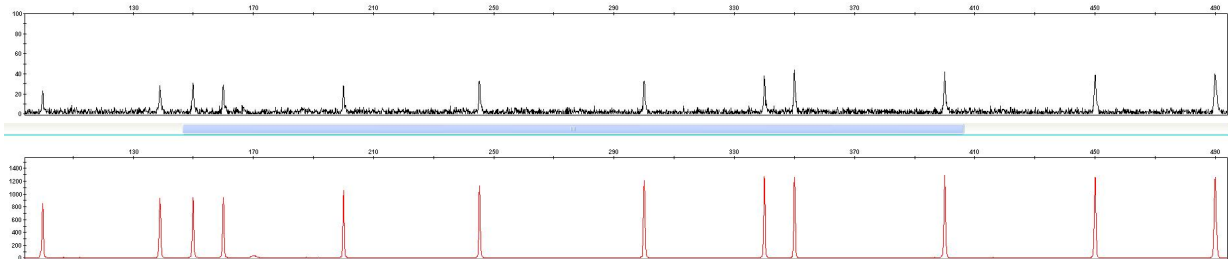
Obrázek 8. -A a +A píky jsou vyznačeny šipkami.



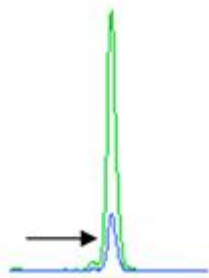
Elektroforetické artefakty

Průsvity mezi všemi použitými barevnými kanály, které je možné detekovat (obrázek 9.1 a 9.2). Crosstalk se jeví jako stejně vysoké vrcholy v sousedních barevných kanálech a měla by být vyloučena z analýzy.

Obrázek 9.1 Průsvit z červeného do žlutého kanálu (barevné kanály jsou ukázány odděleně).

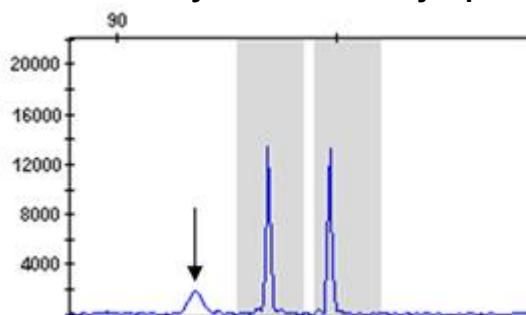


Obrázek 9.2 Průsvit ze zeleného do modrého kanálu označený šipkou (překryté barevné kanály).



Dye blobs se mohou objevit v rozsahu analýzy (Obr. 10). Obecně platí, že barva dye blobs se objeví jako široký pík bez definovaného vrcholu jedné barvy a vyskytují se v datech relativně brzy na začátku.

Obrázek 10. Dye blob označený šipkou.

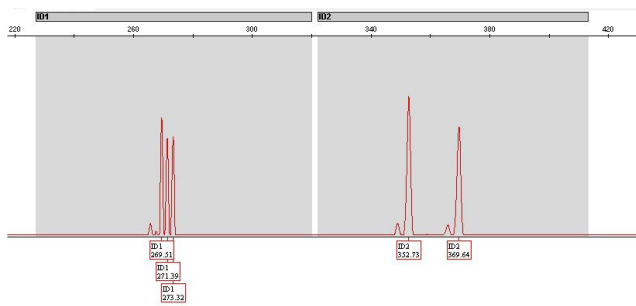


Copy number varianty

Identifikační ID markery použité v Devyser CFTR Core jsou vysoce polymorfní markery, které mohou zobrazit copy number variace (CNVs). CNVs detekované Devyser CFTR Core 1 by měly být

použity pouze pro identifikaci vzorku, a nikoli jako diagnostické markery pro detekci aneuploidie. Obrázek 11 zobrazuje ne-patologickou detekci CNV v ID1.

Obrázek 11. Ne-patologická CNV detovaná v ID1



9. VÝKONOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Sensitivita

Definice:

Podíl (%) jedinců s dobře definovaným genetickým onemocněním a jejichž testované kladné hodnoty v rámci definované rozhodovací meze.

Design experimentu:

Sto šest (106) vzorků DNA dříve charakterizovaných jako nosiči jedné mutace CFTR byly testovány slepým testem pomocí kitu Devyser CFTR Core. Všechny výsledky získané kitem Devyser CFTR Core souhlasily s výsledky získanými předchozím testováním.

Výsledek:

> 99 % sensitivita.

Specifická

Definice:

Podíl (%) jedinců, kteří nemají dobře definované genetické onemocnění a jejichž výsledky testu jsou negativní nebo ve vymezené rozhodovací mezi.

Design experimentu:

Sto osm (108) vzorků DNA asymptomatických dárců krve byly testovány pomocí kitu Devyser CFTR Core. U 102 dárců krve nebyla detekována žádná mutace v CFTR genu. Zbývajících šest vzorků bylo heterozygotními nosiči mutací v genu CFTR. Všichni heterozygotní nosiči byli potvrzeni Sangerovým sekvenováním.

Výsledek:

> 99 % specifita.

Reproducibilita

Definice:

Stupeň (%) shody mezi měřeními provedenými na stejných vzorcích za rozdílných měnicích se podmínek.

Design experimentu:

Normální mužský vzorek byl amplifikován 100 krát při třech různých příležitostech za použití různých šarží, pracovníků, PCR- a kapilárních elektroforézních přístrojů. Všechny 100 analýz daly očekávané výsledky.

Výsledek:

> 99 % reproducibilita.

Klinické hodnocení

Dva tisíce tři sta osmdesát čtyři novorozeneckých vzorků DNA (2384), z nichž každý byl extrahován z jedné suché kapky (3 mm), byly testovány slepým testem pomocí kitu Devyser CFTR Core. 2208 vzorků bylo úspěšně analyzováno, ale 176 vzorků (7%) se nepodařilo splnit kritéria analýzy pro interpretaci výsledků. Z 2208 vzorků, které měly interpretovatelné výsledky, 2159 bylo zdravých, 33 bylo heterozygotních pro F508del, 4 byly heterozygotní pro N1303K, 3 byly heterozygotní pro

G542X, 2 byly heterozygótní pro R334W, 2 byly heterozygótní pro R347P a 2 byly heterozygótní pro 2789+5G>A. Následující heterozygótní vzorky měli jednu z následujících mutací: W1282X, 621+1G>T, R117C, T338I, R347H. Všechny detekované mutace byly potvrzeny přímým Sangerovým sekvenováním.

Cross Reactivita

Následující polymorfismy byly detekovány jako wild type alely: c.1523T>G (F508C), c.1519A>G (I507V).

Následující cross reaktivity byly pozorovány při použití kitu Devyser CFTR Core:

1. Fragment mutantní alely R347H byla detekován jako dva odlišné fragmenty v mixu Core 2, přičemž druhý, výrazně slabší fragment je detekován ve stejné délce jako mutantní fragment R347P.
2. Fragment mutantní alely 2183AA>G může být detekován jako dva odlišné fragmenty v mixu Core 2 a druhý, výrazně slabší fragment je detekován ve velikosti 515 bp.
3. V některých případech je nespecifický fragment detekován v mixu Core 1 ve velikosti 426 bp mezi normálními píky I336 a R334 v zelené barvě.
4. Mutantní primer alely 1898+1G>A v mixu Core 2 může krosreagovat s mutantním 1898+3A>G a produkovat falešně pozitivní signal pro 1898+1G>A.

10. LIMITACE POSTUPU

A.

Používat tento product smí jen osoba vyškolená v technikách PCR a kapilární elektroforézy.

B.

Kit Devyser CFTR Core byl validován s použitím Life Technologies/ABI Thermal Cycler GeneAmp® 9700. Pokud chcete pro klinickou diagnostiku použít jiný termocykler, je nutná validace soupravy Devyser CFTR Core pro tento cykler.

C.

Kit Devyser CFTR Core byl validován s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit pro izolaci lidské DNA z plné krve, amniové tekutiny a suchých krevních kapek a QIAamp DNA Mini Kit pro izolaci DNA z choriových klků. Další extrakční soupravy nebyly dostatečně validovány a mohou vést k falešně negativním nebo falešně pozitivním výsledkům.

D.

Deyser CFTR Core kit musí být používán pouze pro detekci specifických mutací v lidském CFTR genu v souladu s manuálem. Existuje mnoho jiných mutací, které nemohou být detekovány kitem Devyser CFTR Core. Kit nebyl validován pro diagnózu cystické fibrózy. Výsledky získané kitem Devyser CFTR Core mohou být přímo použity pro konkrétní testovaný vzorek tkáně a materiál.

11. UPOZORNĚNÍ KUPUJÍCÍMU

Výsledky obdržené pomocí soupravy Devyser CFTR Core musí být interpretovány s přihlédnutím k dalším laboratorním výsledkům a klinickému obrazu pacienta. Devyser AB nezodpovídá za následná klinická rozhodnutí.

LIZ®, Veriti® a GeneAmp® jsou registrovanými obchodními známkami společnosti Life Technologies Corporation. GeneScan™, POP-4™, POP-7™ a Hi-Di™ jsou ochrannými známkami společnosti Life Technologies Corporation.

Koupí tohoto produktu nezískáváte licenci k provádění PCR podléhající patentům vlastněným třetí stranou.

12. REFERENCE

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, and Tsui LC. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis." *Science* 1989; 245 (4922): 1073-8
2. Cystic Fibrosis Mutation Database, www.genet.sickkids.on.ca/cfr/app
3. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevínek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek M Jr, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. "Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders." *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S86-102.
4. Southern KW. "Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease". *Respiration.* 2007;74 (3):241-51.
5. Dequeker E., Manfred Stuhmann, Michael A Morris, Teresa Casals, Carlo Castellani, Mireille Claustres, Harry Cuppens, Marie Des Georges, Claude Ferec, Milan Macek, Pier-Franco Pignatti, Hans Scheffer, Marianne Schwartz, Michal Witt, Martin Schwarz and Emmanuelle Girodon. "Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations". *European Journal of Human Genetics* (2008), 1–15.
6. Schwarz M., Gardner A., Jenkins L., Norbury G., Renwick P., Robinson D. "Testing Guidelines for molecular diagnosis of Cystic Fibrosis". Guidelines ratified by the UK Clinical Molecular Genetics Society (13 th July, 2009)
7. Carlo Castellani, Kevin W. Southern, Keith Brownlee, Jeannette Dankert Roelse, Alistair Duff, Michael Farrell, Anil Mehta, Anne Munck, Rodney Pollitt, Isabelle Sermet-Gaudelus, Bridget Wilcken, Manfred Ballmann, Carlo Corbetta, Isabelle de Monestrol, Philip Farrell, Maria Feilcke, Claude Férec, Silvia Gartner, Kevin Gaskin, Jutta Hammermann, Nataliya Kashirskaya, Gerard Loeber, Milan Macek, Gita Mehta, Andreas Reiman, Paolo Rizzotti, Alec Sammon, Dorota Sands, Alan Smyth, Olaf Sommerburg, Toni Torresani, Georges Traver, Annette Vernooij, Stuart Elborn. "European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening." *Journal of Cystic Fibrosis*, Volume 8, Issue 3, May 2009, p. 153-173.
8. List of CFTR2 mutations, Date: 8 December 2017. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2); available at <http://www.cftr2.org>

13. KONTAKTNÍ INFORMACE

Devyser AB
Instrumentvägen 19
SE-126 53 Hägersten
ŠVÉDSKO

Phone: +46-8-562 15 850
Homepage: www.devyser.com

Technická podpora
Telefon: +46-8-562 15 850
E-mail: techsupport@devyser.com

14. HISTORIE REVIZÍ

Tento překlad referenční anglické verze v2018-04-17, c2018-06-12 byl publikován 2018-06-13.

Korekce 2018-06-12

- Doporučení pro dávkování aktivovaného reakčního mixu do samostatných zkumavek bylo odstraněno z 7.1, další vyjasnění

Verze 2018-04-17

Odstavec 6

- Přidání Qubit® dsDNA HS Assay Kit cat.# Q32854

Odstavec 7

- Doporučení o rozpipetování aktivovaných mixů do oddělených zkumavek bylo odstraněno z kapitoly 7.1
- Změna v doporučení o použití Core 1 a Core 2 v kapitole 7.2 *Přidání vzorku*

Odstavec 8

- Byla přidána informace o použití mixu Core 1 v kapitole 8.3
- Byl přidán odkaz na Cystic Fibrosis Mutation Database a typ pojmenovávání do Tabulky 6
- Byla přidána informace o CFTR2 do Tabulky 7
- Byl přidán název CFTR2 c.DNA pro mutaci 3849+10kbC>T v Tabulce 7
- Byl přidán název CFTR2 c.DNA pro normální alelu 3849+10kb v Tabulce 6
- Název cDNA alely 5T (9-13TG) byl změněn z c.1210-34TG[9-13]-12T[5] na c.[1210-12[5];1210-34TG[9-13]] v Tabulce 7
- Název cDNA alely 7T a 9T byl změněn z c.1210-12T[7] na c.1210-12[7] a z c.1210-12T[9] na c.1210-12[9] v Tabulce 7
- Byla přidána sekce "CFTRdele2,3(21kb)"

Odstavec 12

- Byla přidána reference 8

Verze 2017-03-27

Odstavec 8

- Pøidán odkaz na získání manuálu.
- Všechny alely v Tabulce 6 a 7 jsou uvedeny v pořadí podle očekávaných délek fragmentů.
- Jméno cDNA alely 3849+10kbC v CFTR 1 bylo změněno z c.3717+12181C na c.3717+12191C

Korekce 2016-09-14

- Redakční změny

Odstavec 8

- Odstavec "2184insA & 21833AA>G" upraven na "2184insA & 2183AA>G"
- Sekce "F508del/I507del složený heterozygot" upravena z "U heterozygótních vzorků s mutací L1065P, budou v Core1 chybět oba fragmenty normálních alel L1065 a R1066."
na
"V případě složeného heterozygota s genotypem F508del/I507del budou chybět příslušné fragmenty normálních alel u markerů F508 a I507."
- Odstavec "FG551D/R553X složený heterozygot" upravena na "G551D/R553X složený heterozygot"
- Sekce "G551D/R553X složený heterozygot" upravena z "Normální alela v pozici G551 je v Core 1 detekována jako jeden specifický oligonukleotid. V případě složeného heterozygota s genotypem G551D/R553X, odpovídající fragment normální alely G551 bude chybět v Core 1"
na
"V případě složeného heterozygota s genotypem G551D/R553X fragment normální alely chybí v mixu Core 1"
- Sekce "L1065P homozygótní mutant" upraven z "U vzorků s homozygótní mutací G551D a R553X mutací, bude fragment normální alely G551 chybět v Core 1"
na
"Pokud u vzorku detekujeme homozygótní mutaci L1065P, obě normální alely L1065 a R1066 budou chybět v mixu Core 1"

Verze 2016-08-24

- Redakční změny

Odstavec 3

- Aktualizace symbol pro "Skladujte při teplotě pod"

Odstavec 4

- Aktualizace linku pro download kalibrace Dye Setu

Odstavec 5

- Aktualizace doporučení pro skladování z 60 na 90 dní

Odstavec 7

- Přidána dvě dodatečná doporučení v "Přípravě vzorku pro kapilární elektroforézu":
 6. Krátce centrifugujte destičku nebo zkumavky a ujistěte se, že v roztoku nejsou žádné bublinky.
 7. Vložte destičku nebo zkumavky do ABI Genetického analyzátoru.
- Aktualizace stability aktivovaného reakčního mixu z 60 na 90 dní.

Odstavec 8

- Byla přidána sekce o 2184insA & 2183AA>G
- Byla přidána sekce o složeném heterozygótovi F508del/I507del
- Byla přidána sekce o složeném heterozygótovi FG551D/R553X
- Aktualizace linku pro download mutací
- Byla přidána sekce o Troubleshootingu (obsahuje separátní odstavec o CNVs)

Odstavec 8, Tabulka 6 a 7

- "Délky fragment alel uvedené v této tabulce jsou založeny na pozorovaných délkách fragmentů získaných pomocí ABI 3130, POP-7 polymer a 560 SIZER ORANGE" byly změněny na "Délky fragment alel uvedené v této tabulce jsou založeny na pozorovaných délkách fragmentů získaných pomocí ABI 3500, POP-7 polymer a 560 SIZER ORANGE"
- Všechny délky fragment v tabulce 6 a 7 byly aktualizovány ze získaných délek pomocí ABI 3130 na získané pomocí ABI 3500
- Všechny alely jsou uvedené dle barvy píku
- Původní jméno normální alely ID2 bylo změněno z "ID marker 3 na ID marker 2"
- Jméno cDNA alely R1066C v CFTR 1 bylo změněno z c.3197G na c.3196C
- Jméno cDNA alely R1066C v CFTR 2 bylo změněno z c.3197G>A na c.3196C>T
- Jméno cDNA alely 3849+10kbC>T v CFTR 2 bylo změněno z c.3717+12181C>T na c.3717+12191C>T
- Délka fragmentu alely 1898+1G>A v CFTR 2 byla změněna z 240 bp na 238 bp