



LightMix[®]- *in vitro*-diagnostikkit ***HFE H63D S65C C282Y***

Art.nr: 40-0340-32
Roche SAP-nr: 05945798001

Detektion av HFE-genens DNA-variationskodning för p.H63D, p.S65C och p.C282Y

för användning med

Roche Diagnostics LightCycler[®]-instrument

Reagens för 96 reaktioner

Vid ankomst:

Förvara torkade förblandade PCR-reagenser och kontroller skyddade från ljus i rumstemperatur (får ej frysas)



Innehållsförteckning

1. Produktinformation	3
1.2 Avsedd användning	3
1.3 Specifikationer	4
1.3.1 Kliniska prover	4
1.3.2 Instrument, programvara och produktivitet	4
1.4 Förvaring och stabilitet	5
2. Ytterligare enheter och reagenser	6
2.1 Färgkompensation	6
2.2 LightCycler®-instrument	6
2.3 Instrument	6
2.4 Provberedning	6
2.5 Reagenser	6
3. Bakgrundsinformation	7
3.1 Medicinsk bakgrund	7
3.2 Metod och analysprincip	8
3.3 Prestandaegenskaper	9
4. Försiktighetsåtgärder och varningar	10
5. Programmering	11
5.1 Färgkompensation	11
5.2 Kapillärbaserade LightCycler®-instrument	11
5.3 LightCycler® 480-instrument	12
5.4 LightCycler® PRO-instrument	13
6. Experimentprotokoll	14
6.1 Provberedning	14
6.2 Reagensberedning	14
6.2.1 Beredning av parameterspecifika reagenser (PSR)	14
6.2.2 Beredning av standarder	14
6.2.3 Beredning av standarder för genotypbestämning	15
6.3 Beredning av reaktionsblandningen	15
6.3.1 Beredning av 32 LightCycler® reaktionsblandning	15
6.3.2 Beredning av den enskilda LightCycler® reaktionsblandningen	16
6.3.3 Kapillär-/brunsladdningsprocedur	16
6.4 Förvaring och stabilitet av upplösta komponenter	17
6.5 Laddning av kontroller och genotypstandarder	17
6.5.1 Kapillärbaserade instrument	17
6.5.2 LightCycler® 480-instrument	18
6.5.3 LightCycler® PRO-instrument	18
7. Dataanalys och tolkning	19
7.1 Kalibrering	19
7.2 Kvalitetskontroll – Godkännandekriterier	19
7.2.1 Kontroll utan mall	19
7.2.2 Standarder (positiva kontroller)	19
7.2.3 Genotypstandard	20
7.2.4 Prover	20
7.2.5 Onormala smältningsskurvor	20
7.3 Spara externa genotypstandarder	21
7.3.1 Kapillärbaserade instrument	21
7.3.2 LightCycler® 480 -instrument	21
7.3.3 LightCycler® PRO -instrument	21
7.4 Läs av resultaten	22
7.4.1 Smältanalys: kapillärbaserade instrument	22
7.4.2 Smältanalys: LightCycler® 480-instrument	23
7.4.3 Smältanalys: LightCycler® PRO-instrument	24
7.5. Tolkning av resultaten	24
7.5.1 Tolkning av problematiska profiler	26
7.6 Sällsynta varianter	27
8. Felsökning	28
9. Referenser	29

1. Produktinformation

Torkade förblandade PCR-reagenser

 **Förvaras vid 4 °C till 25 °C, skyddat från ljus**

	Lock-färg	Märkning	Beskrivning innehåll	Reaktion/ Provrörsstatus	Totalt
3 x	Röd	PSR	Parameterspecifika reagenser (PSR) innehåller förblandade och torkade primrar och nålar för 32 reaktioner vardera. ≤ 86 % syntetiska oligonukleotider ≥ 14 % buffert	32 reaktioner grön-blå pellet torkad	96 rxs

Standarder (kontroll-DNA)

 **Förvaras vid 4 °C till 25 °C, skyddat från ljus**

	Lock-färg	Märkning	Beskrivning innehåll	Reaktion Provrörsstatus	Totalt
1 x	Gul	Standard 1	Positiv kontroll HFE-mutation 282Y och vildtyp för alla andra positioner cirka 4E5 genekvivalenter	32 reaktioner blå pellet torkad	32 rxs
1 x	Gul	Standard 2	Positiv kontroll HFE-mutation 63D och vildtyp för alla andra positioner cirka 4E5 genekvivalenter	32 reaktioner blå pellet torkad	32 rxs
1 x	Gul	Standard 3	Positiv kontroll HFE-mutation 65C och vildtyp för alla andra positioner cirka 4E5 genekvivalenter	32 reaktioner blå pellet torkad	32 rxs

1.2 Avsedd användning

Detta kit möjliggör detektering av vanliga mutationer i HFE-genen (OMIM: 235200) i genomiskt humant DNA från nukleinsyraextrakt som erhållits från perifert blod.

Hemokromatos typ 1 (HFE1) är ärftlig och kopplad till olika mutationer i HFE-genen. Hemokromatos leder till multiorgandysfunktion orsakad av ökad järn deposition.

Denna produkt är avsedd som en hjälp för läkare att analysera den genetiska bakgrunden hos patienter med hepatopati av okänd etiologi, patienter med levercirros, diabetes mellitus, bronspigmentering av huden i samband med förhöjda serumjärnkoncentrationer, förhöjd transferrinmättnad och förhöjda serumferritinnivåer.

Den föreliggande analysen kan utföras som tillägg till eller efter en biokemisk analys för järnöverskott med hjälp av transferrinmättnad.

Resultat som erhållits med hjälp av detta kit är inte avsedda att vara den enda grunden för ett behandlingsbeslut. Patientens mutationsstatus bör övervägas tillsammans med andra sjukdomsfaktorer.

Obs! Analysens prestanda kan endast garanteras när den används med analysinstrumentet Roche LightCycler® eller cobas z 480 Analyzer (se 1.3.2 för mer information).

Föreliggande produkt är en *in vitro*-diagnostisk utrustning som endast får användas av kvalificerad personal.

1.3 Specifikationer

LightMix® Kit *HFE H63D S65C C282Y* är en *in vitro*-diagnostisk analys, som gör det möjligt att upptäcka och identifiera de kliniskt relevanta polymorfismvarianterna p.H63D, p.S65C och p.C282Y i HFE-genen.

Närvaron av andra genvarianter kan interferera med analysen. Följande exon 4 sällsynta varianter kommer också att detekteras (se 3.1) men inte "identifieras":

p.T281M	c.842C>T	rs915273578	≈ ΔTm -15 °C
p.T281T	c.843G>A	rs369354634	
p.Q283P	c.848A>C	rs111033563	≈ ΔTm - 8 °C

1.3.1 Kliniska prover

Analysen kräver 5 µl renat genomiskt DNA i en vattenlösning som extraherats från kliniskt prov (perifert blod), innehållande 3 till 100 ng/µl genomiskt DNA (15–500 ng total mängd), med DNA-koncentrationen bestämd genom UV-spektrofotometri (1 OD₂₆₀ = 50 µg DNA/ml).

1.3.2 Instrument, programvara och produktivitet

Ett kit innehåller reagens för 96 reaktioner som utförs i en 20 µl volym.

Varje körning kräver tre standarder och en kontroll utan mall.

Tabellen nedan summerar några av kitets egenskaper:

LightCycler® Instrument	Programvaru-version (eller högre)	Körtid (cirka)	Max. prover per körning ⁽²⁾	Maximal produktivitet för kitet ⁽³⁾	Minimal produktivitet för kitet ⁽⁴⁾
LC 1.2	4.10 ⁽¹⁾	60 min	28 + 4 ktrl.	81	18
LC 1.5	4.10 ⁽¹⁾	60 min	28 + 4 ktrl.	81	18
LC 2.0	4.05	60 min	28 + 4 ktrl.	81	18
LC480 (96 brunnar)	1,5	100 min	92 + 4 ktrl.	89	18
LC480 (384 brunnar)	1,5	100 min	380 ⁽⁵⁾ + 4 ktrl.	89	18
Z 480 (öppen kanal)	1,5	100 min	92 + 4 ktrl.	89	18
LC PRO	1.X.X	70 min	89 ⁽⁶⁾ + 7 ktrl.	89	12

- Om analysen körs med instrumenten LightCycler® 1.2 eller 1.5 med programvaruversion 3.5 får du jämförbara resultat. Anvisningar för programmering av programvara 3.5, dataanalys och tolkning av resultat beskrivs inte i den här bruksanvisningen. Uppgradera till version 4.10 eller högre när så är möjligt.
LightCycler®-programvaruversion 3.5.3 innehåller inte modulen för automatisk genotypbestämning. Likvärdiga resultat kan erhållas av utbildad personal som måste analysera varje prov manuellt.
- Varje körning måste innehålla 3 standarder och en NTC (No Template Control, kontroll utan mall) för totalt 4 kontrollreaktioner.
- Den första körningen av kitet kräver 7 kontroller (istället för 4) för att anpassa modulen för genotypbestämning. Det maximala antalet prover som kan bearbetas minskar därmed.
Beroende på lokala bestämmelser kan alla 7 genotypkontroller behöva ingå i varje körning, vilket minskar det totala antalet patientprover som kan analyseras.
- Beräknades utifrån ett enstaka kliniskt prov som analyserats i varje körning.
- Det krävs att du använder fyra kit.
- För LightCycler® PRO måste varje körning inkludera alla tre genotypstandarder (1–3), kombinationerna av standarder (1+2, 1+3 & 2+3) och en NTC.

1.4 Förvaring och stabilitet

Förvaringsförhållanden

Reagenser och kontroller

Förvara de torkade reagenserna (PSR och standarder) skyddade från ljus och i rumstemperatur eller i kylskåp (från 4 °C till 25 °C).

Frys inte torkade reagenser. Utgångsdatumet är tryckt på kitets etikett.

2. Ytterligare enheter och reagenser

2.1 Färgkompensation

LightMix® Kit – Färgkompensation med HybProbe
(krävs ej för LightCycler® PRO)

TIB Molbiol
Art.nr 40-0318-00

2.2 LightCycler®-instrument

LightCycler® 2.0-instrument

LightCycler® 2.0-instrument

LightCycler® programvaruversion 4.05 eller

LightCycler® programvaruversion 4.10 eller högre

LightCycler® kapillärer (20 µl)

eller

LightCycler® 480-instrument

LightCycler® 480-instrument (modell I)

LightCycler® 480 II-instrument

cobas z 480 Analyser

LightCycler® programvaruversion 1.5 eller högre

LightCycler® 480 Multiwell-platta 96 vit eller

LightCycler® 480 Multiwell-platta 384 vit

eller

LightCycler® 1.x-instrument

LightCycler® 1.2 och 1.5-instrument

LightCycler® programvaruversion 4.10

LightCycler® kapillärer (20 µl)

eller

LightCycler® PRO-instrument

LightCycler® PRO-instrument

LightCycler® programvaruversion 1.X.X

LightCycler® 480 Multiwell-platta 96 vit eller

LightCycler® 480 Multiwell-platta 384 vit

Valfritt:

Roche Diagnostics

Avvecklad

Avvecklad

Art.nr 04 898 915 001

Avvecklad

Roche Diagnostics

Avvecklad

Art.nr 05 015 278 001

Art.nr 05 200 881 001

Art.nr 04 994 884 001

Art.nr 04 729 692 001

Art.nr 04 729 749 001

Roche Diagnostics

Avvecklad

Art.nr 04 779 584 001

Art.nr 11 909 339 001

Roche Diagnostics

Art.nr 09 541 713 001

Ingår i instrumentet

Art.nr 04 729 692 001

Art.nr 04 729 749 001

2.3 Instrument

LC karusellcentrifug 2.0 (230 volt)

Lockverktyg

Art.nr 03 709 582 001

Art.nr 03 357 317 001

2.4 Provberedning

Manuell provberedning:

High Pure PCR Template Preparation Kit

Nukleasfritt vatten av PCR-kvalitet

Etanol p.a.

Isopropanol p.a.

Roche Diagnostics

Art.nr 11 796 828 001

valfri leverantör

valfri leverantör

valfri leverantör

Automatisk provberedning:

MagNA Pure-instrument

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

Roche Diagnostics

Avvecklad

Avvecklad

MagNA Pure 2.0-instrument

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I

Avvecklad

Avvecklad

MagNA Pure Compact-instrument

MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I

Avvecklad

Avvecklad

MagNA Pure 96-instrument

MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Small Volume Kit

MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Large Volume Kit

Art.nr 06 541 089 001

Art.nr 06 543 588 001

Art.nr 06 374 891 001

MagNA Pure 24-instrument

MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit

Art.nr 07 290 519 001

Art.nr 07 658 036 001

2.5 Reagenser

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe

Roche Diagnostics

Art.nr 12 239 272 001

3. Bakgrundsinformation

3.1 Medicinsk bakgrund

Ärftlig hemokromatos anses vara en av de vanligaste ärftliga sjukdomarna hos en population av kaukasiskt ursprung.

Hos europeiska kaukasier rapporteras förekomsten av hemokromatos vara 1:400 (Feder et al., 1996)¹. Cirka 90 % av hemokromatospatienterna har en homozygot mutation som leder till att aminosyra 282 Cys ändrats till Tyr (282 Y/Y), medan ytterligare 5 % är sammansatta heterozygoter med variationen 282 C/Y kombinerad med en förändring från 63 His till Asp för den andra allelen (63 H/D), eller har en homozygot 63 D/D-mutation, vilket endast orsakar en lindrig form av hemokromatos.

Det är endast heterozygot 282 C/Y-varianten som inte visar risk för hemokromatos. Heterozygota mutationer för 63 H/D eller 65 S/C och kombinerade heterozygoter 63/65 utan en kollateral aminosyraförändring 282 C/Y visar ingen ökad risk. 63D- och 282Y-mutation på samma allel är extremt sällsynt (Best et al., 2001¹¹).

Nomenklaturen för mutationer hos HGVS avser **p.**rotein eller **c.**DNA-positioner:

p.H63D (rs1799945)	c.187C>G	63 H/D	(används här)
p.S65C (rs1800730)	c.193A>T	65 S/C	
p.C282Y (rs1800562)	c.845G>A	282 C/Y	

Kliniska manifestationer

Ärftlig hemokromatos kännetecknas av en olämpligt hög absorption av järn i mag-tarmslemhinnan, vilket leder till överdriven lagring av järn, särskilt i lever, hud, bukspottkörtel, hjärta, leder och testiklar.

En välkänd manifestation av vävnadsskada orsakad av järnackumulering är levercirros som kan leda till hepatocellulärt karcinom (Willis et al., 2000)². Vanligt för hemokromatos är också artropati, hypogonadism, skador på bukspottkörteln, hjärtsvikt och insulinresistens (diabetes) (Edwards et al., 1980³, Pietrangelo, A., 2004⁴, Mc Dermott et al., 2005⁵, Franchini, M., 2006⁶).

Genetisk testning

I kliniska studier har HFE-mutationer funnits vara betydligt vanligare vid sjukdom än vid kontrollprover (Willis et al., 2000)².

Genanalysen hjälper oss att förstå den genetiska bakgrunden för vissa sjukdomar. Genetisk testning på egen hand identifierar individer som kan utveckla en sjukdom men inte själva sjukdomen.

Genetiska variationer kan påvisas till exempel genom DNA-sekvensering, hybridisering till immobiliserade nålar på matriser eller remsor, eller mer praktiskt med Realtids-PCR. Detektion av HFE-relaterade mutationer genom en smältkurvsanalys med fluorescerande märkta nålar har redan publicerats 1999 (Mangasser et al. 1999⁷, Bollhalder et al. 1999⁸).

3.2 Metod och analysprincip

Med hjälp av PCR-metod amplifieras två fragment av HFE-genen samtidigt med specifika oligonukleotida primrar. Fluorescensmärkta nålar används för att identifiera PCR-produkten och bestämma genotypen genom att utföra en smältkurvsanalys.

Nålen binder till en del av det amplifierade fragmentet som spänner över mutationsstället. Om nålens område inte överensstämmer destabiliseras hybriderna. Under analysen av smältkurvan höjs temperaturen långsamt. Nålen dissocieras vid en specifik smälttemperatur, vilket resulterar i en minskning i fluorescens.

Exon 4: Variant p.C282Y

Ett 284 bp långt PCR-fragment som innehåller c.845G>A (C282Y)-polymorfism analyseras med hjälp av en LightCycler® Red 640 röd oligomer som matchar den muterade 282Y-allelen. I analysen av smältkurvan visar 282Y-proverna en högre temperatur än C282-allelen av vildtyp.

Andra varianter, t.ex. 281M eller 283P ger olika smälttemperaturer (se 7.6).

Exon 2: Varianter p.H63D och p.S65C

Ett 163 bp långt PCR-fragment som innehåller c.187C>G (63 H/D)- och c.193A>T (65 S/C)-polymorfismer analyseras med hjälp av en SimpleProbe® oligomer som matchar den muterade 63D-allelen.

Nålen binder till en del av det amplifierade fragmentet med början från aminosyra 58 Phe och passerar förbi mutationsställena.

I analysen av smältningskurvan visar 63D-proverna en högre temperatur än vildtypsallelen 63H, medan 65C-proverna har den lägsta smälttemperaturen. Andra varianter ger olika smälttemperaturer (se 7.6).

Avläsning av resultat för genotyper baseras på smältningstemperaturer jämfört med medföljande standarder. Om det är möjligt på instrumentet kan programavläsning av genotypresultaten uppnås genom automatiserad genotypbestämning (instrumentberoende: programvarumodulen "Melt Curve Genotyping" (Genotypbestämning med smältkurva)).

Automatiserade genotypresultat måste granskas manuellt med avseende på avvikande kurvor och olika smältpunktstemperaturer. Om den automatiserade typbestämningen inte rapporterar konsekventa resultat för genotypen ska genotypen dras av från smältpunkterna enligt kriterierna i kapitel 7.

Se även avsnitt 7.6 för smälttemperaturer som förväntas för andra varianter.

Kitet innehåller DNA-standardkodning för 282 C/Y-, 63 H/D- och 65 S/C-varianter för att möjliggöra jämförelse med kliniska prover.

F58 H63 S65
5'-TTGTTCTGTTCTATGATCATGAGAGTCGCG-3'
3'-ACAAGCACAAAGATACTAGTACTCTCAGCG-5'

3.3 Prestandaegenskaper

Testet är specifikt och gör det möjligt att påvisa HFE-genvarianter på kodon 63, 65 och 282. Ingen känd interferens.

Analytisk specificitet

Specificiteten för målgenen och lämpligheten hos PCR-amplifieringen som användes i detta kit påvisades genom jämförelse med resultaten som erhöles genom direkt sekvensering av ampliconen för *HFE H63D S65C* och ampliconen för *HFE C282Y*.

Analytisk sensitivitet

Detektion av seriespädningar av flera heterozygota humana DNA-gener har visat att detektionsgränsen för detta kit är 250 kopior DNA (1,5 ng). Den minsta mängd som får användas för testning är 15 ng (se avsnitt 1.3.1).

Diagnostisk sensitivitet och specificitet

Totalt 120 olika genomiska DNA-prover från personer av kaukasiskt ursprung analyserades parallellt med sekvensering och med detta kit. Studien jämförde resultat som erhöles med kitet med ABI 3730xl DNA-sekvenseringsdata som erhöles av LGC Genomics GmbH, Berlin.

Studieresultat: Resultaten för båda analysmetoderna var i 100 % överensstämmelse.

Särskilt gäller följande:

HFE p.H63D S65C: 17 av proverna var heterozygota c.187 C/G (63 H/D) och homozygota vildtyper c.193 A/A (65 S/S), 93 homozygota vildtyper 187 C/C och 193 A/A (63 H/H 65 S/S), 4 homozygota vildtyper 187 C/C (63 H/H) och heterozygota 193 A/T (65 S/C), 6 homozygota mutationer 187 G/G (63 D/D) och homozygot vildtyp 193 A/A (65 S/S); den dubbla homozygota kombinationsmutationen 187 G/G och 193 T/T har aldrig observerats.

HFE p.C282Y: 118 prover var homozygota vildtyper 845 G/G (282 C/C), 2 var heterozygota 845 G/A (282 C/Y) medan inga var homozygota mutationer 845 A/A (282 Y/Y).

Sammanfattning av resultat:

93 prover	homozygot "vildtyp"	63 H/H	65 S/S	282 C/C
4 prover	heterozygot för 65	63 H/H	65 S/C	282 C/C
15 prover	heterozygot för 63	63 H/D	65 S/S	282 C/C
6 prover	homozygot mutation för 63	63 D/D	65 S/S	282 C/C
2 prover	heterozygot för 63 och för 282	63 H/D	65 S/S	282 C/Y

4. Försiktighetsåtgärder och varningar

Hanteringskrav

Föreliggande produkt är en *in vitro*-diagnostisk utrustning och får därför endast användas av kvalificerad personal.

Allmänna försiktighetsåtgärder för hantering av generiskt laboratoriematerial krävs.

Laboratoriets arbetsflöde måste överensstämja med standardpraxis. På grund av risken för kontaminering måste PCR-beredning och PCR-amplifiering utföras i fysiskt åtskilda utrymmen.

Blanda inte reagenser från olika loter.

Använd inte reagenser efter utgångsdatumet.

Använd den manuella versionen som medföljer kitet (se kitets etikett).

Laboratorieprocedurer

Allt material av humant ursprung och tillhörande avfall måste behandlas som potentiellt smittbärande. Rengör och behandla alla arbetsytor noggrant med desinfektionsmedel som godkänts av lokala myndigheter.

Ät, drick eller rök inte i laboratoriets arbetsområde.

Får ej pipetteras med munnen.

Använd skyddshandskar, laboratorierockar och skyddsglasögon för engångsbruk vid hantering av prover och komponenter.

Undvik mikrobiell eller nukleaskontaminering av reagenserna vid pipettering av alikvoterna. Det är viktigt att använda sterila engångsspetsar med filter.

Tvätta händerna noggrant efter hantering av proverna och komponenterna.

Provberedning

Se säkerhetsanvisningarna som medföljer bipacksedeln för produkten (se avsnitt 6.1). för korrekt hantering och kassering

Amplifiering och detektion

Innan du använder denna produkt bör du läsa användarhandboken för LightCycler®.

Spara en provfil för att identifiera varje position så att provet kan identifieras på rätt sätt.

Kontrollera LightCycler®-instrumentets inställningar och se till att de matchar de som rapporterats i följande avsnitt "Programmering" specifikt för ditt instrument.

Vidrör inte kapillärytan eller plattskyddet utan handskar.

Läs alla bruksanvisningar och säkerhetsinstruktioner för LightCycler®-instrument.

Hantering av avfallsmaterial

Kassera oanvända reagenser och avfall i enlighet med gällande lagar.

5. Programmering

5.1 Färgkompensation



Färgkompensation krävs vid användning av *LightMix® Kit HFE H63D S65C C282Y*.

Analysera data med "Color Compensation" (Färgkompensation) (TIB Molbiol CC 530-640).

Om den inaktiveras genereras ogiltiga avläsningar av resultaten. För LightCycler® PRO används färgkompensation automatiskt när det kitspecifika LightCycler®-analyspaketet (LCAP) används.

5.2 Kapillärbaserade LightCycler®-instrument

Mer information finns i användarhandboken för LightCycler®.

Protokollet består av fyra programsteg (tabell 1):

1. **Denaturering** av prov och aktivering av enzymet
2. **Cykling** PCR-amplifiering av mål-DNA
3. **Smältning** Identifiering av PCR-amplifierad DNA-sekvens
4. **Kylning** av instrumentet

Steg:	1	2			3			4
<u>Parameter</u>								
Analysläge	Inget	Kvantifieringsläge			Smältkurvsläge			Inget
Cykler	1	45			1			1
Mål °C	95	95	60	72	95	43	75	40
Vänta tt:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Stegrings- hastighet °C/s	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Sek. mål °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Stegstorlek °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Stegfördröjning Cykler	0	0	0	0	0	0	0	0
Insamling Läge	Inget	Inget	Enkelt	Inget	Inget	Inget	Kont.	Inget

Tabell 1: Programmering av kapillärbaserade instrument.

Obs!

Bibehåll standardprogramvärdena under programmering: kanal = 530, max. prover = 32, söktemperatur = 30°C och kapillärstorlek = 20 µl. Ändra inte värdet för kapillärstorlek till 100 µl.

Lagra programmet och standardvärdena som "**RUN Template**" (Körningsmall) som kan laddas för att starta varje körning.

Antalet cykler kan ökas upp till 50 cykler för att öka signalerna i kanal 530.

Precis innan du startar körningen ska du ändra max. prover (standard = 32) till antalet prover plus kontroller som är inkluderade i körningen, för att förhindra att instrumentet stoppas på grund av saknade kapillärer.

För LightCycler 1.x-instrument med programvaruversion 3.5.3 ska det stå "Temperature Transition Rate" (Temperaturövergång) i stället för "Ramp Rate" (Stegringshastighet).

5.3 LightCycler® 480-instrument

Mer information hittar du i användarhandboken.

Detektionsformat: TIB Molbiol 530–640

Se handboken för:

LightMix® Färgkompensation med HybProbe.

Art.nr 40-0318-00, Roche SAP-nr: 05997704001



Reaktionsvolym: 20 µl

Programmering:

Protokollet består av fyra programsteg (tabell 2):

1. **Denaturering** av prov och aktivering av enzymet
2. **Cykling** PCR-amplifiering av mål-DNA
3. **Smältning** Identifiering av PCR-amplifierad DNA-sekvens
4. **Kylning** av instrumentet

Steg:	1	2			3			4
Parameter								
Analysläge	Inget	Kvantifieringsläge			Smältkurvsläge			Inget
Cykler	1	45			1			1
Mål °C	95	95	60	72	95	43	75	40
Insamling Läge	Inget	Inget	Enkelt	Inget	Inget	Inget	Kont.	Inget
Vänta tt:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Stegringshastighet °C/s 96	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	1,5	0,29	1,5
Stegringshastighet °C/s 384	4,6	4,6	2,4	4,6	4,6	2,0	0,29	2,0
Insamlingar per °C	-	-	-	-	-	-	1	-
Sek. mål °C	0	0	0	0	-	-	-	-
Stegstorlek °C	0	0	0	0	-	-	-	-
Stegfördröjning cykler	0	0	0	0	-	-	-	-

Tabell 2: Programmering av LightCycler® 480-instrumentfamiljen

Obs!

- a) Lagra programmet och standardvärdena som "**RUN Template**" (Körningsmall), som kan laddas för att starta varje HFE LightCycler®-körning.
- b) Se till att programmera endast 1 insamling per sekund istället för standardvärdet 3. Fler insamlingar minskar lutningen på smältkurvan, ökar experimenttiden och orsakar fel på kitet.
- c) Antalet cykler kan ökas upp till 50 cykler för att öka signalerna i kanal 530.

5.4 LightCycler® PRO-instrument

LightCycler® PRO-instrument

Använd programvaruversion 1.X.X. Mer information finns i användarassistansen för LightCycler® PRO.

En matchande LightCycler®-analyspaketfil (LCAP) för LightMix® HFE 63-65-282 kan laddas ner från navifyportal.roche.com. Kontrollera den senaste versionen av LCAP.

Den kitspecifika körningsprofilen är en del av LCAP och motsvarar de körningsförhållanden som visas ovan (tabell 2).

LightCycler®-analyspaket:	1013_HFE_96
Detektionsformat:	FAM (494/523)
	FAM + LC RED 640 (494/636)

Spara LCAP-filen i analysmappen för SFTP- eller USB-enheten.

Importera och installera den nedladdade LCAP på LightCycler® PRO-instrumentet och aktivera den.

Skapa eller importera en plattinställning på fliken Plates (Plattor).

6. Experimentprotokoll

Programmera instrumentet innan lösningarna bereds (se 5. Programmering och läs användarhandboken för mer information).

Analysens beskrivna prestanda kan endast garanteras när den används med Roche Diagnostics LightCycler®-system eller cobas z 480 Analyzer.

6.1 Provberedning

För beredning av genomiskt DNA använd humant perifert blod (EDTA, citrat). Det rekommenderas starkt att heparin undviks då detta antikoaguleringsmedel kan interferera med PCR.

Utför rening av nukleinsyra med hjälp av High Pure PCR Template Preparation Kit eller MagNA Pure-instrumenten med de extraktionskit som gäller för det MagNA Pure-instrument som används (se 2. Ytterligare enheter och reagenser) enligt beskrivningen i respektive protokoll.

6.2 Reagensberedning

6.2.1 Beredning av parameterspecifika reagenser (PSR)

►	Varje PSR -rör räcker till 32 reaktioner.
1	Snurra det förblandade PSR -provröret vid 10 000 RPM i 1 minut.
2	Kontrollera att pelleten är placerad i botten.
3	Tillsätt 66 µl vatten av PCR-kvalitet till PSR -röret.
4	Inkubera i 20 sekunder vid rumstemperatur.
5	Vortexblanda i 10 sek.
6	Snurra rören för att samla upp dropparna.

- Använd 2 µl **PSR** för en 20 µl PCR-reaktion.

6.2.2 Beredning av standarder

►	Varje standardreagensrör räcker till 32 reaktioner.
1	Snurra de tre provrören vid 10 000 RPM i 1 minut.
2	Kontrollera att den blå pelleten är längst ned i röret.
3	Lös upp pelleten genom att tillsätta 160 µl vatten av PCR-kvalitet.
4	Inkubera i 20 sekunder vid rumstemperatur.
5	Vortexblanda i 10 sek.
6	Snurra rören för att samla upp dropparna.

- Använd **5 µl** av varje **standard** för en 20 µl PCR-reaktion.
- Alla tre **standarderna** måste användas i varje körning. För LightCycler® PRO är även kombinationen av de tre standarderna obligatorisk.

Observera: Om du öppnar injektionsflaskorna kan det förorena arbetsutrymmet (aerosolen).

6.2.3 Beredning av standarder för genotypbestämning

LightCycler®-programvaruversion 4.05 och senare (kapillärbaserade instrument) och programvaruversion 1.5 och senare (LightCycler® 480-instrument) och programvaruversion 1.X.X (LightCycler® PRO) kan kalibreras med referensstandarder för att utföra en automatiserad genotypbestämning av okända kliniska prover

►	Genotypstandarder måste genereras genom att blanda standarderna enligt följande:
	Bered 3 rena provrör och märk dem som 5, 6 och 7
Rör 5	Blanda 5 µl av Standard 1 med 5 µl av Standard 3
	Genotyp för p.C282Y och p.S65C
Rör 6	Blanda 5 µl av Standard 1 med 5 µl av Standard 2
	Genotyp för p.C282Y och p.H63D
Rör 7	Blanda 5 µl av Standard 2 med 5 µl av Standard 3
	Genotyp för 65C/63D

- Använd **5 µl** av genotypstandarder (rör 5–7) för en PCR-reaktion på 20 µl
- Alla tre genotypstandarderna måste användas i den första körningen av kitet för att kalibrera genotypmodulen. För LightCycler® PRO är kombinationen av de tre genotypstandarderna obligatorisk för varje körning

Observera: Om du öppnar injektionsflaskorna kan det förorena arbetsutrymmet (aerosolen).

6.3 Beredning av reaktionsblandningen

6.3.1 Beredning av 32 LightCycler® reaktionsblandning

Vi rekommenderar att du förbereder 32 reaktioner för att förhindra förvaring av upplösta eller aktiverade reagenser i olika volymer (6.2). Se kapitel 6.4 för förvaring och stabilitet av upplösta komponenter. För beredning av reaktionsblandningen för färre prover, gå till steg 6.3.2 "Reaktionsblandning för enstaka reaktion".

Bered reaktionsblandningen i PSR-röret (kyld):

Komponenter	32 reaktioner
Till PSR -röret (rött lock)	66,0 µl
Lägg till:	
H ₂ O, PCR-kvalitet (färglöst lock)	310,2 µl
MgCl ₂ -lösning 25 mM (blått lock)	52,8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (rött lock)	66,0 µl
 Substitut för "locket för lång hals" för PSR -röret med det röda locket från FastStart	
Total volym	495,0 µl

Tabell 3: Volymer av komponenter för beredning av 32 reaktionsblandningar

6.3.2 Beredning av den enskilda LightCycler® reaktionsblandningen

Bered reaktionsblandningen genom att multiplicera varje volym (tabell 4) med antalet biologiska prover som ska analyseras plus fem reaktioner (**NTC**, tre **standarder**, ett överskott) och (valfritt) tre **genotypstandarder**. För LightCycler® PRO är **alla standarder, genotypstandarder och NTC** obligatoriska för **varje** körning.

Förbered reaktionsblandningen i en kyld flaska:

Komponenter	Enkel reaktion
H ₂ O, PCR-kvalitet (färglöst lock)	9,4 µl
MgCl ₂ -lösning 25 mM (blått lock)	1,6 µl
PSR (rött lock), se 6.2.1	2,0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (rött lock)	2,0 µl
Reaktionsblandningens volym	15,0 µl

Tabell 4: Volym av komponenter för beredning av en reaktionsblandning



**Pipettera försiktigt reaktionsblandningen uppåt och nedåt.
En stor andel av alla misslyckade försök beror på
en icke homogen reaktionsblandning!**



6.3.3 Kapillär-/brunnsladdningsprocedur

Varje körning måste innehålla en **NTC** för att visa frånvaro av kontaminering med genomiskt DNA eller HFE-PCR-produkt och tre standarder för att identifiera körningsspecifika smälttemperaturer. Tillsynsmyndigheter eller lokala laboratorieregler kan kräva att även de tre genotypstandarderna inkluderas.

Kapillär-/brunnsladdningsprocedur

►	Kom ihåg att inkludera kontrollerna när du ställer in körningen.
1	Blanda försiktigt, centrifugera ner och kontrollera att det inte finns några luftbubblor i reaktionsblandningsflaskan.
2	Dispensera 15 µl per kapillär-/brunnreaktionsblandning
3	Obligatoriskt: Tillsätt 5 µl H₂O av PCR-kvalitet som NTC i position 1 (A1). Tillsätt 5 µl av Standard 1 i position 2 (A2). Tillsätt 5 µl av Standard 2 i position 3 (A3). Tillsätt 5 µl av Standard 3 i position 4 (A4). Valfritt (obligatoriskt för LightCycler®PRO): Tillsätt 5 µl av Rör 5 genotypstandard i position 5 (A5). Tillsätt 5 µl av Rör 6 genotypstandard i position 6 (A6). Tillsätt 5 µl av Rör 7 genotypstandard i position 7 (A7).
4	Tillsätt 5 µl av provet i de återstående kapillärerna/brunnarna.
5	Stäng kapillären/plattan och centrifugera.
⚠	Kontrollera att det inte finns några luftbubblor.
6	Placera rotorn/plattan i instrumentet.
7	Endast kapillärbaserade användare: ange antal prover.
8	Starta körningen.
9	Ange experimentnamn när detta efterfrågas.
10	Spara provdata i provfönstret.

6.4 Förvaring och stabilitet av upplösta komponenter

Reaktionsblandning

Hela reaktionsblandningen som innehåller parameterspecifika reagenser (PSR), LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe och MgCl₂ kan förvaras i kylskåp (2 °C–8 °C) i upp till 30 dagar.

Undvik långvarig ljusexponering.

Parameterspecifika reagenser (PSR)

Upplöst PSR är stabil i upp till 30 dagar vid förvaring i kylskåp (2 °C–8 °C).

Undvik långvarig ljusexponering.

Positiva kontroller och genotypstandarder

De upplösta positiva kontrollerna och genotypstandarderna är stabila i upp till 30 dagar vid förvaring i kylskåp (2 °C–8 °C).

6.5 Laddning av kontroller och genotypstandarder

Prover i position 1 till 4 måste fyllas i varje körning enligt beskrivningen i tabellen nedan. Prover i position 5 till 7 krävs endast för inläring av genotypstandarder i den första körningen av kitet.



Genotypresultaten baseras på smälttemperaturer. Användning av modulen för automatiserad genotypbestämning som finns i programvaran LightCycler® 2.0 och LightCycler® 480 är valfri, men är obligatorisk för LightCycler®PRO.

Mer information finns i användarhandboken för LightCycler®.

6.5.1 Kapillärbaserade instrument

I "Samples Data – Capillary View" (Provdata – Visa kapillärer) skiver du in provnamnet enligt beskrivningen i den andra kolumnen. Välj "Analysis Type - Genotyping" (Analystyp - Genotyp). Välj endast Kanal 530 och 640! I listrutan väljer du "Sample Type" (Provtyp) och kopierar beskrivningen för "Genotyp".

Pos.	Prov Namn	Kanal	Mål Namn	Prov Typ	Genotyp (aminosyror)
1	NTC	530	Mål 1	NTC	
		640	Mål 4	NTC	
2	Standard 1	530	Mål 1	Smältstandard	HFE 63H 65S vildtyp
		640	Mål 4	Smältstandard	HFE 282Y-mutation
3	Standard 2	530	Mål 1	Smältstandard	HFE 63D-mutation
		640	Mål 4	Smältstandard	HFE 282C vildtyp
4	Standard 3	530	Mål 1	Smältstandard	HFE 65C-mutation
		640	Mål 4	Okänd	
5	Rör 5	530	Mål 1	Smältstandard	HFE 65 S/C heterozygot
		640	Mål 4	Smältstandard	HFE 282 C/Y heterozygot
6	Rör 6	530	Mål 1	Smältstandard	HFE 63 H/D heterozygot
		640	Mål 4	Okänd	
7	Rör 7	530	Mål 1	Smältstandard	HFE 65C/63D heterozygot
		640	Mål 4	Okänd	

6.5.2 LightCycler® 480-instrument

Välj "Melt Geno" (Smältgenotyp) i avsnittet "Step 1: Select Workflow" (Steg 1: Välj arbetsflöde) i fönstret "Sample Editor" (Provredigerare). Ange beskrivningen av **standarder** och **genotypstandarder** enligt följande:

Pos	Filter-kombination	Prov Namn	Smältgenotyp, provtyp	Smältgenotyp, genotyp
1	Fluos (465–510)	NTC	NTC	
	RED 640 (498–640)	NTC	NTC	
2	Fluos (465–510)	Standard 1	Smältstandard	HFE 63H 65S vildtyp
2	RED 640 (498–640)	Standard 1	Smältstandard	HFE 282Y-mutation
3	Fluos (465–510)	Standard 2	Smältstandard	HFE 63D-mutation
3	RED 640 (498–640)	Standard 2	Smältstandard	HFE 282C vildtyp
4	Fluos (465–510)	Standard 3	Smältstandard	HFE 65C-mutation
4	RED 640 (498–640)	Standard 3	Okänd	
5	Fluos (465–510)	Rör 5	Smältstandard	HFE 65 S/C heterozygot
5	RED 640 (498–640)	Rör 5	Smältstandard	HFE 282 C/Y heterozygot
6	Fluos (465–510)	Rör 6	Smältstandard	HFE 63 H/D heterozygot
6	RED 640 (498–640)	Rör 6	Okänd	
7	Fluos (465–510)	Rör 7	Smältstandard	HFE 65C/63D heterozygot
7	RED 640 (498–640)	Rör 7	Okänd	

Använd kanal 498–645 i stället för 498–640 för cobas z 480 Analyser.

6.5.3 LightCycler® PRO-instrument

I plattinställningarna måste matchande LCAP väljas. Smältstandarder och NTC måste tilldelas till tillhörande brunnposition.

Prov-ID	Provroll	Kanal	Genotyp/målnamn
1013_HFE_NTC	NTC	FAM	e/t
		LC Red640	
Standard 1	Smältstandard	FAM	H63 S65/H63 S65
		LC Red640	282Y/282Y
Standard 2	Smältstandard	FAM	63D S65/63D S65
		LC Red640	C282/C282
Standard 3	Smältstandard	FAM	H63 65C/H63 65C
		LC Red640	-
Standard 1+2	Smältstandard	FAM	H63 S65/63D S65
		LC Red640	C282/282Y
Standard 1+3	Smältstandard	FAM	H63 S65/H63 65C
		LC Red640	-
Standard 2+3	Smältstandard	FAM	63D S65/H63 65C
		LC Red640	-

Körningsprofilnamn: Simple Probe (Enkel nål) 530–640

7. Dataanalys och tolkning

7.1 Kalibrering

Kalibrera enligt beskrivningen i avsnitten 6.3.3, 6.5, 7.2.2 och 7.2.3.

7.2 Kvalitetskontroll – Godkännandekriterier

För att kunna utföra en tillförlitlig genotypanalys är det viktigt att **NTC** och alla tre **standards** ingår i varje körning. För LightCycler® PRO är dessutom alla tre genotypstandarderna obligatoriska.

ANMÄRKNING: Testet utförs vid en glödgningsstemperatur på 60 °C där nålarna inte binder väl, vilket ger låga eller inga signaler i "kvantifiering". Godkännandekriterierna baseras därför endast på definitionen av smältningskurvans mönster enligt beskrivningen nedan.

7.2.1 Kontroll utan mall

NTC (obligatoriskt, position 1).

Smältkurvsanalys av NTC måste ge ett negativt resultat: inga analyspecifika smälttoppar (se 7.2.2) får påvisas.

Om en eller flera specifika toppar rapporteras av **NTC** har det inträffat en kontaminering eller ett pipetteringsfel. Sessionen är inte giltig och proceduren måste upprepas. Byt vatten och/eller reagenser och upprepa om problemet kvarstår.

I detta fall – för att möjliggöra automatisk genotypbestämning – ska NTC-provet ändras från "No Template Control" (Kontroll utan mall) till "Unknown" (Okänd) (se punkt 6.5). Alternativt ska resultaten avläsas från smälttemperaturerna (se punkt 7.5). Ej tillämpligt med LightCycler® PRO-instrument.

7.2.2 Standarder (positiva kontroller)

Smältkurvsanalys ska alltid visa

HFE **Standard 1** (obligatoriskt, position 2).

en smälttopp i kanal 530

en smälttopp i kanal 640

HFE **Standard 2** (obligatoriskt, position 3).

en smälttopp i kanal 530

en smälttopp i kanal 640

HFE **Standard 3** (obligatoriskt, position 4).

en smälttopp i kanal 530

en smälttopp i kanal 640

De medföljande **standarderna** efterliknar **homozygota** kliniska prover.

Se 7.5 Tolkning av resultaten för förväntade smälttemperaturer.

7.2.3 Genotypstandard

Obligatoriskt vid användning med LightCycler® PRO. Smältkurvsanalys ska alltid visa:

Rör 5 Genotypstandard (valfritt, position 5).

två smälttoppar i kanal 530

två smälttoppar i kanal 640

Rör 6 Genotypstandard (valfritt, position 6).

två smälttoppar i kanal 530

två smälttoppar i kanal 640

Rör 7 Genotypstandard (valfritt, position 7).

två smälttoppar i kanal 530

en smälttopp i kanal 640

Genotypstandarder efterliknar **heterozygota** kliniska prover.

Se **7.5 Tolkning av resultaten** för förväntade smälttemperaturer.



Innan du upprepar en körning bör du beakta vanliga fel. Kontrollera i synnerhet amplifieringsprofilen, korrigera master-mix och MgCl₂-koncentration som använts och kom ihåg att otillräcklig förvaring av reagenser också kan orsaka fel på enheten.

7.2.4 Prover

Resultatet av analysen måste alltid visa en eller två smälttoppar för varje kanal. Se 7.5 Tolkning av resultat **förväntade smälttemperaturer**.



Högst två toppar per prov förväntas i kanal 530.

Smälttoppprofilerna ska överensstämja med de godkännandekriterier beskrivs i detta kapitel och i **7.5 Tolkning av resultaten**. Se även **7.5.1 Problematiske profiler** och **7.6 Sällsynta varianter**.

7.2.5 Onormala smältningskurvor

En oväntad smältkurva kan bero på en felaktig provberedning, ett fel i produkten eller en variant under nålens bindningsregion. Hela proceduren måste upprepas (provberedning, amplifiering och detektion). Om en onormal smältkurva kvarstår måste en annan metod användas för att identifiera sekvensen.

Skicka avvikande smältprover till TIB Molbiol GmbH, Berlin-laboratorierna för produktförbättring och övervakning efter försäljning. Kontakta service@tib-molbiol.de innan du skickar. Exempel på kända varianter anges i punkt 7.7. Sällsynta varianter.

7.3 Spara externa genotypstandarder

(Gäller inte LC1.x-programvaruversioner under 4.0, LightCycler® 96 och LightCycler® PRO-instrument).

Om prover från 1 till 7 efter genotypanalysen uppfyller godkännandekriterierna (se **7.3 Kvalitetskontroll – Godkännandekriterier**), spara genotypstandarderna enligt följande och använd extern standard i alla efterföljande körningar.

7.3.1 Kapillärbaserade instrument

I fönstret "Melting Curve Analysis – Genotyping" (Smältkurvsanalys – Genotyp) öppnar du menyn "Standard (Int)" (Standard (intern)) och väljer "Save standards as External" (Spara standarder som externa).

7.3.2 LightCycler® 480 -instrument

I fönstret "Melt Curve Genotyping Analysis" (Genotypanalys av smältkurva) öppnar du menyn "Standards (In-Run)" (Standard (inom körning)) och väljer "Save as ext" (Spara som extern).

7.3.3 LightCycler® PRO -instrument

Genotypstandarder ska användas i **varje** körning.

7.4 Läsa av resultaten

Utför dataanalys enligt beskrivningen i instrumentets användarhandböcker.

7.4.1 Smältanalys: kapillärbaserade instrument

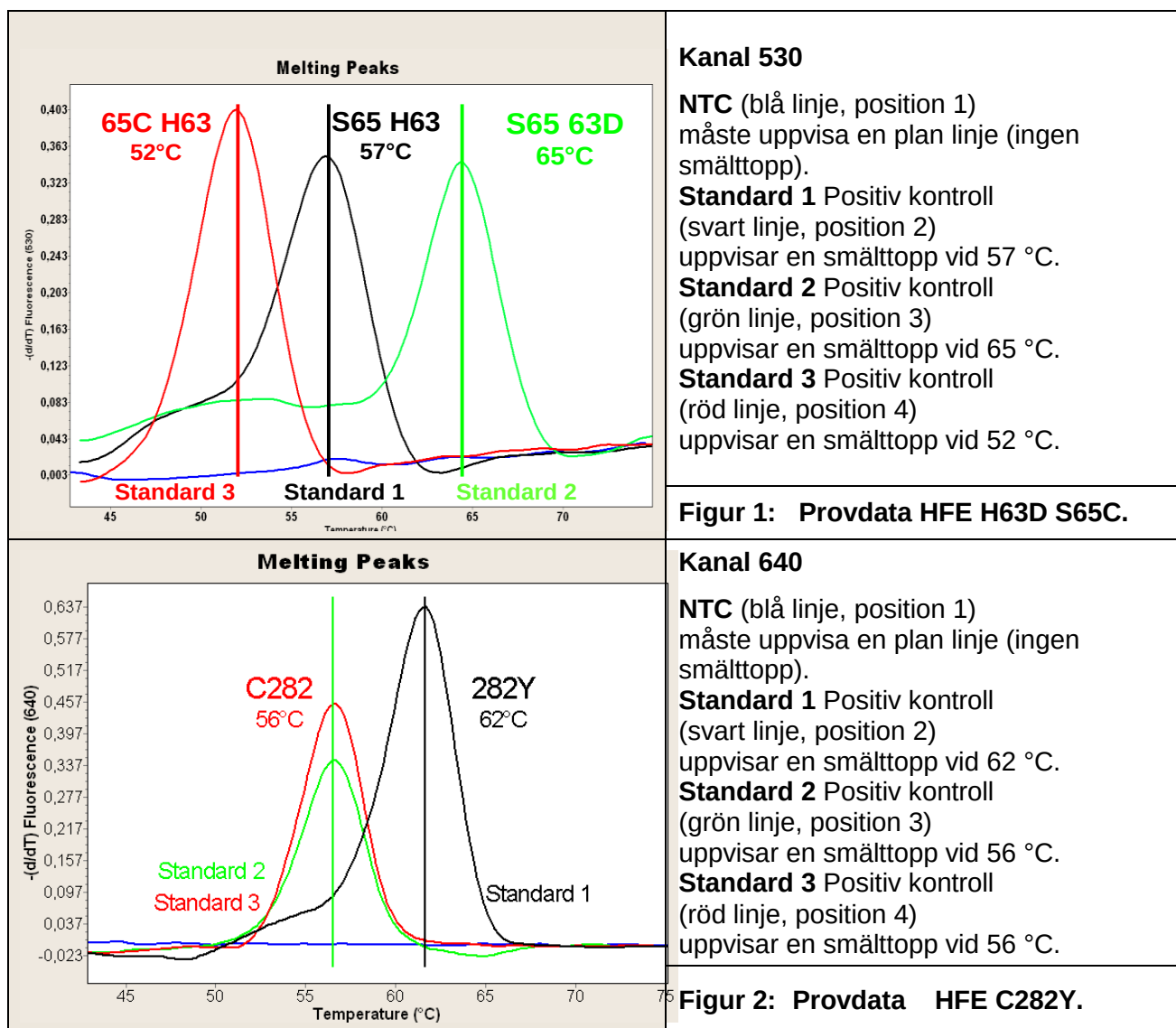
Smältkurvans toppar (fig. 1 och 2) visar homozygota genotyper.

⚠Aktivera färgkompensationen för att undvika felaktiga resultat.

Visa **HFE H63D S65C C282Y**-data för smältning enligt följande:

LC 2.0-instrument (eller LC1.x med programvaruversion 4.1):

Visa smältdata för HFE H63D S65C i kanal 530 (fig. 1) och C282Y i kanal 640 (fig. 2). Analystyp "Melting Curve Analysis – Genotyping" (Smältkurvsanalys – Genotyp).



Observera: Värdena för smälttemperaturerna kan variera $\pm 2,5$ °C mellan olika experiment.

ΔT mellan smälttopparna för heterozygota genotyper kan variera $\pm 1,5$ °C.

Vid variation, se anvisningarna: **7.3.5 Onormala smältningsskurvor** och **7.7.3 Sällsynta varianter**.

Vid låga signaler i kanal 530 kan antalet cykler ökas upp till 50 cykler.

Vid fel i modulen för automatisk genotypbestämning (poäng $< 0,6$ eller res $< 0,4$) ska du byta till manuell avläsning (Tm Calling) och jämföra med tabell 5.1 och 5.2 (7.5 Tolkning av resultaten).

7.4.2 Smältanalys: LightCycler® 480-instrument

Smältkurvans toppar (fig. 3 och 4) visar homozygota genotyper.

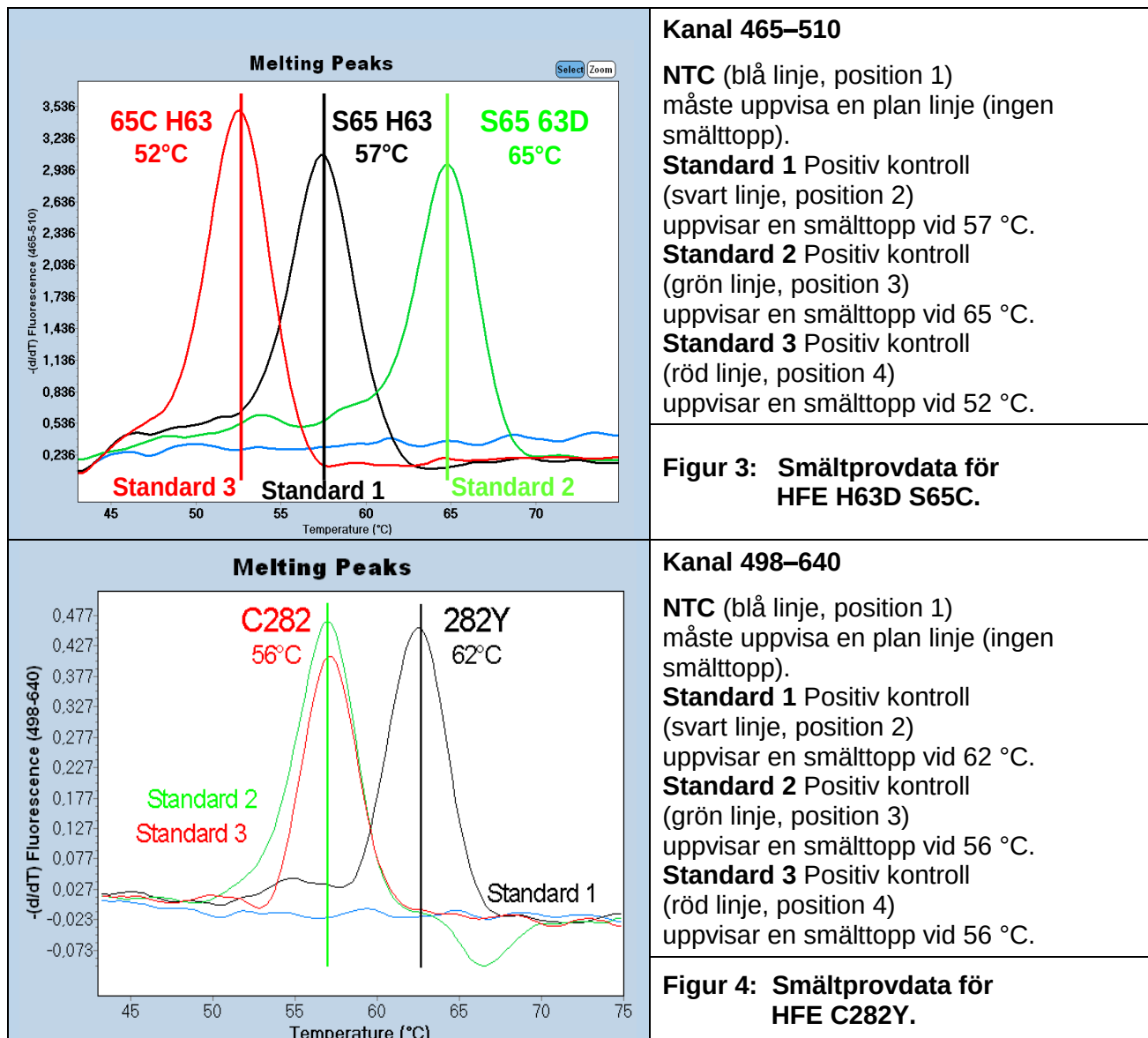
⚠ Aktivera färgkompensationen för att undvika felaktiga resultat.

Visa data för smältning enligt följande:

Vid användning i LightCycler® 480-instrumentet, visa HFE H63D S65C-smältdata i kanal 483–533 och HFE C282Y i kanal 483–640, läget "Melt Curve Genotyping" (Genotypbestämning med smältkurva).

Vid användning i LightCycler® 480 II-instrumentet, visa HFE H63D S65C-smältdata i kanal 465–510 (figur 3) och HFE C282Y i kanal 498–640 (figur 4), läget "Melt Curve Genotyping" (Genotypbestämning med smältkurva).

Vid användning i cobas z 480 Analyser ska du visa HFE H63D S65C-smältdata i kanal 465–510 och HFE C282Y i kanal 498–645. Analystyp, läget "Melt Curve Genotyping" (Genotypbestämning med smältkurva).



Observera: Värdena för smälttemperaturerna kan variera $\pm 2,5$ °C mellan olika experiment.

ΔT mellan smälttopparna för heterozygota genotyper kan variera $\pm 1,5$ °C.

Vid variation, se anvisningarna: **7.6 Sällsynta varianter.**

Vid låga signaler i kanal 530 kan antalet cykler ökas upp till 50 cykler.



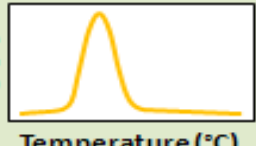
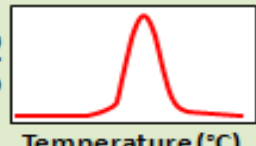
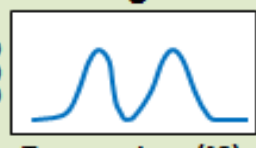
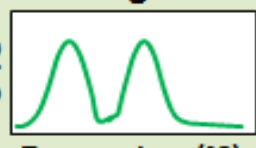
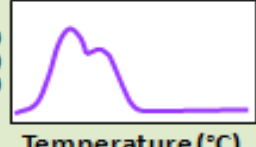
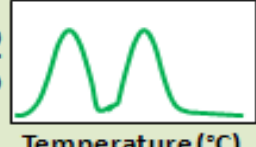
Vid fel i modulen för automatisk genotypbestämning (poäng < 0,6 eller res < 0,4) ska du byta till manuell identifiering av smältningskurva (T_m Calling) och jämföra resultaten med tabell 5.1 och 5.2 (7.5 Tolkning av resultaten).

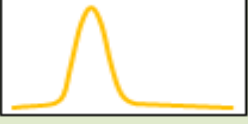
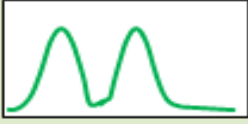
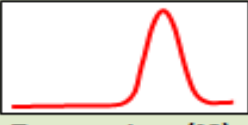
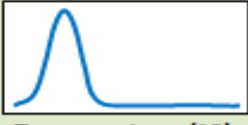
7.4.3 Smältanalys: LightCycler® PRO-instrument

Utför dataanalys enligt beskrivningen i användarassistansen för LightCycler® PRO System. Granska och godkänn resultaten på fliken Target Results (Målresultat). Det är nödvändigt att godkänna resultaten av **standards**, **genotypstandards** och **NTC** innan resultaten av okända prover godkänns. Det är möjligt att skriva över resultat, överskrivna resultat kommer att flaggas. Godkända resultat kan släppas på fliken Sample Results (Provresultat). Vid låga signaler i kanalen FAM kan antalet cykler inte ökas.

7.5. Tolkning av resultaten

- 1) Börja läsa av resultaten i kanal 640 och identifiera alla **högriskindivider** med den homozygota **282 Y/Y**-mutationen (enstaka högsnältande topp) [1].
Obs! Homozygota 282Y/Y-prover måste vara 63 His vildtyp (se kanal 530).
- 2) I kanal 640, välj alla individer med heterozygot **282 H/Y** och analysera dem i kanal 530 för att identifiera **63 H/D** individer som har en **låg risk** [2].
Rapportera återstående heterozygot 282 H/Y som antingen är **63 H/H** och **65 S/S** eller **65S/C** som "no risk" (ingen risk, allmän populationsrisk) [3,4].
Obs! Prover med heterozygot 282 H/Y kan inte vara 63 D/D eller 65 C/C eller 63 D/65 C.
- 3) Läs kanal 530 för att välja alla individer med en enda hög smälttopp som är homozygot **63 D/D** (**lindrig form**) [5]
Obs! Homozygota 63 D/D-prover är vanligen vildtyper i kanal 640. Se ref. 11.

Kanal 530			Kanal 640		Vanligt namn	Sjukdom
63H 65C	63H 65S	63D 65S	C282	282Y	HFE-genotyp	risk
Melting Peaks  530 Temperature (°C)			Melting Peaks  640 Temperature (°C)		282Y homozygot H63 S65 H63 S65 282Y 282Y	[1] Hög risk
-	57	-	-	62		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)			Melting Peaks  640 Temperature (°C)		H63D heterozygot C282Y heterozygot Sammansatt heterozygot H63 S65 63D S65 C282 282Y	[2] Låg risk
-	57	65	56	62		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)			Melting Peaks  640 Temperature (°C)		S65C heterozygot C282Y heterozygot Sammansatt heterozygot H63 S65 H63 65C C282 282Y	[3] Förmodad ökad risk (omtvistad)
52	57	-	56	62		

Melting Peaks 530  Temperature (°C) - 57 -			Melting Peaks 640  Temperature (°C) 56 62		C282Y heterozygot H63 S65 H63 S65 C282 282Y	[4] Allmän populations- risk
Melting Peaks 530  Temperature (°C) - - 65			Melting Peaks 640  Temperature (°C) 56 -		63D homozygot 63D S65 63D S65 C282 C282	[5] Lindrig form
ΔTm 5 °C ΔTm 8 °C ΔTm 13 °C			ΔTm 6 °C		Tabell 5.1: HFE 282 och sjukdomsriskvarianter Se även 7.3.4 och 7.3.5	

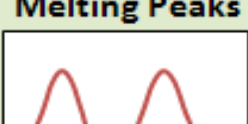
4) Rapportera status för alla återstående **282 C/C-patienter (vildtyp)** för deras smältprofilkanal 530 som **"no risk"** (ingen risk, allmän populationsrisk) [6–10].

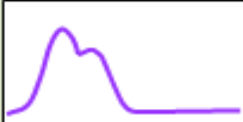
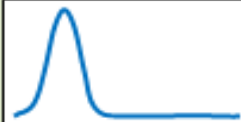
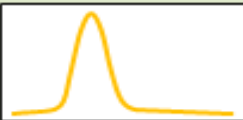
Anmärkning: 65 S/C heterozygot får endast ha en axel istället för en separerad topp vid temperaturen under 63 H. Formen på kurvorna för alla varianter är signifikant vid ögonundersökning eftersom den kan kallas fel av instrumentets mjukvara, oavsett om "Genotyping"-modulen eller "Tm Calling"-programmet används.

Observera: Värdena för smälttemperaturerna (Tm) kan variera ±2.5 °C mellan körningarna.

The ΔT för smälttopparna för heterozygota genotyper kan variera ±1,5 °C.

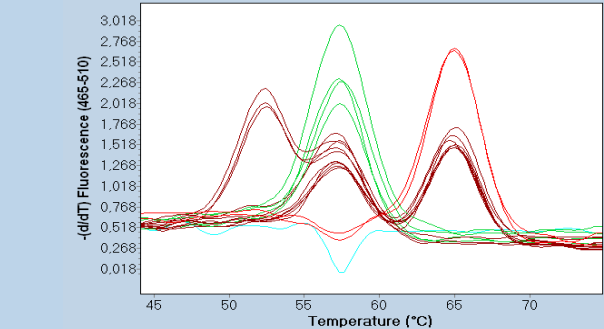
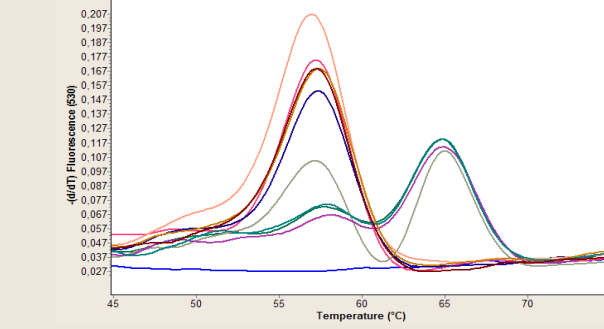
Om topparna i kanal 530 är låga, överväg att köra upp till 50 cykler.

Kanal 530			Kanal 640		Vanligt namn	Sjukdom
63H 65C	63H 65S	63D 65S	C282	282Y	HFE-genotyp	risk
Melting Peaks 530  Temperature (°C) 52 - 65			Melting Peaks 640  Temperature (°C) 56 -		65C / 63D heterozygot Sammanfatt heterozygot H63 65C 63D S65 C282 C282	[6] Allmän populations- risk
Melting Peaks 530  Temperature (°C) - 57 65			Melting Peaks 640  Temperature (°C) 56 -		H63D heterozygot H63 S65 63D S65 C282 C282	[7] Allmän populations- risk
Melting Peaks 530  Temperature (°C) 52 - -			Melting Peaks 640  Temperature (°C) 56 -		65C homozygot H63 65C H63 65C C282 C282	[8] Allmän populations- risk

Melting Peaks  530 Temperature (°C)			Melting Peaks  640 Temperature (°C)		S65C heterozygot H63 S65 H63 65C C282 C282	[9] Allmän populations- risk
52	57	-	56	-		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)			Melting Peaks  640 Temperature (°C)		Vildtyp H63 S65 H63 S65 C282 C282	[10] Allmän populations- risk
-	57	-	56	-		
ΔTm 5 °C		ΔTm 8 °C	ΔTm 6 °C		Tabell 5.2: C282 med vanliga 63/65-varianter Se även 7.3.4 och 7.3.5	
ΔTm 13 °C						

7.5.1 Tolkning av problematiska profiler

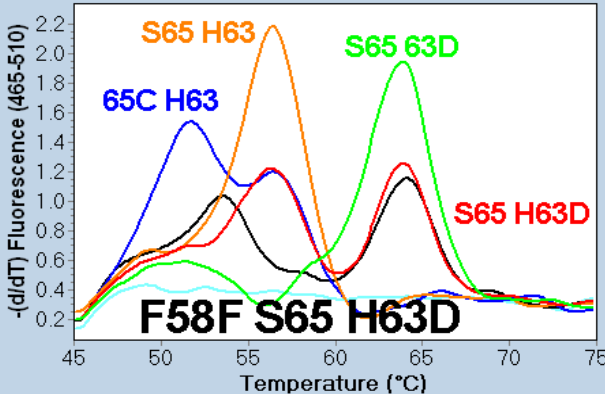
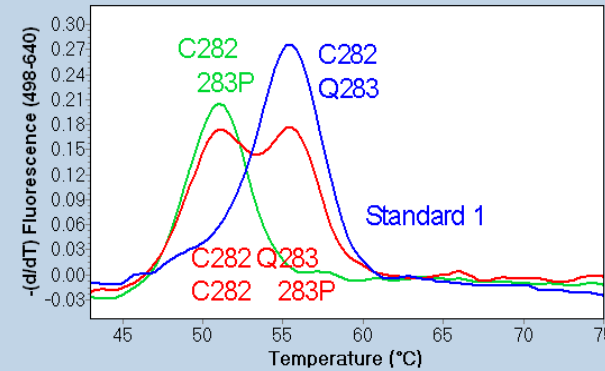
I figurerna nedan visas smälttoppprofiler från kliniska prover.

	Instrument: LC480 II
	Kanal 465–510 NTC (ljusblå linje): kontrollen utan mall kan visa en onormal negativ topp utan att detta påverkar den automatiska identifieringen av andra prover.
Figur 5 Smälttoppar HFE H63D S65C.	
	Instrument: LC2.0
	Kanal 530 Formen på kurvan kan påverkas av allelens tillstånd i den andra kanalen utan att det stör korrekt tolkning. De gröna eller violetta och grå kurvorna uppvisar två toppar (57 °C och 65 °C) och måste, trots kurvans olika form, tolkas som heterozygota
Figur 6 Smälttoppar HFE H63D S65C.	

7.6 Sällsynta varianter

Sekvenserna som används i denna enhet interfererar inte med andra kända genvarianter. Nya varianter genererar vanligen en annan Tm-topp än WT eller MT. För att visa analysens förmåga att urskilja den korrekta genotypen används syntetiska mål för att efterlikna alla varianter som rapporterats i GeneBank (november 2023). De absoluta Tm-värden som erhållits med syntetiska mål kan skilja sig från de som erhållits från biologiska prover, medan det **relativa ΔT_m -värdet måste förbli konstant**.

Detta kit är inte avsett att identifiera andra varianter än de som anges i avsnitt **1.3 Specifikationer**. En annan metod ska användas för att identifiera sekvenser med onormala smälttoppar.

Melting Peaks 	Instrument: LC480II Exon 2: Kanal 465–510 Den tysta mutationen g.8658C>T p.F58F (rs147297176) observerades under 2012 för en patient med en smälttopp vid 54 °C – vilket är mellan S65 H63 (vildtyp) och 65C H63. Patienten var g.8658C>T heterozygot (svart linje, vänster topp) kombinerad med 63D.¹⁰ Vid tidpunkten för observation (2013) registrerades inte denna polymorfism i dbSNP hos NCBI. Ingen referensstandard medföljer kitet. Figur 7 Smälttoppar för HFE F58F.
Melting Peaks 	Instrument: LC480II Exon 4: Kanal 498–640 Variant p.T281M (rs915273578) genererar en Tm vid 47 °C (visas ej), publicerad av Biasiotto et al, 2008¹² Variant p.Q283P (rs111033563) genererar en Tm vid 51 °C (grön), publicerad av Ka et al. 2005⁹ 282C 283Q/282C 283Q (vildtyp, blå) 56 °C 282C 283Q/282C 283P (röd) 56 °C/51 °C. 282C 283P/282C 283P (grön) 51 °C Inga referensstandarder medföljer kitet. Figur 8: Smälttoppar för HFE Q283P.

8. Felsökning

Instrument	Kapillärbaserade instrument	LightCycler® 480 och PRO-instrument
Händelse	Möjlig orsak	Lösning
Inget prov detekterat	Ingen centrifugering	Kapillärcentrifug
Alla PCR	Felaktigt val av detektionskanal	Ställ in rätt kanal före analys
	Felaktigt amplifieringsprotokoll	Kontrollera instrumentprogrammet
Låga 530-signal	HFE 63/65-fragmentet har känd lägre PCR-effektivitet	Kör fler PCR-cykler. Upp till 50 cykler har utvärderats/ger samma resultat
Inkonsekvent baslinje bland olika prover	Felaktig pipettering	Säkerställ homogenitet hos blandningsmängden i varje prov
	Icke-homogen reaktionsblandning	Pipettera reaktionsblandningen uppåt och nedåt 10 x med en ren 200 µl spets före distribution i reaktionskärlet
	Felförseglad flerbrunnspatta	Kontrollera att flerbrunnspattan är ordentligt förseglad
Baslinje "Sågtandslik"	Bubbla i brunn	Centrifugera plattan före körning
	Felaktig placering av kapillären i karusellen	Tryck in kapillären ordentligt i karusellen
Ingen signal i Positiv kontroll	Fel vid inställning av instrumentet	Kontrollera positionsinställningarna för den positiva kontrollen
	Felaktig PSR/MgCl ₂ -koncentration	Upprepa analysen
	Positiv kontroll eller standardnedbrytning	Använd en ny aliquot av positiv kontroll eller standard
Positiv signal i No Template Control NTC	Fel vid inställning av instrumentet	Kontrollera positionsinställningarna för NTC
	Dispenseringsfel	Följ arbetsbladet vid dispenserering av prover, NTC, positiva kontroller och standarder
	Dispenseringsfel	Byt alltid spetsar mellan prover
	Dispenseringsfel	Undvik att spilla ut innehållet i provröret
	Kontaminering av vatten av PCR-kvalitet.	Använd en ny aliquot av vatten av PCR-kvalitet
	Kontaminering av reaktionsblandningen	Använd nya aliquoter av reagenser för att bereda reaktionsblandningen
	Kontaminering av extraktions-/beredningsområde för amplifieringsreaktioner	Rengör ytor och instrument med vattenbaserade rengöringsmedel, tvätta labbrockar och ersätt provrör och spetsar som använts
	Kontaminering av extraktions-/beredningsområde för amplifieringsreaktioner	Tillsätt LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase (art.nr 03 539 806 001) till reaktionsblandningen enligt anvisningarna
Ingen signal i prover	Låg DNA-mängd	Kontrollera DNA-koncentration
	Provhämning	Späd provet och upprepa PCR, eller upprepa extraktion och PCR, eller lägg till positiv kontroll och upprepa
Smältkurva utanför det förväntade temperaturintervallet	Med T _m -toppar som överensstämmer med positiv kontroll: Felaktig reagenskoncentration	Tilldela resultat manuellt i enlighet med positiv kontroll
	Med T _m -toppar som inte överensstämmer med positiv kontroll: Möjlig extraktionshämmare	Upprepa analysen och späd DNA 1:3
	Med T _m -toppar som inte överensstämmer med positiv kontroll: Möjlig annan mutation	Upprepa analysen genom sekvensering och rapportera oväntad variant till service@tib-molbiol.de

9. Referenser

1) Feder et al., 1996

A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis

Nature Genet. 13: 399-408

2) Willis, G., Wimperis, J.Z., Lonsdale, R., Fellows, I.W., Watson, M. A., Skipper, L.M., Jennings, B.A. 2000

Incidence of liver disease in people with HFE mutations

Gut Mar; 46(3):401-404

3) Edwards, C.Q., Cartwright, G. E., Skolnick, M. H., Amos, D. B. 1980

Homozygosity for hemochromatosis: clinical manifestations

Ann Intern Med Okt; 93 (4):519-525

4) Pietrangelo, A.

Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease

N Engl J Med. 2004 3 juni;350(23):2383-97

5) McDermott, J. H., Walsh, C.H. 2005

Hypogonadism in hereditary hemochromatosis

J Clin Endocrinol Metab Apr; 90(4):2451-2455

6) Franchini, M.

Hereditary iron overload: pathophysiology, diagnosis, and treatment

Am J Hematol. 2006 Mar;81(3):202-9

7) Mangasser-Stephan, K., Tag. C., Reiser, A. och Gressner, A.M. 1999

Rapid Genotyping of HFE Gene Mutations with Hybridization Probes

Clinical Chemistry 45:10, 1875-1878

8) Bollhalder, M., Mura, C., Landt, O., Maly, F.E. 1999

LightCycler PCR Assay for Simultaneous Detection of the H63D and S65C Mutations in HFE Based on Opposite Melting Temperature Shifts

Clinical Chemistry 45, nr 12

9) Ka, C., Le Gac, G., Dupradeau, F.Y., Rochette, J., Ferec, C. 2005

The Q283P amino-acid change in HFE leads to structural and functional consequences similar to those described for mutated 282Y HFE protein

Hum Genet 117: 467-475

10) Variant observerad september 2012 i Dublin, ej publicerad

11) Best LG, Harris PE, and Spriggs EL.

Hemochromatosis mutations C282Y and H63D in 'cis' phase.

Clin Genet. 2001 jul;60(1):68-72.

12) Biasiotto G. et al.

HFE mutations in a population of Italian Parkinson's disease patients. *Parkinsonism*

Relat Disord. 2008;14(5):426-30

Meddelande till köparen – Patent och varumärken

LightMix® Kit HFE säljs med licens från Roche Diagnostics. Köpet av den föreliggande produkten ger rätt att använda den för att utföra amplifiering och detektion av nukleinsyrasekvenser för *in vitro*-diagnostiskt ändamål på prover av humant ursprung. Ingen annan typ av licens överförs förutom rätten att använda den föreliggande produkten som härrör från dess inköp.

Utöver de uttryckligen angivna licenserna ger TIB MOLBIOL ingen garanti för att detta kit och/eller dess användning inte inkräktar på tredje parts rättigheter.

LightCycler®, MagNA Pure® och High Pure® är varumärken som ägs av Roche.

ABI 3730xl Genetic Analyzer and Sequencing Analysis är produkter registrerade av Applied.

LightMix® är ett varumärke som ägs av TIB MOLBIOL.

SimpleProbe® och LightMix® kit tillverkas under licens från Roche.

Versionshistorik

Anteckningar i rött markerar att laboratorieprocedurerna måste ändras

Anteckningar i blått markerar förbättringar av eller ändringar i sammansättningen

V160626	Förvaring (1.1, 1.4). Ändringar i utgåvan	26-06-2016
V170303	Ändringar i utgåvan. rs915273578 (=T281M) angiven (1.3); Missvisande formulering korrigerad (7.3.1); uppdatering av figurmärkning (7.5.1 och 7.5.2). Förvaringsanvisningar förtydligade (1.1, 1.4, 6.4)	11-10-2017
V241024	Lade till LightCycler® PRO och MagNa Pure24. LightCycler® Nano och FastStart DNA Master HybProbe togs bort. Ändringar i utgåvan	24-10-2024

Tillverkat av:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Eresburgstrasse 22-23
12103 Berlin, Tyskland
www.tib-molbiol.de

