

LightMix® Kit TREC SMA HBB Newborn



TIB Molbiol Kat. No. 40-0621-44

Roche SAP n° 09 802 533 001

Roche Diagnostics LightCycler® Cihazları ve LightCycler® Multiplex DNA Master ile kullanım için 384 (veya 192) PCR reaksiyonluk [liyofilize] primer/prob içeren tespit kiti

1. İçindekiler

Tablo 1: Kit bileşenleri.

Flakon	Kapak Rengi	Açıklama
1 adet PSR	turuncu	Parametreye Özgü Reaktifler (PSR) önceden karıştırılmış ve liyofilize primer ve prob lar içerir ≤ %62 Sentetik oligonükleotidler ≥ %38 Tampon Örnek başına 3 hedef tespit edilir

2. Kullanım Amacı

LightMix® Kit TREC SMA HBB Newborn kiti, yenidoğanlardan alınan kurutulmuş kan örneklerinden (DBS) ekstrakte edilen genomik nükleik asidin (DNA) taranması için kullanılan bir *in-vitro* tanı testidir. Bu test (1) ağır kombine immün yetmezlik hastalığının (SCID) belirtisi olan T-hücre reseptör eksizyon dairelerinin (TREC) yokluğunu, (2) tip 1 spinal müsküler atrofinin (SMA) en yaygın nedeni olan survival motor nöron 1 (SMN1) ekson 7'nin homozigot delesyonlarını ve opsiyonel olarak (3) orak hücre hastalığı (SCD) ve beta-talasemi ile yaygın olarak ilişkili beta globin geninin kodon 6 bölgesindeki mutasyonları taramak için tasarlanmıştır.

Ulusal düzenlemelerin genetik talasemi testine izin vermemesi durumunda, eritme analizi atlanabilir.

3. Saklama ve Stabilité

Kargolama:

Ürün ortam sıcaklığında kargolanır.

Teslim alındıktan sonra saklama koşulları:

Kiti ışıktan koruyarak, buzdolabında veya oda sıcaklığında (4°C - 25°C arası) saklayınız. **Kuru reaktifleri dondurmayın.**

Çözünmüş stabilite / Cihaz üzerinde stabilite:

Çözündükten sonra, reaktifler günlük kullanım için buzdolabında (2°C ile 8°C arasında) 30 güne kadar saklanabilir. Uzun süreli saklama için, -15°C ile -25°C arasında dondurun (son kullanma tarihine kadar). Tekrar dondurma-çözme döngülerini en aza indirin (< 10) ve kullanımı kaydedin.

Kendi etiketlediğiniz tüplerle ilişkili hata riskini en aza indirmek için ikincil tüplere aktarma yapmayın.

4. İlave Reaktifler, Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

4.1 Örnek hazırlama malzemeleri

Manuel Hazırlama:

CX-tamponu (1x PBS/%0,5 Thesit®)
CE-tamponu (10 mM Tris, 0,25 mM EDTA ve 2 mM NaOH)
DNA/RNase içermeyen su
Ekstraksiyon: 96 kuyucuklu plaka ve kapama folyosu

Kat. No., Üretici/Distribütör

herhangi bir tedarikçi
herhangi bir tedarikçi
herhangi bir tedarikçi

Otomatik örnek hazırlama:

Cihazlar

MagNA Pure 96 Cihazı
MagNA Pure 24 Cihazı

Kat. No., Üretici/Distribütör

06 541 089 001, Roche Diagnostics
07 290 519 001, Roche Diagnostics

Sarf malzemeleri

MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	06 543 588 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure 96 Processing Cartridge	06 241 603 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure Tip 1000 µl	06 241 620 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure 96 Output Plate	06 241 611 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure Sealing Foil	06 241 638 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure 96 System Fluid (Dahili)	06 430 112 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure 96 System Fluid (Harici)	06 640 729 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure 96 Internal Control Tube	06 374 905 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit	07 658 036 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure 24 Processing Cartridge	07 345 577 001, Roche Diagnostics
MagNA Pure Tube (Röhrchen) 2.0 ml	07 857 551 001, Roche Diagnostics

4.2 Örnek analizi malzemeleri

Reaktifler

LightCycler® Multiplex DNA Master	07 339 585 001, Roche Diagnostics veya 07 339 577 001, Roche Diagnostics
LightMix® Universal Color Compensation Hexaplex Plus (LightCycler® PRO için değildir)	06 296 971 001, Roche Diagnostics veya 40-0320-12, TIB Molbiol

İsteğe bağlı

TREC KREC Standard Row 30-621/622	09 229 230 001, Roche Diagnostics
LightMix® Modular KREC	64-0622-96, TIB Molbiol
LightMix® Modular Actin Extraction Control	07 805 993 001, Roche Diagnostics veya 66-0913-96, TIB Molbiol

Cihazlar

LightCycler® 480 II Cihazı (LightCycler® Yazılım Versiyonu 1.5 veya üstü dahil) veya	05 015 278 001, Roche Diagnostics
cobas z 480 Analizörü (LightCycler® Yazılım Versiyonu 1.5 veya üstü dahil) veya	05 200 881 001, Roche Diagnostics
LightCycler® PRO Cihazı (LightCycler® Yazılım Versiyonu 1.X.X dahil)	09 541 713 001, Roche Diagnostics

Sarf malzemeleri

LightCycler® 480 96'lı Beyaz Multiwell Plaka	04 729 692 001, Roche Diagnostics
LightCycler® 480 384'lü Beyaz Multiwell Plaka	04 729 749 001, Roche Diagnostics

5. Test Prensipleri

LightMix® TREC SMA HBB Newborn kiti, TREC yokluğunun, SMN1 genindeki delesyonların ve beta globin geninin kodon 6 bölgesindeki mutasyonların eş zamanlı tespiti için kullanılan bir in-vitro tanı testidir.

Guthrie kartları, TNF kartları veya Whatman Genekartlarındaki DBS'den ekstrakte edilen genomik DNA, multipleks PCR ile analiz edilir; ilgilenilen genlerin bir fragmenti spesifik primerler ile amplifiye edilir ve işaretli probalar kullanılarak tespit edilir. PCR, 610 kanalında TREC tespiti için 91 baz çifti uzunluğundaki bir fragmentin amplifikasyonu ile 580 kanalında tespit edilen SMN1 geninin 82 baz çifti uzunluğundaki fragmentinin amplifikasyonunu birleştirir. Beta globin geninden 90 baz çifti uzunluğundaki bir fragment de amplifiye edilir ve erime eğrisi analizi kullanılarak 530 kanalında SimpleProbe® ile tespit edilir.

Hem TREC hem de SMN1 analizi yalnızca yabancı tip örneklerde bulunan hedef dizileri tespit eder ve genleri silinmiş örneklerde sinyal kaybedilir. Aynı örnekte hem SMN1 hem de TREC'in bulunmaması olası olmadığından, SMN1 ve TREC karşılıklı kontrol görevi görür.

KREC testi yapmak veya kontrol testi olarak Aktin eklemek isteyen kullanıcılar, ilgili testleri tek bir multipleks PCR içinde birleştirebilir.

6. Tıbbi Arka Plan

Yenidoğan taraması (NBS), dünya çapında birçok ülkede kurutulmuş kan örneklerinden (DBS) metabolitlerin test edilmesine dayalı, iyi kurulmuş bir halk sağlığı hizmetidir. Primer immün yetmezlik hastalıkları (PID) için genetik testler, son yıllarda aynı DBS kullanılarak geliştirilmiştir.

SCID

SCID, T-hücre gelişiminde ciddi bozukluk ile karakterize hastalıkları ifade eder; immün yetmezlik, şiddetli ve tekrarlayan enfeksiyonlara yol açar ve tedavi edilmezse ölümcüldür. TREC, SCID hastalarında bulunmayan T-hücre reseptör rekombinasyonunun bir yan ürünüdür. Çok düşük TREC varlığı, SCID'in daha hafif formlarının veya lenfopeni belirtisi olabilir.

Ancak düşük TREC seviyeleri aynı zamanda prematüre doğum (vakaların %40'ı) ve maternal immünoşüpresif ajan tedavisi (vakaların %20'si) ile de ilişkilidir. Trizomi 21 ve DiGeorge sendromu hafif düşük TREC seviyelerine neden olabilir (Barbaro et al., 2017).

Pozitif tarama ve dolayısıyla TREC yokluğu durumunda, hastanın SCID veya diğer T-hücre lenfopeni formlarından muzdarip olup olmadığını belirlemek için tanısal takip yapılmalıdır.

Prevalans 1:60.000

SMA

SMA, survival motor nöron 1 (SMN1) genindeki mutasyonlardan kaynaklanan otozomal resesif nörodejeneratif bir hastalıktır. Gen dokuz eksondan oluşur ve küçük nükleer ribonükleer proteinlerin montajı ve rejenerasyonunda, mRNA splicing'inde ve aksonal RNA taşınmasında önemli rol oynayan 38-kD SMN1 proteinini oluşturur. SMN1 geni, kromozom 5'te ters çevrilmiş, duplike bir bölgede yer alır ve SMN'nin iki yüksek homolog kopyasını içerir: telomerik kopya (SMN1) ve sentromerik kopya (SMN2). Bu kopyalar toplam beş bazda farklılık gösterir ve bunlardan biri kodlayan bir bazdır (c.840 C>T).

SMA'dan etkilenen Kafkas bireylerin yaklaşık %95'inde SMN1 ekson 7 veya ekson 7 ve 8'i içeren homozigot delesyon vardır. SMN2 geni, alternatif splicing nedeniyle SMN1'in homozigot kaybını telafi edemez ancak SMN2 kopya sayıları değişken SMA fenotipi üzerinde modifiye edici bir etkiye sahip görünmektedir.

Bu PCR testi sadece SMN1'in yokluğu için c.840 C>T bölgesini hedefler. Pozitif tarama durumunda, SMA tipini belirlemek için tanısal takip yapılmalıdır.

Prevalans 1:11.000 (Almanya'da 1:4.000)

SCD ve β-talasemi

SCD ve β-talasemi testi isteğe bağlıdır. Ulusal düzenlemeler genetik SCD testine izin vermiyorsa, globin gen verisi elde edilmemesi için erime analizi atlanabilir.

Talasemiler, dünya çapında en yaygın resesif kalıtsal hastalıklar arasındadır. Değişen şiddette kronik anemiye yol açan hemoglobin (HB) üretiminin azalması veya olmaması ile karakterizedir. İki ana talasemi tipi vardır: α-talasemi ve β-talasemi. β-talasemi, β-zincirini kodlayan hemoglobin β-genindeki (HBB) değişikliklerden kaynaklanır; β-talasemide fonksiyonel β-zincirleri eksiktir.

HBB testi, kodon 3 ile 11 arasındaki gen bölgesini kapsayan yabancı tip spesifik prob kullanır. Bu bölge, HBS alelini kodlayan daha sık görülen rs334 (T>A) mutasyonu ve HBC alelini kodlayan rs33930165 (C>T) mutasyonu dahil olmak üzere tüm globin mutasyonlarının ~%90'ını taşır. Bu alellerin homozigot taşıyıcıları, iyi bilinen orak hücre anemisini geliştirirler (Table 2'ye bakınız). Yabancı tip spesifik erime pikinin olmadığı durumlarda (sadece düşük Tm pikleri veya hiç pik olmaması), her iki alel ya mutasyona uğramıştır (daha düşük erime piki) ya da silinmiştir (pik yok).

Bazı varyasyonlar sık görülürken diğerleri son derece nadirdir. rs713040 prob bölgesinin dışında yer alır ve görünmez. En sık görülen varyasyonlar için karakteristik erime profilleri Şekil 3'te sunulmuştur.

Table 2: rs334 yakınında bulunan varyasyonlar (sıklıkları ile).

Genomik değişiklik	AA Değişikliği	rs N°	Global	Bölgesel	Yorum
			Sıklık		
NC_000011.10:g.5227002T>A	(p.Glu7Val)	rs334	%1,3	%4,7 (Af)	HBS orak hücre anemisi (HBSS)
NC_000011.10:g.5227003C>T	(p.Glu7Lys)	rs3393016	%0,4	%1,4 (Af)	HBC orak hücre hastalığı
NC_000011.10:g.5227003C>A	(p.Glu7Ter)	rs3393016	-	-	β-talasemi
NC_000011.10:g.5227013G>A	(p.His3=)	rs713040	%17,3	%50,9 (DA)	HbE

AA: Amino Asit, Af: Afrika, EA: Doğu Asya

7. Kullanım Talimatları

7.1 LightCycler® 480 Cihazı ve cobas z 480 Analizörü

7.1.1 Boya kanalları ve renk kompanzasyonu

LightCycler® 480 Cihazları ve cobas z 480 Analizörü ile kullanım için yazılım versiyonu 1.5 ve üstünü kullanın. Detaylar için cihaz kullanım kılavuzuna bakın. Reaktif hazırlığından önce cihazı programlayın.



Tespit formatı kurulumunu LightMix® Universal Color Compensation Hexaplex Plus (40-0320-12) kullanım talimatlarına göre gerçekleştirin. Bu renk kompanzasyonu doğru analiz için zorunludur. Devre dışı bırakılması sonuçların geçersiz okunmasına neden olacaktır.

Tablo 3: Her bir kanal için gerekli tespit formatı parametre ayarları (cihaza özgü filtre kombinasyonları, kantitasyon faktörü ve entegrasyon süresi).

Cihaz \ Kanal	500 n.a.	530 HBB	580 SMN1	610 TREC	640 KREC*	660 Aktin*
LightCycler® 480	450-500	483-533	523-568	558-610	558-640	615-670
LightCycler® 480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
cobas z 480	-	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670
Kantitasyon Faktörü*	10	10	10	10	10	10
Maksimum Entegrasyon Süresi*	1 sn	1 sn	1 sn	2 sn	3 sn	3 sn

Not: *Kanal 640 (KREC) ve kanal 660 (Aktin Ekstraksiyon Kontrolü) opsiyoneldir.

HBB testi sonuç yorumlaması için sadece erime sıcaklığı (Tm) kullanılır. 530 kanalındaki herhangi bir amplifikasyon önemsizdir.

7.1.2 Cihaz programlama

Döngü koşullarının programlanması

Tespit Formatı: **Heksapleks**

Reaksiyon Hacmi: **10 µl** (veya 20 µl)

Protokol 3 program adımından oluşur:

- 1) Örneğin denatürasyonu ve enzimin aktivasyonu
- 2) Hedef DNA'nın PCR amplifikasyon döngüsü
- 3) Cihazın soğutulması

Table 4: Döngü koşulları programlama.

Program Adımı:	Denatürasyon	Döngü			Soğutma
Parametre					
Analiz Modu	Yok	Kantitasyon modu			Yok
Döngü Sayısı	1	45			1
Hedef °C	95	95	61	72	40
Bekleme sa:dk:sn	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Sıcaklık Artış Hızı °C/s 96 kuyucuk	4,4	4,4	2,2	4,4	1,5
Sıcaklık Artış Hızı °C/s 384 kuyucuk	4,6	4,6	2,4	4,6	2,4
Ölçüm Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok

Not: Programı ve varsayılan değerleri "RUN Template" (Şablonu Çalıştır) olarak kaydedin, bu şekilde her çalışmayı başlatmak için yüklenebilir.

7.1.3. İsteğe bağlı: HBB erime analizi (ikinci çalışma)

Tespit Formatı: **SimpleProbe®**

Reaksiyon Hacmi: **10 µl** (veya 20 µl)

Protokol tek program adımından oluşur: Erime

Tablo 5: Erime eğrisi programlama.

Program Adımı	Erime		
Parametre			
Analiz Modu	Erime eğrileri modu		
Döngü Sayısı	1		
Hedef °C	95	40	75
Bekleme sa:dk:sn	00:00:30	00:02:00	00:00:00
Sıcaklık Artış Hızı °C/s 96 kuyucuk	4,4	1,5	-
Sıcaklık Artış Hızı °C/s 384 kuyucuk	4,8	2,5	-
Ölçüm Modu	-	-	Sürekli
°C başına ölçüm	-	-	3

7.2 LightCycler® PRO Cihazı

LightCycler® PRO Cihazları ile kullanımda, LightMix® Kit TREC SMA HBB Newborn sadece tek başına veya LightMix® Modular Aktin Ekstraksiyon Kontrolü ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

1.X.X yazılım versiyonunu kullanın. Detaylar için LightCycler® PRO Sistem Kullanıcı Yardımına bakın.

LightMix® Kit TREC SMA HBB Newborn için uyumlu LightCycler® Analiz Paketi (LCAP) dosyasını indirmek için navifyportal.roche.com adresini ziyaret edin.

Kite özgü çalışma profili LCAP'ın bir parçasıdır ve yukarıda gösterilen çalışma koşullarına eşdeğerdir.

LightCycler® Analiz Paketi:

0501_Newborn384

TREC SMA HBB Newborn, isteğe bağlı olarak Aktin ekstraksiyon kontrolü ile Amplifikasyon ve Erime, 384 kuyucuklu plaka, 10 µl reaksiyon hacmi

0502_Newborn96

TREC SMA HBB Newborn, isteğe bağlı olarak Aktin ekstraksiyon kontrolü ile Amplifikasyon ve Erime, 96 kuyucuklu plaka, 20 µl reaksiyon hacmi

LCAP dosyasını SFTP veya USB cihazının test klasörüne kaydedin.

İndirilen LCAP'ı LightCycler® PRO Cihazına aktarın, yükleyin ve Etkinleştirin.

Plakalar sekmesinde bir plaka düzeni oluşturun veya içe aktarın.

8. Deneysel Protokol

8.1 Örnek hazırlama

Manuel iş akışı (DNA saflaştırma protokolü için ayrıca bkz. Czibere et al, 2020)

Guthrie kartı, TNF kartı (Ahlstrom-Munksjö) veya Whatman Genecard'dan 3,2 mm çapında DBS kullanın. DBS'yi 96 kuyucuklu PCR plakasına aktarın. DBS'yi oda sıcaklığında (19°C ile 24°C arası) çalkalayıcıda (200 rpm) 10 dakika boyunca 50 µl su içinde bekletin, 150 µl CX-tamponu ekleyin ve 10 dakika daha çalkalayın. 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edin, süpernatanı uzaklaştırın ve 150 µl CX-tamponu daha ekleyin. 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edin, süpernatanı uzaklaştırın ve 150 µl CX-tamponu ekleyin. 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edin, süpernatanı uzaklaştırın ve 50 µl CE-tamponu ekleyin. Plakayı kapatın ve 92°C'de 10 dakika inkübe edin.

Otomatik iş akışı

Guthrie, TNF kartı veya Whatman Genecard'dan alınan üç DBS parçasını 600 µl PBS içinde homojenize edin, süpernatandan 200 µl'yi MagNA Pure işlem kartuşuna aktarın. Roche Diagnostics MagNA Pure 96 cihazında, MagNA Pure cihaz talimatlarına uygun olarak 'DNA and Viral NA Small Volume Kit' kullanarak nükleik asit ekstraksiyonu gerçekleştirin. Alternatif olarak, nükleik asit ekstraksiyonu Roche Diagnostics MagNA Pure 24 cihazında 'MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit' kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Örnek Materyali: sulu çözeltide saflaştırılmış genomik DNA

8.2 PSR ve Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

8.2.1 PSR'nin Hazırlanması

Tüpte renkli pellet olup olmadığını kontrol edin. 200 µl PCR-grade su ekleyin, çözeltiyi karıştırın (vorteks) ve spin edin. Robotik pipetleme için hacim 210 µl'ye çıkarılabilir (sinyaller yaklaşık %5 azalacaktır).

► 10 µl reaksiyon başına 0,5 µl PSR veya 20 µl reaksiyon başına 1 µl PSR kullanın.

8.2.2 LightCycler® Multiplex DNA Master'ın Hazırlanması

Çözeltileri çözün ve tüpleri açmadan önce mikro santrifüjde kısaca spin edin. Pipetleme yaparak dikkatlice karıştırın veya kısaca vorteksleyin ve spin edin. Çözeltiyi soğuk tutun.

8.2.3 Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Aşağıdaki tablo tripleks reaksiyonlar için reaksiyon karışımı hazırlanmasını açıklamaktadır. Her çalışmada en az bir 'Kalıp İçermeyen Kontrol' (NTC) dahil edin.

Soğutulmuş bir tüpte, tek reaksiyon hacimlerini kontroller dahil reaksiyon sayısı artı bir ilave reaksiyon ile çarparak reaksiyon karışımını hazırlayın; önerilen en küçük pipetleme hacmi 1 µl'dir.

Tablo 6: Reaksiyon Karışımının Hazırlanması.

LightMix® Kit TREC SMA HBB Newborn ile kullanılacak Reaksiyon Karışımı		
LightCycler® Multiplex DNA Master		Roche Kat. No. 07 339 577 001 Roche Kat. No. 07 339 585 001
10 µl'lik tek reaksiyon	Bileşen	20 µl'lik tek reaksiyon
2,5 µl	Su, PCR sınıfı	10,0 µL
0,5 µl	PSR LightMix® Kit TREC SMA HBB Newborn (turuncu kapak)	1,0 µL
--	PSR LightMix® Modular KREC - yedek su	--
--	PSR LightMix® Modular Aktin Ekstraksiyon Kontrolü - yedek su	--
2,0 µl	qPCR Reaksiyon Karışımı, 5 adet kons. (LightCycler® Multiplex DNA Master)	4,0 µl
5,0 µl	Reaksiyon Karışımı Hacmi	15,0 µl

avaşça karıştırın, spin edin ve soğutulmuş 384 (veya 96) kuyucuklu PCR plakasındaki her kuyucuğa 5 µl (veya 15 µl) reaksiyon karışımı aktarın.

10 µl'lik (veya 20 µl'lik) final reaksiyon hacmi için her kuyucuğa **5 µl** örnek veya kontrol DNA'sı (bu kitte sağlanmamıştır) ekleyin. En az 1 NTC gerçekleştirmek için örnek yerine PCR grade su kullanın. Plakayı kapatın ve 2000 × g'de 3 dakika santrifüj edin.

LightCycler® PRO Cihazı: Plaka düzenini atayın. Mevcut bir plaka düzeninin plaka kimliğiyle eşleşen barkodlu bir plaka yüklediğinizde plaka düzeni otomatik olarak atanır.

Çalışmayı başlatın.



Kapama folyosuna eldivensiz dokunmayın.
Çalışmayı başlatmadan önce uzun bekleme sürelerinden kaçının.

9. Veri Analizi

9.1 LightCycler® 480 Cihazı ve cobas z 480 Analizöründe Veri Analizi:

LightMix® Color Compensation Hexaplex Plus kiti ile oluşturulan renk kompanzasyon dosyasının kullanımı, LightCycler® 480 Cihazları ve cobas z 480 Analizörlerinde multipleks PCR için zorunludur, ancak LightCycler® PRO Cihazları için zorunlu değildir.

Veri analizini LightCycler® 480 Cihazı Kullanım Kılavuzunda açıklandığı şekilde gerçekleştirin. İkinci Türev Maksimum metodunu kullanın ("Abs Quant / 2nd Derivative Max").

Sonuç analizi, bu testlerin analizi için özel olarak uyarlanmamış genel kullanım amaçlı bir yazılım içerir. Her örneğin Crossing Point (Cp) değeri otomatik olarak hesaplanır. Cihaz yazılımı, amplifikasyon grafiği görünümünde sonuçları geçici olarak Pozitif (kırmızı grafik), Negatif (yeşil grafik) veya Belirsiz (mavi grafik) olarak belirler.

Yanlış sonuçların raporlanmasını önlemek için yazılımın Pozitif, Negatif ve Belirsiz sonuçları operatör tarafından doğrulanmalıdır.

9.1.1 Çalışma geçerlilik kriterleri:

Bir örneğin normal durumu pozitif PCR sonucu (hastalık riski yok) olduğundan, SMN1 ve TREC geninin amplifikasyonu kontrol reaksiyonu olarak kullanılabilir.

- NTC amplifikasyon göstermemelidir (ve eğer erime ile ikinci bir çalışma yapıldıysa erime eğrisi göstermemelidir), aksi takdirde tüm çalışma geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.
- Pozitif kontrol kullanılıyorsa ilgili kanalda pozitif olmalıdır.

580 ve 610 kanallarında örneklerin amplifikasyon eğrilerini kontrol edin:

- Bir kanaldaki reaksiyon sinyali yoksa ancak diğer kanalda amplifikasyon varsa her örnek için sonuçlar geçerlidir.
- Hem 580 hem de 610 kanallarında reaksiyon sinyali yoksa, sonucu doğrulamak için örnek hazırlama ve tespit tekrarlanmalıdır.
- Tüm örnekler için reaksiyon sinyalleri yoksa, çalışma geçerli değildir ve sonuçlar kullanılamaz.

9.1.2 Amplifikasyon analizi:

- 580 ve 610 kanallarında her örneği görsel olarak inceleyin ve açıkça görülebilir amplifikasyon eğrilerini belirleyin.
- Her iki kanalda amplifikasyon gösteren tüm örnekleri belgeleyin.
- Sadece bir kanalda amplifikasyon gösteren tüm örnekleri belgeleyin.
- Her örnek için her iki kanalın Cp değerlerini karşılaştırın. 610 kanaldaki sinyaller genellikle 580 kanaldaki sinyallere göre 1-4 döngü gecikmeli olur.
- 580 kanala göre 610 kanalda çok gecikmeli sinyaller gösteren örnekleri belirleyin.

9.1.3 Erime eğrisi analizi (HBB analizi için isteğe bağlı):

Erime ile ikinci bir çalışma yapıldıysa, "Tm Calling" için yeni bir analiz açın. Erime eğrisi analizi sonuçları bir, iki ve çok nadiren erime piki göstermeyecektir. Her örnek için Tm değerlerini belirleyin ve belgeleyin.

9.2 LightCycler® PRO Cihazında Veri Analizi

Veri analizini LightCycler® PRO Sistem Kullanıcı Yardımında açıklandığı şekilde gerçekleştirin. Hedef Sonuçlar sekmesinde sonuçları gözden geçirin ve onaylayın. Bilinmeyen örneklerin sonuçlarını onaylamadan önce iç kontrollerin sonuçlarını onaylamak gereklidir. R6G ve Red 610 kanallarında her örneğin görsel olarak inceleyin ve açıkça görülebilir amplifikasyon eğrilerini belirleyin. Sonuçların üzerine yazılabilir, üzerine yazılan sonuçlar işaretlenecektir. Örnek Sonuçları sekmesinde onaylanan sonuçlar yayınlanabilir.

10. Sonuç Yorumlama

10.1 TREC - Kanal 610 / Red 610:

- Sinyal varsa, örnek tespit edilebilir TREC DNA'sı içerir.
- Sinyal yoksa, örnekte T-hücre reseptör ekstinksiyon döngüleri eksiktir. Hastanın SCID veya diğer T-hücre lenfopeni formlarından muzdarip olup olmadığını belirlemek için tanısal takip yapılmalıdır.
- Çok gecikmeli TREC sinyalleri SCID ile ilişkili olabilir, ancak prematüre doğum ve diğer faktörlerle de ilişkili olabilir. İleri analiz yapılmalıdır.

10.2 SMN1 geni – Kanal 580 / R6G:

- Sinyal varsa, örnek homozigot SMN1 delesyonu içermez.
- SMN1 için sinyal yoksa ancak kanal 610'da amplifikasyon varsa, SMA tipini doğrulamak ve belirlemek için tanısal takip yapılmalıdır.

10.3 HBB mutasyonu – Kanal 530 / FAM:

- ~66°C'lik Tm ile tek pik, prob bağlanma bölgesinde mutasyon tespit edilmediğini gösterir (yabanıl tip beklenebilir).
- İki pik; ~66°C'lik Tm ile bir pik ve ≤66°C'lik Tm ile bir pik heterozigot genotiptir. En sık görülen mutasyon rs334, ~61°C'de erir ve HbS alelinin heterozigot taşıyıcısını gösterir ve SCD'yi işaret eder.
- ~66°C'lik Tm ile yabanıl tip pik yoksa (daha düşük Tm ile bir veya iki pik var veya hiç pik tespit edilmemiş) her iki alel de mutasyona uğramıştır ve sonuç SCD ve/veya β-talasemi gösterir.



Bu, potansiyel SCD veya diğer β-talasemi vakalarını tanımlamak için bir tarama testidir. Bu yenidoğanda SCD veya β-talasemi gelişip gelişmeyeceğini doğrulamak için bu örnekleri MSMS, HPLC veya sekanslama gibi ek bir teste yönlendirin.

Globin geninin hedeflenen bölgesi polimorfizmler bakımından zengindir. Özellikle rs33930165 (70613 G>A) veya rs35497102 (70619-70620 delAA) ve rs34548294 (70624-70625 insT) gibi komşu mutasyonlar da daha düşük Tm pikleri oluşturacaktır. Örnek beklenmeyen bir erime eğrisi profili oluşturuyorsa sapmaları service@tib-molbiol.de adresine bildirin.

Tablo 7: Bireysel kanallar için sonuç yorumlama. Tm değeri LightCycler® 480 Cihazında belirlenmiştir ve farklı cihazlar arasında değişiklik gösterebilir.

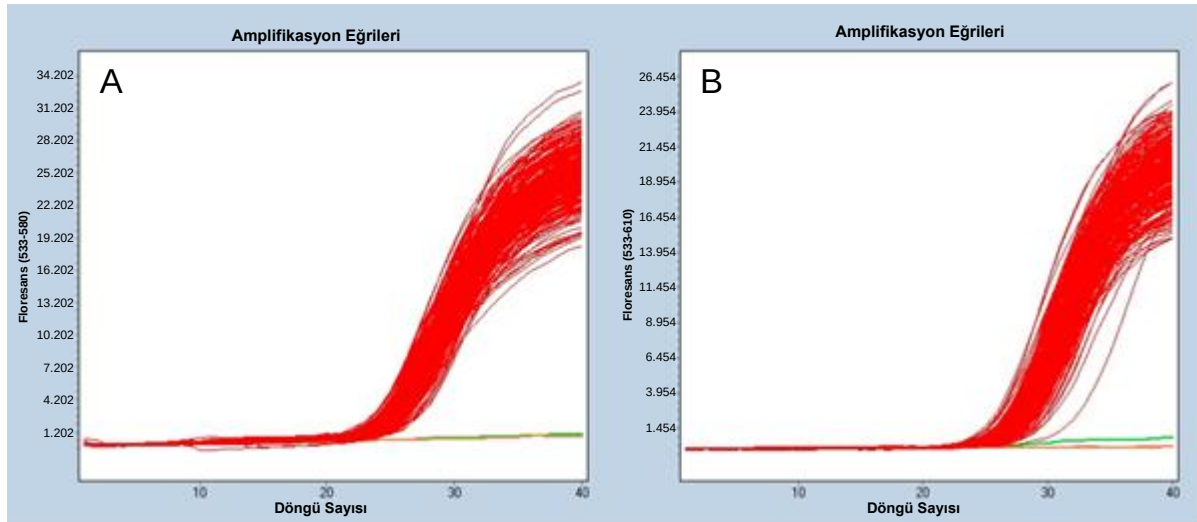
Kanallar				Sonuçlar
530 / FAM HBB	580 / R6G SMN1	610 / Kırmızı 610 TREC	530 / FAM HBB ERİME	
İlgili değil	Amplifikasyon	Amplifikasyon	Tek pik Tm ~66 °C	Mutasyon tespit edildi
İlgili değil	Amplifikasyon	Amplifikasyon Yok	Tek pik Tm ~66 °C	TREC yokluğu tespit edildi
İlgili değil	Amplifikasyon Yok	Amplifikasyon	Tek pik Tm ~66 °C	SMN1 silme tespit edildi
İlgili değil	Amplifikasyon	Amplifikasyon	İki pik Tm ~61 °C & ~66 °C	heterozigot HBB mutasyonu tespit edildi
İlgili değil	Amplifikasyon	Amplifikasyon	Tek pik ~61 °C	homozig HBB mutasyonu tespit edildi
Amplifikasyon Yok	Amplifikasyon	Amplifikasyon	Pik yok	HBB silme tespit edildi
İlgili değil	Amplifikasyon Yok	Amplifikasyon Yok	Pik yok	Başarısız/Tekrar

Notlar: Tm değerleri farklı çalışmalar arasında $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ değişebilir. Heterozigot genotipler için erime pikleri arasındaki $\Delta T \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ değişebilir. Test edilen tüm örneklerin yaklaşık %0,1'inin çok düşük TREC (veya KREC) seviyeleri verdiği rapor edilmiştir.

11. Amplifikasyon ve Erime için Tipik Veriler

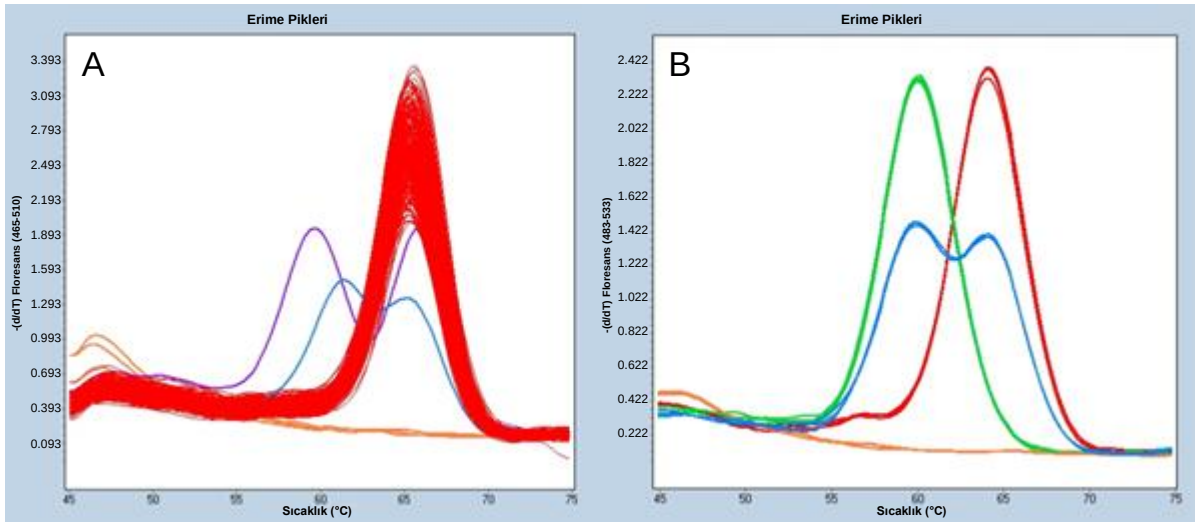
Bu testler, hedef yoksa veya silinmişse amplifikasyon göstermeyecek şekilde tasarlanmıştır. Aşağıda gösterilen amplifikasyon ve erime eğrileri hedefin varlığını gösterir.

11.1 LightCycler® 480 Cihazlarında oluşturulan veriler



Şekil 1: Hedefin varlığında ve yokluğunda amplifikasyon eğrileri.

A) 580 kanalında SMN1 tespiti (kırmızı) ve SMN1 delesyonu (yeşil) veya NTC (turuncu).
B) 610 kanalında TREC tespiti (kırmızı) ve TREC yokluğu (yeşil) veya NTC (turuncu).

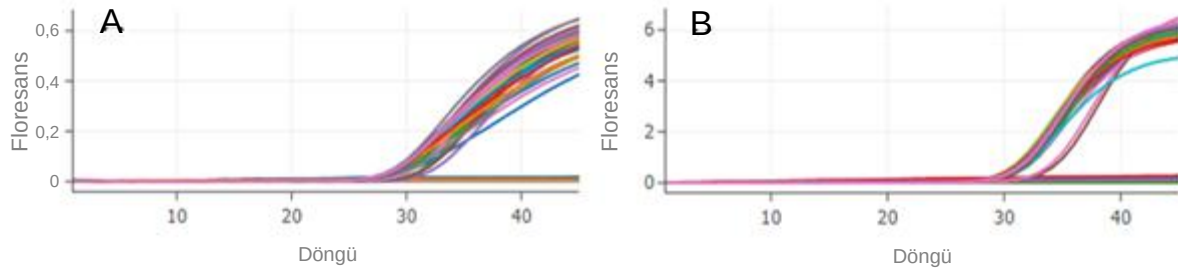


Şekil 2: Kanal 530'daki HBB için erime eğrisi analizi sonuçları.

A) Yabanıl tip için tek pik (kırmızı), heterozigot HBB/HBS (mavi) ve HBB/HBC (mor) için iki pik, NTC turuncu renkte gösterilmiştir.

B) Yabanıl tip için ~66°C'lik T_m ile tek pik (kırmızı). ~61°C'lik T_m ile tek pik (yeşil) çift mutasyonlu rs334 (SCD). İki pik (mavi) heterozigot (HBB/HBS) gösterir. NTC için pik yok (turuncu).

11.2 LightCycler® PRO Cihazlarında oluşturulan veriler

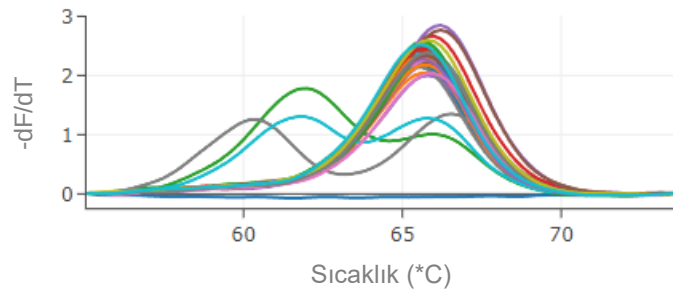


Şekil 3: Hedefin varlığında ve yokluğunda amplifikasyon eğrileri.

A) R6G kanalında SMN1 tespiti (Reaktif) ve SMN1 delesyonu (Reaktif Değil) veya NTC (Geçerli).

B) Red 610 kanalında TREC tespiti (Reaktif) ve TREC yokluğu (Reaktif Değil) veya NTC (Geçerli).

LightCycler® PRO Cihazlarında oluşturulan C_q değerleri ve Floresans seviyeleri, farklı hesaplama yöntemleri nedeniyle LightCycler® 480 Cihazları veya cobas z 480 Analizörlerinde oluşturulan C_p değerleri ve Floresans seviyelerinden farklılık gösterebilir.



Şekil 4: HBB için erime eğrisi analizi sonuçları, FAM kanalında.

Yabanıl tip için tek pik, heterozigot HBB/HBS (yeşil ve turkuaz) ve HBB/HBC (gri) için iki pik, NTC mavi renkte gösterilmiştir.

12. Performans Özellikleri

Gösterilen veriler LightCycler® 480 Cihazlarında oluşturulmuştur.

Analitik duyarlılık:

Her lot, reaksiyon başına en az on (10) kopya tespit edecek şekilde doğrulanmıştır.

Analitik duyarlılık, multipleks PCR'de TREC için 7 kopya ve SMN1 için 9 kopya aralığında olacak şekilde belirlenmiştir.

Analitik özgüllük:

Hedeflenen genlere özgüllük ve PCR amplifikasyonunun uygunluğu, in-siliko analiz ve ampikonların sekanslanması ile gösterilmiştir.

Değerlendirme çalışmaları:

2017'de PCR ile test edilen 1.000 örneklik bir çalışmada, TREC yokluğunun tespiti için %100 duyarlılık ve özgüllük rapor edilmiştir.

2018'de yapılan, SMN1 gen delesyonunun tespiti için 200.000 DBS içeren bir çalışmada %100 duyarlılık ve özgüllük rapor edilmiştir (Czibere ve ark., 2020).

2019'da yapılan, TREC / KREC / SMA için test edilen 5.000 örnek içeren bir çalışmada hem TREC hem de SMA için >%99,99 duyarlılık ve özgüllük rapor edilmiştir.

Table 8: Performans verilerinin özeti.

Kanal	530	580	610
Hedef	HBB	SMN1	TREC
Multiplekste LoD (kopya/rxn)	< 10	8,7	7,1
Özgüllük	geçti	geçti	geçti
Tanısal Duyarlılık	b.d.	> %99,99	> %99,99
Tanısal Özgüllük	b.d.	> %99,99	> %99,99
Prevalans (Lit.)	b.d.	1:11.000	1:60.000
PPV	b.d.	%100	%100
NPV	b.d.	%100	%100

b.d. = belirli değil Tespit Limiti (LoD) değerleri 96 kuyucuklu plakalarda 5 µl örnek içeren 20 µl reaksiyonlar içindir.

13. Test Sınırlamaları

Tüm sonuçlar, hasta bilgileri (örn. prematüre doğum) ile birlikte eğitimli bir profesyonel tarafından yorumlanmalıdır. Bu test tarafından üretilen sonuçların yorumlanması, yanlış sonuç olasılığını göz önünde bulundurmalıdır. Negatif sonuçlar ilgili hedefin varlığını dışlamaz. Moleküler test sonuçları, hasta tedavisinin tek dayanağı olmamalıdır.

Nükleik asit veya amplifiye ürünün çapraz kontaminasyonundan yanlış pozitif sonuçlar oluşabilir; yanlış pozitif sonuç hastalık riskinin gözden kaçırılmasına yol açar. Yanlış negatif PCR sonuçları (amplifikasyon yok) ikinci bir testte doğrulanmalıdır.

Test kantitatif test için valide edilmemiştir.

14. Önlemler ve Uyarılar

Kullanım gereklilikleri

Bu ürün yalnızca kalifiye personel tarafından kullanılması gereken bir in-vitro tanı cihazıdır. Bu ürünü kullanmadan önce, cihaz kullanım kılavuzundaki operatör/güvenlik talimatlarını okuyun.

Genel laboratuvar malzemelerinin kullanımı için genel önlemler gereklidir.

Laboratuvar iş akışı iyi laboratuvar uygulamalarını takip etmelidir. Kontaminasyon riski nedeniyle, PCR hazırlığı ve PCR amplifikasyonu fiziksel olarak ayrı alanlarda gerçekleştirilmelidir.

- Farklı lotlardan reaktifleri karıştırmayın.
- Reaktifleri son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Kitle birlikte verilen kılavuz versiyonunu kullanın (kit etiketine bakın).

Laboratuvar prosedürleri

İnsan kaynaklı tüm materyaller ve ilgili atıklar potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilmelidir.

- Tüm çalışma yüzeylerini iyice temizleyin ve yerel makamlar tarafından onaylanan dezenfektanlarla işlem yapın.
- Laboratuvar çalışma alanında yemek yemeyin, içecek içmeyin veya sigara içmeyin.
- Ağızla pipetleme yapmayın.
- Örnekleri ve set bileşenlerini kullanırken tek kullanımlık koruyucu eldiven, laboratuvar önlüğü ve uygun göz koruması kullanın.
- Her zaman nükleaz içermeyen teknikler kullanın.
- Filtreli uç kullanımı zorunludur
- Örnekleri ve set bileşenlerini kullandıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.

Amplifikasyon ve tespit

Bu ürünü kullanmadan önce, lütfen LightCycler® 480 Cihazı Kullanım Kılavuzunu okuyun. Plaka kurulumunda her pozisyona örnek tanımlayıcılarını girin. LightCycler® Cihaz ayarlarını kontrol edin ve bu kılavuzda belirtilenlerle eşleştirdiğinden emin olun. Plaka kapağına eldivensiz dokunmayın.

Lütfen LightCycler® Cihazının tüm operatör ve güvenlik talimatlarına bakın.

LightCycler® 480 plakalar cihazdan çıkarıldığında aşırı sıcak olabilir; uygun koruma kullanın.

Sonuç yorumlama ve raporlama

Moleküler test sonuçları, tedavi kararının tek dayanağı olmamalıdır.

Atık malzemelerin yönetimi

Tüm reaktifleri ve atık materyalleri mevcut yerel yönergelerle göre imha edin ve inaktive edin.

15. Referanslar

DBS

- Optimized DNA extraction from neonatal dried blood spots: application in methylome profiling. Ghantous et al., 2014

TREC

- Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. Douek et al., 2000
- Quantification of T-cell receptor excision circle DNA using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. Loeffler et al., 2002
- Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. Baker et al., 2009
- Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. Sottini et al., 2010
- Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. Borte et al., 2012
- Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden—a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening Study. Barbaro et al., 2017

SMA

- 1000 sample comparison of MLPA and RT-PCR for carrier detection and diagnostic testing for Spinal Muscular Atrophy Type 1. Strom et al., 2013
- High-throughput genetic newborn screening for spinal muscular atrophy by rapid nucleic acid extraction from dried blood spots and 384-well qPCR. Czibere et al., 2020

16. Menş e Sertifikası

Ürün insan, hayvan veya bitki kökenli değildir. Menş e Ülkesi: Almanya.

17. Versiyon Geçmiş i

Versiyon	Olay	Tarih
V230316	Editoryal değ iş iklikler ve küçük düzeltmeler	16/03/2023
V230511	Tam revizyon ve şek il güncellemesi	11/05/2023
V231115	LightCycler® PRO eklenmesi ve editoryal değ iş iklikler	15/11/2023
V231115	Biçimlendirme ve dil sürümü	22/05/2025

Üretici ve İletiş im Bilgileri

IVD cihaz gözlemlerini, sapmalarını ve sorunlarını service@tib-molbiol.de adresine ve yerel Roche temsilcinize bildirin. Lütfen lot numarası/numaralarını ve kısa bir açıklama belirtin.

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH | Eresburgstr. 22-23 | D-12103 Berlin | Almanya
Tel. +49 30 78 79 94 55 | FAKS +49 78 79 94 99 | dna@tib-molbiol.de | WWW.TIB-MOLBIOL.COM
EORI DE 4806433 | Sicil Mahkemesi Berlin Charlottenburg HRB 93163 B



Alıcıya Bildirim – Patentler ve Ticari Markalar

Bu ürünün satın alınması, insan kaynaklı örnekler üzerinde in-vitro tanı amaçlı nükleik asit dizilerinin amplifikasyonunu ve tespitini gerçekleştirme hakkını verir. Mevcut ürünün satın alınmasından kaynaklanan kullanım hakkı dışında başka bir lisans devredilmez. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, TIB MOLBIOL bu kitin ve/veya kullanımının/kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğine dair garanti vermez.

LIGHTMIX, TIB MOLBIOL'un ticari markasıdır. LIGHTCYCLER, MAGNA PURE, HIGH PURE ve COBAS Z, Roche'un ticari markalarıdır. Diğer tüm ürün isimleri ve ticari markalar ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.