

SALSA[®] MLPA[®] probemix P159-A5 GLA

Účel použití

Salsa MLPA kit P159 GLA je test pro *in vitro* diagnostiku (IVD)¹ nebo pouze pro výzkumné účely (RUO) a slouží pro detekci delecí nebo duplikací lidského genu GLA jako příčina Fabryho choroby, pro stanovení diagnózy a za účelem potvrzení klinické a/nebo biochemické diagnózy. Tento kit může být použit pro molekulární genetické testování rodinných příslušníků s rizikem.

Tento test je určen pro použití s lidskou DNA izolovanou z periferní krve. Delece a duplikace detekované kitem P159 GLA by měly být ověřeny jinou metodou. Zejména delece nebo duplikace detekované pouze jedinou sondou, vždy vyžadují ověření jiným způsobem. Většina defektů v GLA genu jsou bodové mutace a většina z nich nebude detekována metodou MLPA. Doporučuje se proto používat tento kit v kombinaci se sekvenční analýzou GLA genu.

Tento test není určen k použití jako samostatný test pro klinické rozhodování. Výsledky tohoto testu musí být interpretovány molekulárním genetikem nebo ekvivalentním odborníkem.

¹Berte prosím na vědomí, že tento kit je pro in vitro diagnostické použití (IVD) v zemích uvedených na konci tohoto popisu. Ve všech ostatních zemích je výrobek určen pouze pro výzkumné účely (RUO).

Klinické pozadí

Fabryho choroba (OMIM: 301500) (Andersonova-Fabryho choroba, deficiencie alfa-galaktosidázy A), X-vázaná porucha glykosfingolipidů, která je způsobena nedostatkem α -galaktozidázy A v důsledku defektů v genu pro alfa-galaktosidázu (GLA). Fabryho choroba je spojena s dysfunkcí mnoha buněčných typů a zahrnuje systémovou vaskulopatii (onemocnění cév). Jako výsledek, pacienti mají výrazně zvýšené riziko vzniku periferní neuropatie malých vláken (poruchy periferního nervového systému), mrtvice, nesčetné srdeční projevy a chronické onemocnění ledvin. Prakticky všechny komplikace Fabryho nemoci jsou nespecifické povahy a klinicky nerozlišitelné od podobných abnormalit, které se vyskytují v souvislosti s častějšími poruchami v běžné populaci.

Ačkoli tato nemoc byla původně považována za velmi vzácnou, studie zjistily mnohem vyšší výskyt mutací v genu GLA, což naznačuje, že tato porucha je nedostatečně diagnostikována (Schiffmann 2009).

Více informací na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1292/>.

Struktura genu

Gen GLA (7 exonů) pokrývá ~ 17 kb genomové DNA a nachází se na chromozomu Xq22.1, přibližně 101 Mb od p-teloméry. GLA LRG_672 je totožný s GenBank NG_007119.1, dostupné na www.lrg-sequence.org.

Transkripční varianty

Jedna transkripční varianta byla popsána: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2717>. Sekvence transkripční varianty 1 GLA (NM_000169.2, 1418 nt, kódující sekvence 111-1400) je referencí v projektu NCBI RefSeqGene. V Tabulce 2 jsou ligační místa sond GLA MLPA označené podle této sekvence, která obsahuje 7 exonů. Počátek translace ATG se nachází v exonu1 (111-113) a stop kodon je umístěn v exonu 7 (1398-1400).

Číslování exonů

Číslování exonů použité v tomto popisu produktu P159-A5 GLA a v Coffalyser. Net je číslování exonů z transkriptu RefSeq NM_000169.2, které je identické s LRG_672 sekvencí. Číslování exonů a použité sekvence NM jsou od 03/2018, ale mohou být změněny (např. NCBI) po vydání popisu produktu.

Obsah P159-A5 GLA kitu

Kit SALSA MLPA P159 GLA obsahuje 25 sond s amplifikačními produkty mezi 146 a 355 nt: 8 sond pro gen GLA (jedna sonda pro každý exon a další sonda pro exon 2), 3 ohraničující sondy pro geny umístěné před GLA (včetně HNRNPH2) a 3 ohraničující sondy pro downstream geny a 11 referenčních sond pro detekci sekvencí na chromozomu X. Identita genů detekovaných referenčními sondami je k dispozici online (www.mlpa.com).

Tento kit obsahuje deset kontrolních fragmentů, které generují amplifikační produkty mezi 64 a 121 nt: čtyři DNA kvantitativní fragmenty (Q-fragmenty), dva DNA denaturační fragmenty (D-fragmenty), jeden benchmark fragment, a jeden chromozóm X a dva chromozóm Y-specifické fragmenty (tabulka níže). Více informací o tom, jak interpretovat výsledky z těchto kontrolních fragmentů, můžete nalézt v MLPA obecném protokolu.

Length (nt)	Name
64-70-76-82	Q-fragments (Only visible with <100 ng sample DNA)
88-96	D-fragments (Low signal of 88 or 96 fragment indicates incomplete denaturation)
92	Benchmark fragment
100	X-fragment (X chromosome specific)
105	Y-fragment (Y chromosome specific)
121	Y-fragment: Specific for the Y chromosome

MLPA metoda

Principy MLPA metody (Schouten et al 2002) jsou popsány v MLPA obecném [protokolu](#).

Validace MLPA metody

Interní validace MLPA metody na 16 vzorcích DNA ze zdravých jedinců je nezbytná, a to zejména při prvním použití MLPA, nebo při změně zpracování vzorků, metodě extrakce DNA nebo používaného přístroje. Tato validace by měla vykazovat standardní odchylku <0,10 pro všechny sondy v experimentu.

Požadavky na vzorky

Izolovaná DNA z periferní krve bez nečistot, které ovlivňují MLPA reakci. Více informací naleznete v části o zpracování DNA vzorku v MLPA obecném protokolu.

Referenční vzorky

Všechny testované vzorky, včetně referenčních vzorků DNA, by měly být odvozeny ze stejného typu tkáně, zpracovány za použití stejného postupu a připraveny za použití stejného způsobu. Referenční vzorky by měly být odvozeny od nepříbuzných jedinců bez historie Fabryho choroby. Doporučuje se používat referenční a patientské vzorky stejného pohlaví pro usnadnění interpretace. Další informace týkající se výběru a použití referenčních vzorků lze nalézt v MLPA obecném protokolu.

Pozitivní kontrolní DNA vzorky

MRC-Holland nemůže poskytnout pozitivní vzorky DNA. Zahrnutí pozitivního vzorku v každém experimentu je doporučeno. Biobanka Coriell (<https://catalog.coriell.org>) a DSMZ (<https://www.dsmz.de/home.html>) mají různorodou sbírku biologických zdrojů, které mohou být použity jako pozitivní kontrolní DNA vzorek ve vašich MLPA experimentech. Kvalita buněčných linií se může měnit, proto by měly být vzorky validovány před použitím.

Charakteristika výkonu testu

Většina pacientů s Fabryho chorobou má patogenní varianty, které jsou snadno detekovány sekvenční analýzou. Odhaduje se, že přibližně ~ 5% všech pacientů s Fabryho chorobou mají delece nebo duplikace v GLA genu; buď zahrnující část genu, celý gen nebo delece přesahují GLA gen. Pokud se kromě sekvenční analýzy GLA používá i metoda MLPA, míra detekce se obecně zvyšuje o ~ 5 procentních bodů. Analytická citlivost a specifita pro detekci delecí nebo duplikací v genu GLA je velmi vysoká a může být považována za > 99% (na základě literárních studií 2008-2017).

Analytická výkonnost může být ohrožena: SNP nebo dalšími polymorfismy (např. indels) v cílové sekvenci DNA, nečistotami ve vzorku DNA, neúplnou DNA denaturací, použitím nedostatečného nebo příliš velkého množství vzorku DNA, použitím nedostatečných nebo nevhodných referenčních vzorků, problémy s kapilární elektroforézou nebo špatným postupem normalizace dat a dalšími technickými chybami. MLPA obecný protokol obsahuje technické pokyny a informace o hodnocení/normalizaci dat.

Analýza dat

Coffalyser.Net software musí být použit pro analýzu dat v kombinaci s listem pro specifickou šarži - MLPA Coffalyser list. Nejnovější verze by měla být použita a je volně ke stažení na www.mlpa.com. Použití jiného ne-proprietárního softwaru může vést k neprůkazným nebo falešným výsledkům. Pro více informací o MLPA kontrole kvality a analýze dat, viz Coffalyser.Net Manual.

Interpretace výsledků

Očekávané výsledky pro GLA sondy, detekující sekvence na X chromozomu, jsou počty kopií alel 2 (normální u ženy, duplikace u muže), 1 (heterozygotní delece u ženy, normální u muže), 3 (heterozygotní duplikace (u ženy)), nebo 0 (homozygotní delece).

Standardní odchylka všech sond v referenčních vzorcích by měla být <0,10 a kvocient dávky (DQ) referenčních sond ve vzorcích pacientů by měl být mezi 0,80 a 1,20. Pokud jsou tato kritéria splněna, následující mezní hodnoty pro DQ sond mohou být použity k interpretaci výsledků MLPA:

Copy Number status Male samples vs Male reference samples	Dosage quotient
Normal	$0.80 < DQ < 1.20$
Deletion	$DQ = 0$
Duplication	$1.65 < DQ < 2.15$
Ambiguous copy number	All other values

Copy Number status Female samples vs Female Reference samples	Dosage quotient
Normal	$0.80 < DQ < 1.20$
Homozygous deletion	$DQ = 0$
Heterozygous deletion	$0.40 < DQ < 0.65$
Heterozygous duplication	$1.30 < DQ < 1.65$
Heterozygous triplication/homozygous duplication	$1.75 < DQ < 2.15$
Ambiguous copy number	All other values

- Uspořádání sond podle chromozomální polohy usnadňuje interpretaci výsledků a může odhalit menší změny, jako jsou změny pozorované v případech mozaiky. Analýza rodičovských vzorků může být nezbytná pro správnou interpretaci komplexních výsledků.

Falešně pozitivní výsledky

Vezměte prosím na vědomí, že abnormality zjištěné jedinou sondou (nebo více po sobě jdoucích sond) mají stále značnou šanci být falešně pozitivní výsledek. Neúplná DNA denaturace (například z důvodu kontaminace solí) může vést ke snížení signálu sondy, zejména u sond umístěných v CpG ostrově nebo v jejich blízkosti. Použití dalšího kroku čištění nebo alternativní metody extrakce DNA může takové případy vyřešit. Navíc, kontaminace DNA vzorků cDNA nebo PCR amplikony z jednotlivých exonů mohou vést k falešně pozitivním duplikacím (Varga et al., 2012). Analýza nezávisle odebraného vzorku sekundární DNA může vyloučit tento typ artefaktů.

- Normální počty kopií variant u zdravých jedinců jsou popsány v databázi genomových variant: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. Uživatelé by měli vždy konzultovat nejnovější aktualizaci databáze a vědecké poznatky při interpretaci jejich výsledků.

- Ne všechny odchylky zjištěné MLPA jsou patogenní. U některých genů jsou známy intragenní delece, které vedou k velmi mírnému nebo žádnému onemocnění (Schwartz a kol., 2007). Duplikace zahrnující první nebo poslední exon genu (např. exony 1-3) nemusí v některých případech vést k inaktivaci této kopie genu.

- Změny v počtu kopií detekované referenčními sondami nebudou mít pravděpodobně žádný vztah k testovanému onemocnění.

Poznámky k interpretaci výsledků pro SALSA MLPA kit P159 GLA:

- Nepředpokládá se, že delece nebo duplikace pouze ohraničujících sond budou příčinou Fabryho choroby. Tyto sondy byly zahrnuty pouze k vymezení rozsahu velkých delecí a duplikací.

Limitace metody

- Ve většině populacích jsou hlavní příčinou genetických defektů v GLA genu malé (bodové) mutace, z nich většina nebude detekována pomocí MLPA kitu P159 GLA.
- MLPA nemůže zjistit žádné změny, které leží mimo cílovou sekvenci sond a nezjistí počet kopií neutrální inverze nebo translokace. I když MLPA nedetekuje žádné aberace, zůstává možnost, že existují biologické změny v tomto genu nebo chromozomální oblasti, ale zůstávají nedetekované.
- Změny sekvence (např. SNP, bodové mutace, malé indels) v cílové sekvenci sondy mohou způsobit falešně pozitivní výsledky. Mutace / SNP (i když > 20 nt od ligačního místa sondy) může snižovat signál sondy tím, že brání ligaci oligonukleotidové sondy nebo destabilizuje vazbu sondy na DNA.

Potvrzení výsledků

Změny v počtu kopií detekované pouze jedinou sondou vždy vyžadují ověření jinou metodou. Zřejmá delece detekovaná jedinou sondou může být způsobena např. mutací / polymorfismem, který zabraňuje ligaci nebo destabilizuje vazbu sondy na DNA. Sekvenační analýza může stanovit, zda mutace nebo polymorfismy jsou přítomny v cílové sekvenci sondy. Nalezení (heterozygotní) mutace nebo polymorfismu poukazuje na odlišnou alelu u mužů a na přítomnost dvou odlišných alel u žen ve vzorku DNA, a že falešně pozitivní výsledek MPLA byl získán.

Změny v počtu kopií detekované jednou nebo více než jednou po sobě jdoucích sond by měly být potvrzeny jinou nezávislou metodou, jako je long-range PCR, qPCR, array CGH nebo Southern blotting, kdykoli je to možné. Delece / duplikace delší než 50 kb mohou být často potvrzeny FISH.

Databáze GLA mutací: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/GLA> . Důrazně doporučujeme uživatelům ukládat pozitivní výsledky do GLA databáze. Doporučení pro nomenklaturu

popisující delece / duplikace jednoho nebo více exonů lze nalézt na adrese <http://varnomen.hgvs.org/>.

Prosím, oznamte změny v počtu kopií detekované referenčními sondami, falešně pozitivní výsledky kvůli SNP a neobvyklé výsledky (například duplikace GLA exonů 2 a 4, ale ne exonu 3) do MRC-Holland: info@mlpa.com.

Table 1. SALSA MLPA probemix P159-A5 GLA

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position (hg18) ^(a)		
		Reference	Flanking	GLA
64-121	Control fragments – see table in probemix content section for more information			
146	Reference probe 01394-L01042	Xp21		
154 →	Flanking probe 2 01274-L01640		Xq22.2; 2369 kb upstream GLA	
160	Reference probe 16675-L20191	Xp11		
166	Reference probe 02927-L03721	Xq27		
178	GLA probe 05153-L04557			Exon 1
185	GLA probe 05158-L08283			Exon 5
190	Reference probe 07653-L14466	Xp11		
196 →	Flanking probe 5 06926-L06506		Xq22.1; 48 kb downstream GLA	
206	GLA probe 05154-L28096			Exon 2
217	GLA probe 05159-L28097			Exon 6
222	GLA probe 05178-L28098			Exon 2
229	Reference probe 02922-L04201	Xp21.2		
238	GLA probe 05160-L04564			Exon 7
247	Reference probe 03650-L03063	Xp22		
256	GLA probe 05156-L04560			Exon 3
265 →	HNRNPH2 probe 05181-L04553		Xq22.1; 0.3 kb upstream GLA	
275	Reference probe 04124-L03481	Xq23		
283 →	Flanking probe 3 05183-L04555		Xq22.1; 2 kb downstream GLA	
291 →	Flanking probe 1 05856-L05256		Xq22.3; 7144 kb upstream GLA	
298	Reference probe 06476-L26217	Xp22		
310	Reference probe 03493-L02870	Xq28		
319	GLA probe 06500-L04561			Exon 4
328	Reference probe 12605-L13689	Xq12		
337 →	Flanking probe 4 06911-L06491		Xq22.1; 26 kb downstream GLA	
355	Reference probe 13524-L14330	Xq21.2		

(a) Číslování exonů použité v tomto popisu produktu P159-A5 GLA a v Coffalyser. Net je číslování exonů z transkriptu RefSeq NM_000169.2, které je identické s LRG_672 sekvencí. Číslování exonů a použité sekvence NM jsou od 03/2018, ale mohou být změněny (např. NCBI) po vydání popisu produktu.

→ Doprovodná/ohraničující sonda: Zahrnuta, aby pomohla určit rozsah delece/ duplikace. Změna v počtu kopií pouze těchto sond nebo referenčních sond pravděpodobně nesouvisí s testovaným stavem.

Table 2. P159 probes arranged according to chromosomal location

Length (nt)	SALSA MLPA probe	GLA exon ^(a)	Ligation site ^(b) NM_000169.2	Partial sequence ^(c) (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
291	05856-L05256	Flanking probe 1		TGATGGAATTCC-AGGGCCACCCAGG	4775.3 kb
154	01274-L01640	Flanking probe 2		AGCCACAAAGCA-GACTAGCCAGCC	2368.6 kb
265	05181-L04553	HNRNPH2 gene		TTAGAGGTTGGT-GTGTGGGTGGGA	0.5 kb
GLA probes					
		<i>start codon</i>	<i>111-113 (Exon 1)</i>		
178	05153-L04557	Exon 1	221-222	AATGGATTGGCA-AGGACGCCTACC	3.8 kb
206	05154-L28096	Exon 2	329-330	ATGGAGATGGCA-GAGCTCATGGTC	0.1 kb
222	05178-L28098	Exon 2	427-428	AGAAGGCAGACT-TCAGGCAGACCC	2.1 kb
256	05156-L04560	Exon 3	564-565	GTTTTGGATACT-ACGACATTGATG	1.0 kb
319	06500-L04561	Exon 4	697-698	TAGGACTGGCAG-AAGCATTGTGTA	1.8 kb
185	05158-L08283	Exon 5	789-790	GCAATCACTGGC-GAAATTTGCTG	0.5 kb
217	05159-L28097	Exon 6	1057-1058	GGATAAGGACGT-AATTGCCATCAA	0.5 kb
238	05160-L04564	Exon 7	1237-1238	GGGTAAAGGAGT-GGCCTGTAATCC	2.1 kb
		<i>stop codon</i>	<i>1398-1400 (Exon 7)</i>		
283	05183-L04555	Flanking probe 3		AGAGCCATCAAT-ACAATTCGCCTT	24.2 kb
337	06911-L06491	Flanking probe 4		AAATTTCAATCA-TTGAAAGGTTCC	21.7 kb
196	06926-L06506	Flanking probe 5		TCCCACTTTCAA-AATTCTTCTGAG	

(a) Číslování exonů použité v tomto popisu produktu P159-A5 GLA a v Coffalyser. Net je číslování exonů z transkriptu RefSeq NM_000169.2, které je identické s LRG_672 sekvencí. Číslování exonů a použité sekvence NM jsou od 03/2018, ale mohou být změněny (např. NCBI) po vydání popisu produktu.

(b) Ligační místa P159 GLA MLPA sond jsou označena podle sekvence RefSeq NM_000169.2, která obsahuje 7 exonů.

(c) Pouze část sekvence sond je uvedena. Kompletní sekvence sond jsou k dispozici na www.mlpa.com. Prosím, dejte nám vědět, pokud najdete nějaké chyby na info@mlpa.com.

↪ Dopravná/ohraničující sonda: Zahrnuta, aby pomohla určit rozsah delece/ duplikace. Změna v počtu kopií pouze těchto sond nebo referenčních sond pravděpodobně nesouvisí s testovaným stavem.

Související SALSA MLPA kity

- P164 IDS: Obsahuje sondy pro gen IDS, zapojeného do dalšího X-vázaného onemocnění skladování lysozomální.

Reference

- Schouten JP et al. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30:e57.
- Schiffmann R (2009). Fabry disease. *Pharmacol therapeut.* 122:65-77.
- Schwartz M et al. (2007). Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Hum Mutat.* 28:205.
- Varga RE et al. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Anal Biochem.* 421:799-801.

Vybrané publikace používající kit SALSA MLPA P159 GLA


- Baptista MV et al. (2010). Mutations of the GLA gene in young patients with stroke the PORTYSTROKE study—screening genetic conditions in Portuguese young stroke patients. *Stroke.* 41:431-436.
- De Schoenmakere G et al. (2008). Two-tier approach for the detection of alpha-galactosidase A deficiency in kidney transplant recipients. *Nephrol dial transpl.* 23:4044-4048.
- Ferreira S et al. (2015). The alpha-galactosidase A p. Arg118Cys variant does not cause a Fabry disease phenotype: data from individual patients and family studies. *Mol genet metab.* 114:248-258.
- Ferri L et al. (2012). Fabry disease: polymorphic haplotypes and a novel missense mutation in the GLA gene. *Clin genet.* 81:224-233.
- Ferri L et al. (2016). Pitfalls in the detection of gross gene rearrangements using MLPA in Fabry disease. *Clin Chim Acta.* 452:82-86.
- Georgiou T et al. (2016). Novel GLA Deletion in a Cypriot Female Presenting with Cornea Verticillata. *Case Rep Genet.* 2016:5208312.
- Gervas-Arruga J et al. (2015). Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the α -galactosidase A (GLA) gene. *BMC genet.* 16:1.
- Higuchi T et al. (2016). Identification of Cryptic Novel alpha-Galactosidase A Gene Mutations: Abnormal mRNA Splicing and Large Deletions. *JIMD Rep.* 30:63-72.
- Sheppard MN (2011). The heart in Fabry's disease. *Cardiovasc Pathol.* 20:8-14.
- Torra R & Ortíz A (2012). Fabry disease: the many faces of a single disorder. *Clinical kidney journal.* 5:379-382.

- Yoshimitsu M et al. (2011). Identification of novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with Fabry disease: pitfalls of mutation analyses in patients with low alpha-galactosidase A activity. J Cardiol. 57:345-353.

Historie produktu P159

P159 Product history	
Version	Modification
A5	The length of the Y control fragment has been elongated from 118 nt to 121 nt.
A4	Four reference probes have been replaced.
A3	The 88, 96 and 118 nt control fragments have been replaced.
A2	Two reference probes have been replaced. Three extra reference probes, probes for genes nearby <i>GLA</i> and extra control fragments at 88, 96, 100 and 105 nt have been added.
(A)	First release.

Implemented changes in the product description
<p><i>Version A5-01 – 19 April 2017 (04)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Product description restructured and adapted to a new template. <p><i>Version 13 – 03 March 2017 (55)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Changed "HNRPH2" to the more common "HNRNPH2" in Table 2. - Several minor textual changes. <p><i>Version 12 – 10 January 2017 (55)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Product description adapted to a new lot (lot number added, small changes in Table 1, new pictures included). - Various minor textual changes on page 1. - Related product added. - Table 1 footnotes updated to lot A5. <p><i>Version 11 – 17 August 2016 (55)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - New reference added on page 1. - Manufacturer's address adjusted. - Minor textual and layout changes. <p><i>Version 10 – 21 January 2015 (54)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Product description adapted to a new lot (lot number changed, small changes in Table 1 and Table 2, new pictures included). - Various textual changes. - Updated link for "Database of Genomic Variants". <p><i>Version 09 (48)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Electropherogram pictures using the new MLPA buffer (introduced in December 2012) added.

More information: www.mlpa.com ; www.mlpa.eu	
	MRC-Holland bv; Willem Schoutenstraat 1 1057 DL, Amsterdam, The Netherlands
E-mail	info@mlpa.com (information & technical questions); order@mlpa.com (orders)
Phone	+31 888 657 200

	EUROPE* 
	ALL OTHER COUNTRIES

*comprising EU (candidate) member states and members of the European Free Trade Association (EFTA).
The product is for RUO is all other European countries.