

Devyser CFTR Italia v2

Kat. No.: 8-A032.2

Pro *in vitro* diagnostiku

Návod k použití



OBSAH	2
1. SEZNÁMENÍ SE SYSTÉMEM DEVYSER ITALIA v2	4
Použití	4
Součástí kitu	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 reagensů	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	11
Postup a skladování	11
Kontroly	11
7. INSTRUKCE PRO POUŽITÍ	12
7.1 Postup Devyser CFTR Italia v2	12
7.2 Příprava vzorků a amplifikace PCR	12
Příprava vzorků	12
Přidání vzorku	12
Amplifikace	13
7.3 Detekce	14
Příprava vzorků	14
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 Italia v2	16
Zdravé (nemutované) alely	16
Mutantní alely	16
8.4 Vyhodnocení	16
Cutoff signály píků	16
Sizing DNA fragmentů	17
Cross-mix ID markery	17

Identifikace cross-mix vzorků	17
Zdravé (nemutované) alely	17
Heterozygótní mutace	17
Homozygótní mutace	17
Alel specifické výjimky	17
Dele14b_17b/Dele17a_18 složený heterozygot	17
Výskyt mutantního píku alely Dele14b_17b	17
Nepřímá detekce krátkých inzercí a delecí (indels)	18
Mutace v místě nasedání primeru a polymorfismy	19
Normální alely detekované v mixu Italia 1	20
Normální (zdravé) alely detekované v mixu Italia 2.	21
Troubleshooting	22
Artefakty PCR	22
Elektroforetické artefakty	23
Copy number varianty	24
9. VÝKONOSTNÍ CHARAKTERISTIKY	25
Sensitivita	25
Specifita	25
Cross-Reaktivita	26
10. LIMITACE POSTUPU	27
11. UPOZORNĚNÍ KUPUJÍCÍMU	28
12. REFERENCE	29
13. KONTAKTNÍ INFORMACE	31
14. HISTORIE REVIZÍ	32

1. SEZNÁMENÍ SE SYSTÉMEM DEVYSER ITALIA v2

Použití

Kit Devyser CFTR Italia v2 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.

Součástí kitu

Kit Devyser CFTR Italia v2 obsahuje reagentie připravené k použití pro PCR amplifikaci genetických markerů.

Postup

DNA extrakce:

Kit Devyser CFTR Italia v2 byl validován s použitím QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (Qiagen, cat.# 51126) a QIASymphony DSP DNA Midi Kit (Qiagen, cat.# 937255) pro extrakci DNA z lidské krve (EDTA) a s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat.# 51104) pro extrakci DNA ze suché kapky krve.

Amplifikace:

Kit Devyser CFTR Italia v2 byl validován s použitím Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Veriti® Thermal cycler.

Detekce:

Genetické analyzátoři Life Technologies/Thermo Fisher Scientific/ABI (ABI 310, 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 1989¹, bylo popsáno více než 1900 mutací a variant v genu CFTR². 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 Italia v2 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 Italia v2 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 prostorách. 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 Italia v2 obsahuje reagentie pro analýzu 48 vzorků.

Složky

Tabulka 1. Komponenty, které jsou součástí kitu Devyser CFTR Italia v2.

Barva víčka	Barva Zkumavky	Štítek	Katal.č.	Obsah soupravy
Oranžová	Čirá	PCR Activator	4-A018	2
Fialová	Hnědá	Italia 1	4-A229	1
Zlatá	Hnědá	Italia 2	4-A230	1

4.2 Požadované položky, které nejsou v soupravě

Příprava reagentů

- Plast pro termocykler
- 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

- PCR Cykler: Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Veriti® Thermal cycler. 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/Thermo Fisher Scientific/ABI Genetic Analyzer (ABI 310, 3130, 3500, 3730)
- Metodika je validovaná na polymerech: 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 Art. No.: 8-A402).

4.3 Dye Set Calibration

ABI 3130, 3730:

Použijte DEV-5 Dye Set MultiCap kit (Devyser Art. No.: 8-A401) s “Any5Dye” Dye Set.

ABI 3500:

Použijte DEV-5 Dye Set MultiCap kit (Devyser Art. No.: 8-A401) a nastavte DEV-5 Dye Set.

ABI 310 Matrix file generation:

Použijte DEV-5 Dye Set SingleCap kit (Devyser Art. No.: 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. 5. SKLADOVÁNÍ A POŽADAVKY NA POUŽITÍ

A.

Skladujte všechny komponenty při maximální teplotě -18°C.

B.

Reakční Master Mixy (připravené přidáním Italia 1 a Italia 2 do zkumavek s PCR aktivátorem) mohou být uchovávány při +2 až +8°C 7 dní a pod -18°C 60 dnů. Vyvarujte se opakovanému rozmrazování a zmrazování.

C.

Likvidace zbytků reagentů musí být v souladu s legislativou ČR.

D.

Nemíchejte reagenty z různých šarží.

6. POŽADAVKY NA VZOREK

Klinické vzorky

Kit Devyser CFTR Italia v2 byl validován pro použití s lidskou genomovou DNA izolovanou z plné krve (EDTA) a suchých kapek krve.

DNA extrakce a měření

Kit Devyser CFTR Italia v2 byl validován s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, kat. č. 51104) a QIASymphony DSP DNA Midi Kit (Qiagen, cat.# 937255) pro extrakci DNA z lidské krve (EDTA) a s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat.# 51104) pro extrakci DNA ze suché kapky krve.

Pokud použijete jinou extrační metodu pro izolaci DNA je nutná validace s kitem Devyser CFTR Italia v2 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 3,75 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).

Koncentrace a čistota DNA je důležitá pro úspěšné testování kitem Devyser CFTR Italia v2. 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 Italia v2.

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/Thermo Fisher Scientific, 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

Konzistentní výsledky lze dosáhnout s lidskou genomovou DNA extrahovanou z plné krve (EDTA) pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (Qiagen, cat.# 51126) nebo QIASymphony DSP DNA Midi Kit (Qiagen, cat.# 937255).

QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit

Použijte protokol se vstupním objemem 200 μL čerstvé plné krve a eluci pomocí 100 μL elučního pufru. Změřte koncentraci purifikované DNA a zředte vzorek na 5 ng/μL.

QIASymphony DSP DNA Midi Kit

Použijte protokol se vstupním objemem 400 µL čerstvé plné krve a elucí pomocí 200 µL elučního pufu. Změřte koncentraci purifikované DNA a zřed'te vzorek na 5 ng/µL.

Extrakce DNA ze suché kapky

Konzistentní výsledky lze dosáhnout s lidskou genomovou DNA extrahovanou ze suché kapky pomocí protokolu pro suché kapky uvedeném v manuálu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat.# 51104). Použijte protocol pro suché kapky se vstupním materiálem 2 terčičky ≥3 mm v průměru a elucí pomocí 25-50 µL elučního pufu.

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 Italia 1.

Negativní kontrola

Doporučujeme použít negativní kontrolu (bez DNA) v každém runu. Pokud detekujete píky v mixu Italia 1 a Italia 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 Italia v2

Každý kit Devyser Italia v2 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 Italia v2 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 Italia 1 a Italia 2 do zkumavek s PCR Aktivátorem. Ujistěte se, že jsou oba Italia 1 and Italia 2 před použitím kompletně rozmrazeny.

1. Stočte krátce každou zkumavku. V tomto kroku zkumavky nevortexujte.
2. Přidejte 500 μL příslušného Italia 1 a Italia 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.
5. Napipetujte 10 μL smíchaného master mixu do PCR zkumavek.
6. Uzavřete zkumavky a krátce je stočte.
7. Pokračujte krokem 7.2.

Smíchaný reakční master mix je stabilní při +2 - 8°C po dobu 7 dní a při méně než -18°C po dobu 60 dní. Vyvarujte se opakovanému rozmrazování a zmrazování.

7.2 Příprava vzorků a amplifikace PCR

Příprava vzorků

Pokud použijete jinou extrační metodu pro izolaci DNA je nutná validace s kitem Devyser CFTR Italia v2 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 3,75 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 s nízkou koncentrací DNA mohou být analyzovány, ale je nutné zvýšit počet PCR cyklů z 29 na 31. Neanalyzujte vzorky s koncentrací DNA nad 1,5 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 Italia 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 Italia 1.

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

Amplifikace

Kit Devyser CFTR Italia v2 byl validován s použitím Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Veriti® Thermal cycler. Jiné PCR cyclery musí být otestovány a zhodnoceny, že mohou být použity pro diagnostiku kitem Devyser Italia v2. PCR cyclery by měly být pravidelně kalibrovány a udržovány tak, aby byly přesné.

Pro Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Veriti® Thermal cycler:

V "Tools Menu" vyberte "Convert a Method". V dalším kroku vyberte "9700 Max Mode" a poté zadejte PCR profil tak, jak je uvedeno níže.

Ostatní thermal cyclery:

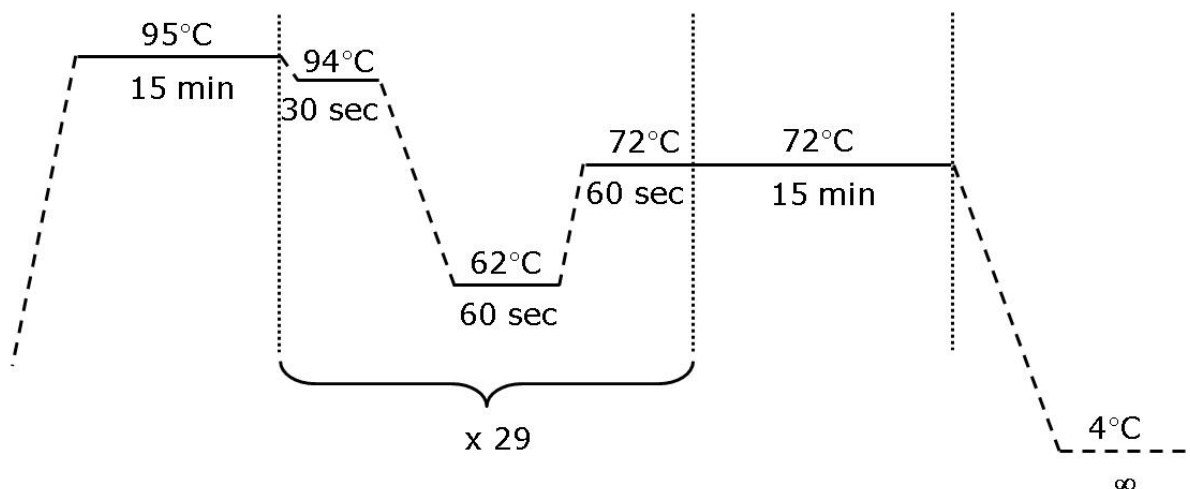
Pro Life Technologies/Thermo Fisher Scientific/ABI GeneAmp® PCR System 9700, nastavte "ramp speed" na "MAX".

Důležité! Na ostatních cyclerech nastavte Ramping na ohřev 1,6°C/s a chlazení 1,6°C/s.

Amplifikační prostor:

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

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 µL.
2. Nastavte ramp na (ohřev 1,6 °C/s, chlazení 1,6 °C/s).
3. Spust'tte amplifikaci (doba trvání cca 2,5 h).
4. Po amplifikaci vyjměte zkumavky s amplifikační reakcí z termocyklu, 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 Life Technologies/Thermo Fisher Scientific ohledně údržby a nastavení přístroje. Před spuštěním analýzy soupravou Devyser CFTR Italia v2, 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 ABI 310) 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
- Run module

Run Modules

Doporučené run moduly pro různé typy Genetických analyzátorů Life Technologies/Thermo Fisher Scientific (ABI 310, 3130, 3500, 3730) jsou uvedeny v tabulkách 2 - 5.

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	15 kV
Injection time	5 - 15 s
Run voltage	15 kV
Run time	40 min

Tabulka 3. Nastavení Run modulu pro ABI 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 Italia v2

Kit Devyser CFTR Italia v2 se používá pro kvalitativní analýzu mutací v CFTR genu. Analýza se provádí dvěma oddělenými Italia v2 mixy (Italia 1 a Italia 2). Mix Italia 1 detekuje nemutované, zdravé alely. Odpovídající mutantní alely jsou detekovány mixem Italia 2. Všechny nalezené nemutované a mutované alely jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

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 Italia 1.

Mix Italia 1 a Italia 2 zahrnují i analýzu dvou polymorfních short tandem repetice (STRs) (ID marker), které umožňují identifikaci obou mixů u analyzovaného vzorku. ID markery amplifikují STR markery na chromozomech 13 a 18 s využitím stejných primerů u obou mixů Italia 1 i Italia 2 (tabulky 6 a 7). Identifikační markery pro detekci pomíchání vzorků použité v kitu Devyser CFTR Italia v2 jsou identické jako ID markery použité ve všech kitech Devyser detekujících CFTR mutace.

Zdravé (nemutované) alely

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

Mutantní alely

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

8.4 Vyhodnocení

Cutoff signály píků

Doporučujeme, aby byl určen cutoff range pro každý přístroj. Nepoužívejte nižší cutoff hodnotu než 200 RFU (ABI 310 a 3130) a 500 RFU (ABI 3730 a 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 Italia v2 analyzujte společně s ladderem 560 SIZER ORANGE a softwarem pro fragmentační analýzu (např. GeneMapper).

Cross-mix ID markery

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

Identifikace cross-mix vzorků

Délka cross-mix ID markerů detekovaných v mixech Italia 1 a Italia 2 u jednoho vzorku musí být srovnatelné. Každý vzorek musí mít identický profil ID markerů v mixech Italia 1 a Italia 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 Italia 1 a stejný pík příslušné alely není detekován v mixu Italia 2.

Heterozygótní mutace

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

Homozygótní mutace

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

Alel specifické výjimky

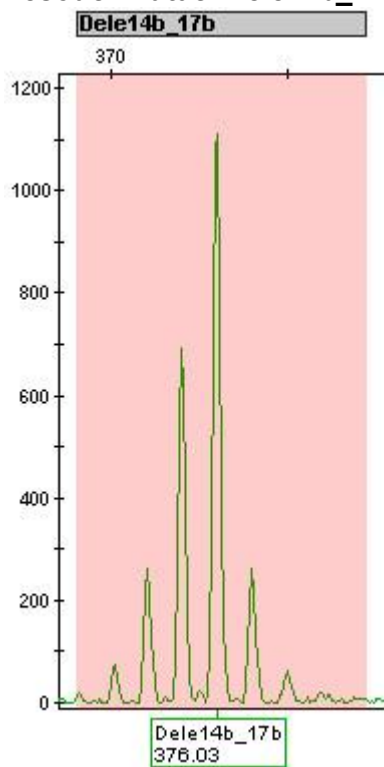
Dele14b_17b/Dele17a_18 složený heterozygot

Zdravé alely delecí Dele14b_17b a Dele17a_18 jsou amplifikovány pomocí společného páru primerů specifických pro sekvenci v intronu 19 (ref. název: intron 17) a produktem je fragment o délce 299 bp detekovaný v zelené barvě v panelu Italia 1. V případě složeného heterozygota s genotypem Dele14b_17b/Dele17a_18 nebo homozygótní delecí, příslušný fragment zdravé alely nebude v panelu Italia 1 přítomen.

Výskyt mutantního píku alely Dele14b_17b

U PCR fragmentu CFTRdele14b-17b detekovaného v Italia 2 (Figure 1) se vyskytují stutter píky (píky navíc). Stutter píky pocházejí z co-amplifikace dvou dinukleotidů (2 bp repetice) short tandem repetice (STRs) přímo před zlomovým místem CFTRdele14b-17b v intronu 20 (ref. název: intron 17b). Absolutní délka detekovaných PCR fragmentů se bude lišit mezi jednotlivci v závislosti na skutečném počtu opakování v co-amplifikované STR.

Obrázek 1. Bližší pohled na vzorek analyzovaný pomocí Devyser CFTR Italia 2 mix a nesoucí mutaci Dele14b_17b.

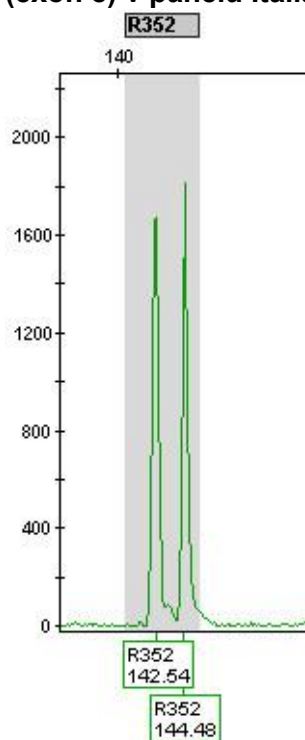


Nepřímá detekce krátkých inzercí a delecí (indels)

Mutace způsobené krátkými inzercemi a delecemi (indels) mezi dvěma protilehlými primery budou mít za následek změny velikosti u všech fragment produkovaných těmito primery. Indel mutace mohou být tedy nepřímo detekovány v Italia 1, přestože jsou přímo detekovány v Italia 2. Jeden příklad falešné mutace detekované v panelu Italia 1 najdete u obrázku 2 (1154insTC). Přesnou identitu detekovaných indels není možno určit pomocí kitu Devyser CFTR Italia v2. Doporučujeme, aby indels byly sekvenovány, aby bylo možno zjistit jejich přesnou identitu.

Úplný seznam indel mutací nepřímo zjištěných v Italia 1 lze stáhnout v download sekci na adrese: <http://devyser.com/downloads#devyser-cftr-italia-v2>

Obrázek 2. Falešná delece 1154insTC způsobené posunem 2 bp size u R352 amplikonu (exon 8) v panelu Italia 1.



Mutace v místě nasedání primeru a polymorfismy

Mutace v místě nasedání primerů a polymorfismy mohou ovlivnit funkci jednotlivých PCR primerů použitých v kitu Devyser CFTR Italia v2.

Úplný seznam mutací a polymorfismů, které nebyly konkrétně testovány kitem Devyser CFTR Italia v2 lze stáhnout v sekci download na adrese:

<http://devyser.com/downloads#devyser-cftr-italia-v2>

Normální alely detekované v mixu Italia 1

Tabulka 6. Normální (zdravé) alely detekované v mixu Italia 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	Normální alela (Italia 1)	Umístění v Pozice ²	cDNA NM_00492.3 (HGVS)	Barva píku	Délka fragmentu (bp)
1	M1	Exon 1	c.1A	Modrá	127
2	P5	Exon 1	c.14C	Modrá	140
3	CFTRdele1-wt	Promotor - Intron 1	-	Modrá	188
4	CFTR-dele2-wt	Intron 2	-	Modrá	242
5	Q39	Exon 2	c.115C	Modrá	257
6	S549	Exon 12	c.1645A	Modrá	274
7	Q552	Exon 12	c.1654C	Modrá	284
8	852del22-wt	Exon 6	-	Modrá	312
9	D110 (c.330C)	Exon 4	c.330C	Modrá	338
10	R1066	Exon 20	c.3197G	Modrá	353
11	D110 (c.328G)	Exon 4	c.328G	Modrá	365
12	1259insA-wt	Exon 9	-	Modrá	380
13	G1244	Exon 23	c.3731G	Modrá	406
14	c.1584+18672A	Intron 11	c.1585-9412A c.1584+18672A ¹⁰	Modrá	420
15	D1152	Exon 21	c.3454G	Modrá	489
16	2184delA-wt	Exon 14	-	Modrá	498
17	711+5G	Intron 5	c.579+5G	Zelená	124
18	R352	Exon 8	c.1055G	Zelená	142
19	R1158	Exon 22	c.3472C	Zelená	155
20	G178	Exon 5	c.532G	Zelená	167
21	D579	Exon 13	c.1736A	Zelená	214
22	CFTRdele22,23-wt	Intron 24 - Exon 25	-	Zelená	221
23	E585	Exon 13	c.1753G	Zelená	229
24	1898+3A	Intron 13	c.1766+3A	Zelená	241
25	4382delA-wt	Exon 27	-	Zelená	262
26	4016insT-wt	Exon 24	-	Zelená	279
27	Dele17a_18-wt	Intron 19	-	Zelená	299
28	Dele14b_17b-wt	Intron 19	-		
29	Dele2ins182-wt	Intron 1	-	Žlutá	113
30	Dele22_24-wt	Intron 24	-	Žlutá	177
31	G1349	Exon 25	c.4046G	Žlutá	213
ID1	ID marker 1	Chr. 13	-	Červená	227-320
ID2	ID marker 2	Chr. 18	-	Červená	322-413

Úplný seznam indel mutací, které ovlivňují délku fragmentů a byly detekovány v Italia 1 lze stáhnout v sekci download na adrese:

<http://devyser.com/downloads#devyser-cftr-italia-v2>

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

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

Normální (zdravé) alely detekované v mixu Italia 2.

Tabulka 7. Mutantní alely detekované v mixu Italia 2.

Mutantní alely jsou uvedeny dle očekávané délky PCR fragmentů. Použité názvy mutací a cDNA uvedených v tabulce 7 jsou uvedeny v souladu se seznamem CFTR2 mutací⁸. Pokud není uvedena jiná reference, je umístění CFTR genů uvedené v tabulce 7 stejné jako uvádí databáze mutací cystické fibrózy².

Mutation legacy name (Italia 2) ⁸	Umístění v pozice ²	Příslušná normální alela v mixu Italia 1	cDNA ⁸	Barva píku	Délka fragmentu (bp)
M1V	Exon 1	1	c.1A>G	Modrá	124
P5L ²	Exon 1	2	c.14C>T	Modrá	140
CFTR-dele2 ^{2,◇}	Intron 1	4	c.54-1161_164+1603del2875	Modrá	218
Q39X	Exon 2	5	c.115C>T	Modrá	251
Dele17a_18 ⁹	Intron 18 - Intron 21	27	c.2988+1173_3468+2111del ⁹	Modrá	257
S549R(A->C) ^{2,◇◇}	Exon 12	6	c.1645A>C	Modrá	274
Q552X	Exon 12	7	1654C>T	Modrá	284
852del22	Exon 6	8	c.720_741del AGGGAGAATGATGATGAAGTAC	Modrá	294
CFTRdele1 ²	Exon 1	3	c.4_53+69delins299	Modrá	308
D110E ²	Exon 4	9	c.330C>A	Modrá	338
R1066H ^{◇◇}	Exon 20	10	c.3197G>A	Modrá	354
D110H	Exon 4	11	c.328G>C	Modrá	365
G1244E	Exon 23	13	c.3731G>A	Modrá	406
c.1584+18672A>G ₁₀	Intron 11	14	c.1585-9412A>G ^{◇◇◇} c.1584+18672A>G ¹⁰	Modrá	420
1259insA ^{◇◇}	Exon 9	12	c.1127_1128insA	Modrá	479
D1152H	Exon 21	15	c.3454G>C	Modrá	489
2184delA	Exon 14	16	c.2052delA	Modrá	503
711+5G->A	Intron 5	17	c.579+5G>A	Zelená	124
R352Q	Exon 8	18	c.1055G>A	Zelená	142
R1158X	Exon 22	19	c.3472C>T	Zelená	159
G178R	Exon 5	20	c.532G>A	Zelená	167
D579G	Exon 13	21	c.1736A>G	Zelená	214
E585X	Exon 13	23	c.1753G>T	Zelená	229
1898+3A->G	Intron 13	24	c.1766+3A>G	Zelená	241
CFTRdele22,23	Intron 24 - Intron 26	22	c.3964-78_4242+577del	Zelená	248
4382delA	Exon 27	25	c.4251delA	Zelená	261
4016insT	Exon 24	26	c.3884_3885insT	Zelená	276

Dele14b_17b ⁹	Intron 15 - Intron 20	28	c.2620-674_3367+198del ⁹	Zelená	320- 480 ^{◇◇◇◇}
Dele2ins182 11,12	Intron 1 - Intron 2	29	c.54-5811_164+2186del8108 ins182 ^{11,12}	Žlutá	196
Dele22_24 ⁹	Intron 24 - 3'UTR	30	c.3964-3890_*3143del insTAACT ⁹	Žlutá	204
G1349D	Exon 25	31	c.4046G>A	Žlutá	213
ID marker 1	Chr. 13	ID1	Chromosome 13	Červená	227-320
ID marker 2	Chr. 18	ID2	Chromosome 18	Červená	322-413

◇ Detekce mutací byla ověřena pomocí klonování DNA sekvencí, které odpovídají těmto konkrétním mutacím. Detekce mutací nebyla potvrzena pomocí lidské genomové DNA z klinického vzorku s mutací.

◇◇ Detekce mutací byla ověřena pomocí klonování DNA sekvencí, které odpovídají těmto konkrétním mutacím. Detekce mutací nebyla potvrzena pomocí lidské genomové DNA z klinického vzorku s mutací.

◇◇◇ Název cDNA byl získán dle doporučení HGVS.

◇◇◇◇ Skutečná délka a počet píků detekovaných u Dele14b_17b se mohou lišit mezi jednotlivci v důsledku přítomnosti dvou dinukleotidů STR v amplifikované oblasti (viz obrázek 1 a reference 13).

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

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.

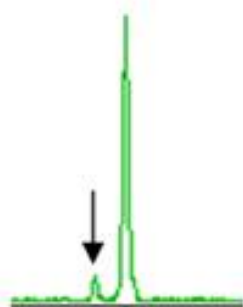
Výskyt neprůkazných výsledků, je možný z mnoha důvodů:

- » 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

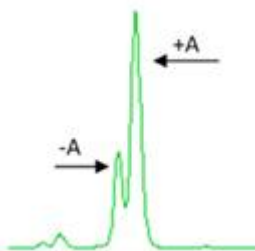
Stutter píky (obr. 3) jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jednu nebo několik repetitivních menší, než aktuální STR alela. Typický stutter pík má obsah menší, než 15% vůči příslušnému STR píku.

Obrázek 3. Stutter pík je označen šipkou.



-A píky (obr. 4) jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jeden pár bazí kratší, než PCR produkt s plnou délkou (+A pík).

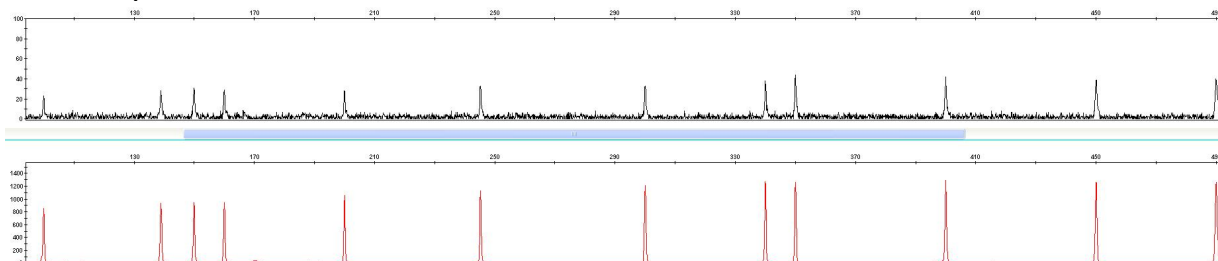
Obrázek 4. -A a +A píky jsou vyznačeny šipkami.



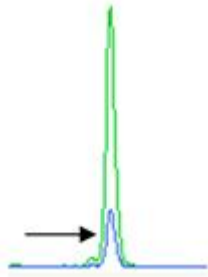
Elektroforetické artefakty

Průsvity mezi všemi použitými barevnými kanály, které je možné detekovat (obrázek 5.1 a 5.2). Crosstalk se jeví jako stejně vysoké vrcholy v sousedních barevných kanálech a měla by být vyloučena z analýzy.

Obrázek 5.1 Průsvit z červeného do žlutého kanálu (barevné kanály jsou ukázány odděleně).

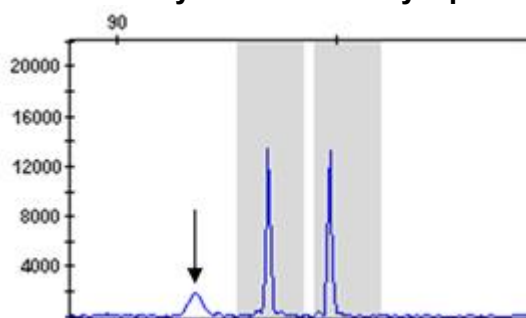


Obrázek 5.2 Průsvit ze zeleného do modrého kanálu označený šipkou (překryté barevné kanály).



Dye blobs se mohou objevit v rozsahu analýzy (Obr. 6). 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.

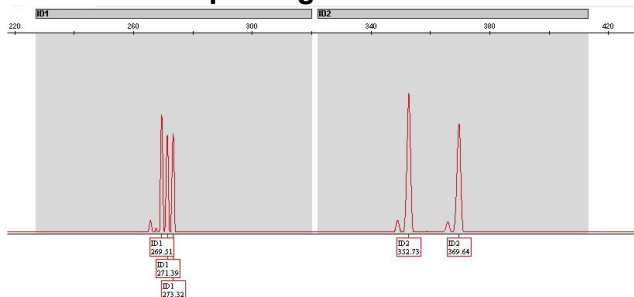
Obrázek 6. Dye blob označený šipkou.



Copy number varianty

Identifikační ID markery použité v Devyser CFTR Italia v2 jsou vysoce polymorfní markery, které mohou zobrazit copy number variace (CNVs). CNVs detekované Devyser CFTR Italia v2 by měly být použity pouze pro identifikaci vzorku, a nikoli jako diagnostické markery pro detekci aneuploidie. Obrázek 7 zobrazuje ne-patologickou detekci CNV v ID1.

Obrázek 7. Ne-patologická CNV detovaná v ID1



9. VÝKONOSTNÍ CHARAKTERISTIKY

Sensitivita

Definice:

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

Design experimentu:

Bylo testováno třicet pět (35) vzorků DNA nesoucích celkem 38 mutací specifických pro Devyser CFTR Italia v2. Vzorky byly předem otestovány jinou používanou metodou.

Poznámka: Detekce mutací CFTR-dele2, S549R(A->C), 1259insA a R1066H byla validována s použitím klonovaných DNA sekvencí specificky odpovídajících daným mutacím. Detekce mutací S549R(A->C), 1259insA a R1066H byla potvrzena s použitím lidské genomové DNA z klinických vzorků. Detekce mutace CFTR-dele2 nebyla potvrzena s použitím lidské genomové DNA z klinických vzorků.

Výsledek:

Kitem Devyser CFTR Italia v2 byly všechny mutace správně identifikovány, a proto je korelace výsledků 100%.

> 97 % sensitivita.

Specifita

Definice:

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

Design experimentu:

Sto deset (110) dárců krve bylo slepě testováno s použitím kitu Devyser CFTR Italia v2.

Výsledek:

Všechny vzorky daly interpretovatelné výsledky, které splňují kritéria pro interpretaci výsledků. U 109 ze 110 analyzovaných vzorků nebyla kitem Devyser CFTR Italia v2 zachycena žádná mutace. Jeden (1) vzorek byl heterozygótní pro delecí Dele22_24. Tento výsledek byl ověřen jinou zavedenou metodou. Potvrzená delece Dele22_24 byla z výpočtu specifity vyloučena.

> 99 % specifita.

Cross-Reaktivita

Byl nalezen a kitem Devyser CFTR Italia v2 otestován jeden (1) vzorek s potvrzenými CFTR mutacemi (711+5G>T;T/711+1G>T) lokalizovanými v sekvenci primeru použitého v Devyser CFTR Italia v2.

Následující cross reaktivity byly pozorovány při použití kitu Devyser CFTR Italia v2:

1. Přítomnost heterozygótní mutace 711+1G>T může vést k redukci signálu fragmentu 711+5G v Italia 1.
2. Přítomnost homozygótní mutace 711+1G>T může vést k ztrátě fragmentu alely 711+5G v Italia 1.
3. Přítomnost složené mutace 711+5G>T/711+1G>T může vést k interpretaci vzorku jako homozygótního pro mutaci 711+5G>T, protože může dojít ke ztrátě fragmentu normální alely 711+5G v Italia 1.

10. LIMITACE POSTUPU

A.

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

B.

Kit Devyser CFTR Italia v2 byl validován s použitím Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Veriti® Thermal cycler. Pokud chcete pro klinickou diagnostiku použít jiný termocykler, je nutná validace soupravy Devyser CFTR Italia v2 pro tento cykler.

C.

Kit Devyser CFTR Italia v2 byl validován s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit a QIASymphony DSP DNA Midi Kit pro extrakci DNA z lidské krve (EDTA) a s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit pro extrakci DNA ze suché kapky krve. Další extrakční soupravy nebyly dostatečně validovány a mohou vést k falešně negativním nebo falešně pozitivním výsledkům.

D.

Devyser CFTR Italia v2 kit musí být používán pouze pro detekci specifických mutací v lidském CFTR genu v souladu s manuálem. Existuje mnoho jiných mutací v genu CFTR, které kit Devyser CFTR Italia v2 nemusí detekovat. Kit nebyl validován pro diagnózu cystické fibrózy. Výsledky získané kitem Devyser CFTR Italia v2 mohou být přímo použity pro konkrétní testovaný vzorek tkáně a materiál.

11. UPOZORNĚNÍ KUPUJÍCÍMU

Výsledky obdržené pomocí soupravy Devyser CFTR Italia v2 musí být interpretovány s přihlédnutím k dalším laboratorním výsledkům a klinickému obrazu pacienta. Devyser AB nezodpovídá za následná klinická rozhodnutí.

LIZ® a GeneAmp® jsou registrovanými obchodními známkami společnosti Life Technologies Corporation. GeneScan™, 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/cftr/app. Revised 2011-04-24. Cited 2015-09-09.
- 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 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, Palomaki GE, Popovich BW, Pratt VM, Rohlfes EM, Strom CM, Richards CS, Witt DR, Grody WW. "Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel." *Genet Med*. 2004; 6(5):387-91. *Reaffirmed 2013*.
- 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 Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, Mehta A, Munck A, Pollitt R, Sermet-Gaudelus I, Wilcken B, Ballmann M, Corbetta C, de Monestrol I, Farrell P, Feilcke M, Férec C, Gartner S, Gaskin K, Hammermann J, Kashirskaya N, Loeber G, Macek M, Mehta G, Reiman A, Rizzotti R, Sammon A, Sands D, Smyth A, Sommerburg O, Torresani T, Travert G, Vernooij A, Elborn S. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros*. 2009 May; 8(3):153-173.
- ⁸ List of CFTR2 mutations, Date: 27 February 2015. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2); available at <http://www.cftr2.org>.
- ⁹ Tomaiuolo R, Sangiuolo F, Bombieri C, Bonizzato A, Cardillo G, Raia V, D'Apice M.R, Bettin, M.D, Pignatti P.F, Castaldo G, Novelli G. Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: A multicentric Italian study. *J Cyst Fibros*. 2008 Sept; 7:347-351.
- ¹⁰ Costantino L, Rusconi D, Solda G, Seia M, Paracchini V, Porcaro L, Asselta R, Colombo C, Duga S. Fine Characterization of the Recurrent c.1584+18672A>G Deep-Intronic Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 May; 48:619-625.
- ¹¹ Taulan M, Girardet A, Guittard C, Altieri J-P, Templin C, Beroud C, des Georges M, Claustres M. Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD. *BMC Med Genet*. 2007 Apr; 8:22.

¹² Férec C, Casals T, Chuzhanova N, Macek Jr M, Bienvenu T, Holubova A, King C, McDevitt T, Castellani C, Farrell PM, Sheridan M, Pantaleo S-J, Loumi O, Messaoud T, Cuppens H, Torricelli F, Cutting GR, Williamson R, Alonso Ramos MJ, Franco Pignatti P, Rague'ne`s, O, Cooper DN, Audre'zet M-P, Chen J-M. Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet.* 2006 May; 14 (5):567–576.

¹³ Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland F, Rommens J, Tsui LC. A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Am J Hum Genet.* 1991 Dec; 49(6):1256-62.

¹⁴ Human Genome Variation Society Nomenclature for the description of sequence, <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-prot.html>. Revised 2015-08-31. Cited 2015-09-11.

13. KONTAKTNÍ INFORMACE

Devyser AB
Instrumentvägen 19
SE-126 53 Hägersten
ŠVÉDSKO

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

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

14. HISTORIE REVIZÍ

Tento překlad referenční anglické verze 2018-04-17 byl publikován 2018-06-05.

Verze 2018-04-17

- Redakční změny

Odstavec 6

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

Odstavec 7

- Změna v doporučení o použití Italia 1 a Italia 2 v kapitole 7.2 *Přidání vzorku*

Odstavec 8

- Byla přidána informace o použití mixu Italia 1 v kapitole 8.3

Verze 2016-08-24

- Redakční změny

Odstavec 4

- Aktualizace linku pro download kalibrace Dye Setu

Odstavec 8

- Aktualizace linku pro download mutací
- Aktualizace sekce o Elektroforetických artefaktech, která specifikuje průsvity, které mohou nastat u všech použitých barevných kanálů.
- Byl přidán obrázek 5.1, který ukazuje příklad průsvitu z červeného do žlutého kanálu.
- Název obrázku 5 "Obrázek 5. Průsvitový pík (ze zeleného do modrého kanálu) označeného šipkou" bylo změněno na:
"Obrázek 5.2 Průsvit ze zeleného do modrého kanálu označený šipkou (překryté barevné kanály)."
- Byla přidána sekce o Copy number variantách

Odstavec 8, Tabulka 7

- Délka fragment alely 711+5G->A byl změněna z 120 bp na 124 bp.

Tabulka 8. Update v kitu Devyser CFTR Italia v2, Italia 1.

Normální alela	Barva píku v2	Barva píku v1	Délka fragmentu (bp) v2	Délka fragmentu (bp) v1	Změny ve verzi v2
M1	Modrá	Zelená	127	117	Barva píku
P5	Modrá	Zelená	140	130	Barva píku
CFTRdele1-wt	Modrá	Zelená	188	178	Barva píku
CFTR-dele2-wt	Modrá	Modrá	242	397	Délka fragmentu*
852del22-wt	Modrá	-	312	-	Nový
D110 (c.330C)	Modrá	Zelená	338	338	Barva píku
D110 (c.328G)	Modrá	Zelená	365	365	Barva píku
1259insA-wt	Modrá	-	380	-	Nový
c.1584+18672A	Modrá	-	420	-	Nový
711+5G	Zelená	Modrá	124	123	Barva píku
R352	Zelená	Modrá	142	143	Barva píku
G178	Zelená	Modrá	167	166	Barva píku
Dele2ins182-wt	Žlutá	Zelená	113	110	Barva píku
Dele22_24-wt	Žlutá	Modrá	177	174	Barva píku
L997	-	Modrá	-	208	Vyloučené
G1349	Žlutá	-	213	-	Nový

*CFTR-dele2-wt v Italia 1 byla upravena tak, aby se zabránilo nepřímé detekci c.164+1523-1526del a c.164+1463delT.

Tabulka 9. Update v kitu Devyser CFTR Italia v2, Italia 2.

Mutantní alela Název	Barva píku v2	Barva píku v1	Délka fragmentu (bp) v2	Délka fragmentu (bp) v1	Změny ve verzi v2
M1V	Modrá	Zelená	124	114	Barva píku
P5L	Modrá	Zelená	140	130	Barva píku
L997F	-	Modrá	-	208	Vyloučené
Dele17a_18	Modrá	Zelená	257	259	Barva píku
852del22	Modrá	-	294	-	Nový
CFTRdele1	Modrá	Zelená	308	298	Barva píku
D110E	Modrá	Zelená	338	338	Barva píku
D110H	Modrá	Zelená	365	365	Barva píku
c.1584+18672A>G	Modrá	-	420	-	Nový
1259insA	Modrá	-	479	-	Nový
711+5G->A	Zelená	Modrá	120	120	Barva píku
R352Q	Zelená	Modrá	142	143	Barva píku
G178R	Zelená	Modrá	167	166	Barva píku
Dele14b_17b	Zelená	Zelená	320-480	368-480	Rozsah
Dele2ins182	Žlutá	Zelená	196	195	Barva píku
Dele22_24	Žlutá	Modrá	204	201	Barva píku
G1349D	Žlutá	-	213	-	Nový