



IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

SNP Biyoteknoloji Ltd. Şti.

Spinal Müsküler Atrofi (SMA)

- ▶ SMA, Spinal kord ve beyin kökündeki ön boynuz hücrelerinin ilerleyici / progressive dejenerasyon ve kaybı sonucu ortaya çıkan kas zayıflığı ve atrofisi ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır.
- ▶ Otozomal resesif olarak kalıtılır.
- ▶ İnsidansı 1/6000 – 1/10.000 canlı doğum.
- ▶ Taşıyıcı sıklığı coğrafyaya bağlı olarak 1/40 – 1/60 arasında değişiklik gösterir.
- ▶ Ebeveynler taşıyıcı ise %25 oranında hasta çocuğa sahip olma riskleri vardır.
- ▶ Yılda yaklaşık 200 SMA hastası çocuk doğumu gerçekleşmektedir.



Spinal Müsküler Atrofi (SMA)

- ▶ 4 tip SMA vardır;
 - ▶ **Tip I** : En ciddi tipi. İnfantil akut SMA veya Werdnig-Hoffman hastalığı olarak bilinir. Tüm vakaların %60'ını oluşturur.
 - ▶ **Tip II**: İnfantil kronik SMA.
 - ▶ **Tip III**: Juvenil tip SMA, Wohlfart-Kugelberg-Welander hastalığı olarak da bilinir.
 - ▶ **Tip IV**: Erişkin başlangıçlı SMA.



SMA Genetik Tanı

- ▶ SMN1 geninde delesyon / duplikasyon analizi yapılır.
- ▶ Kantitatif PCR ve MLPA yöntemleri ile % 95-98 oranında tanı konulabilir.
- ▶ DNA dizi analizi ile %2 – 5 oranında gen içi patojenik diğer mutasyonlar da taranabilir.
- ▶ Piyasadaki SMA genetik tanı kit yöntemleri;
 - ▶ MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe) (Hollanda)
 - ▶ Digital Drop PCR (ddPCR) (Bio-Rad/USA).
 - ▶ Taqman Allelic Discrimination (Thermo Scientific/USA).



SMA Genetik Tanı

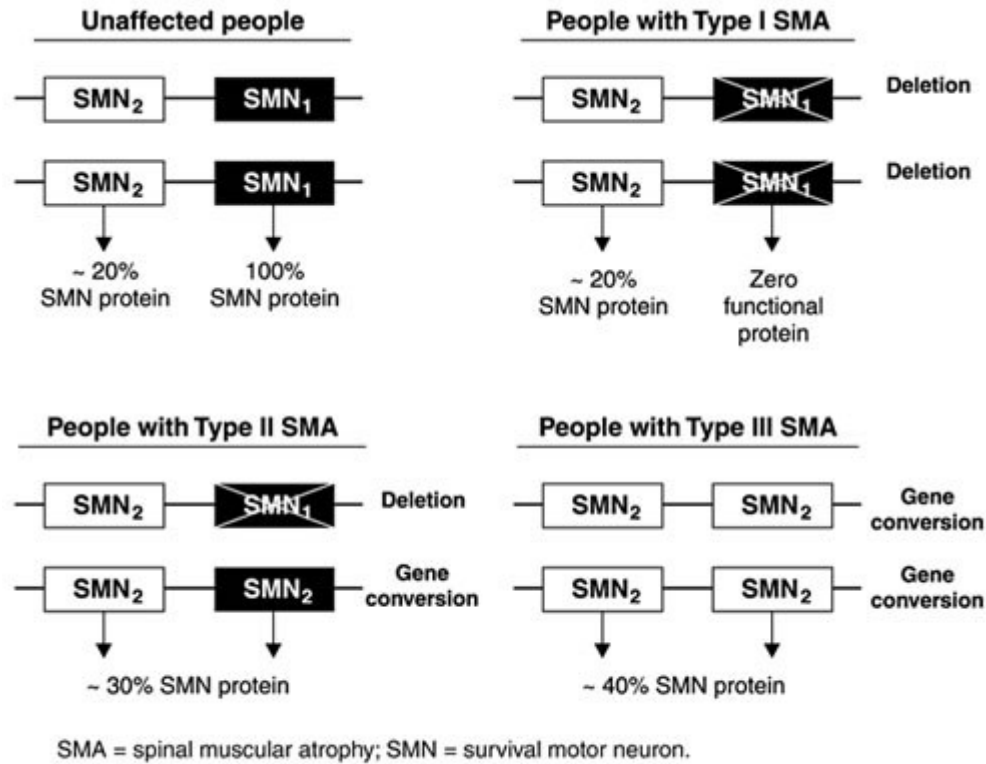


Figure 2 - Genotypes of people affected and unaffected by SMA

SMA Genetik Tanı

- ▶ MLPA ve ddPCR kitlerinin dezavantajları;
 - ▶ Prosedür sayısının fazlalığı (pcr, ampikon yükleme, özel ekipman ile analiz).
 - ▶ Deneyimli personel gerekliliği.
 - ▶ Test süresinin 1 gün olması.
 - ▶ Ara prosedürlerden kaynaklanan hata payı.
 - ▶ Maliyet
- ▶ Taqman Allelic Discrimination dezavantajı;
 - ▶ Dağılımdaki düşük hassasiyet/özgüllük nedeniyle yanlış sonuç verme.



IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

- ▶ 5' Nükleaz yöntemi ve Akıllı Oran (**Intelligent Ratio - IR**)⁽¹⁾ kombinasyonu ile tasarlanmıştır.
- ▶ SMN1 Ekzon 7 delesyonu ve 840. pozisyonundaki C>T değişimi.
- ▶ SMN1 Ekzon 8 delesyonu.
- ▶ Kit «**Ready-to-use**» master miks içerir.
- ▶ DNA ölçümüne gerek yoktur.



IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

- ▶ Sonuçlar özel bir yazılım (IntRa-Q yazılımı) aracılığıyla yüksek doğruluk ve hassasiyet ile analiz edilir.
- ▶ Test süresi 96 örnek için maksimum 50 dk'dır.
- ▶ Kolay, hızlı ve tekrar edilebilir.
- ▶ Özel bir donanım ve nitelikli eleman gerektirmez.
- ▶ Maliyet etkindir.



IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

► Prosedür;

Tüp	Bölge	Boya
Master Miks	SMN1 Ekzon 7	FAM
	SMN1 Ekzon 8	HEX
	Referans Geni	Texas RED

► DNA Ekstraksiyonu;

- Spin kolon DNA ekstraksiyonu
- Otomatik DNA ekstraksiyonu



IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

► Prosedür;

- 15 µl master miks içerisine 5 µl DNA eklenmesi yeterlidir. *.

► PCR Programı;

96 °C	2 sn.	Kan için 30 döngü & DBS için 35 döngü
60 °C	40 sn.	

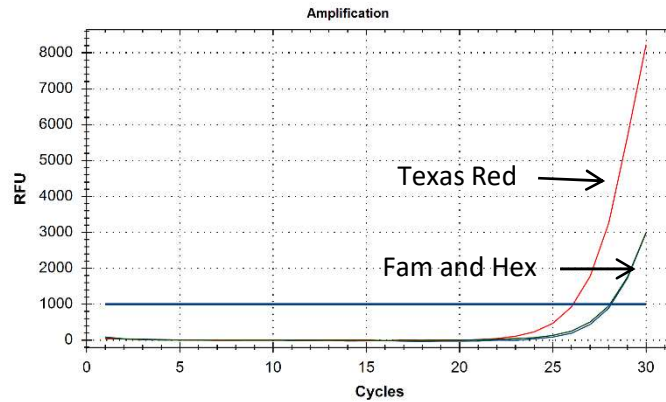
► PCR süresi;

- Kan örnekleri için **43 dakika**.
- DBS örnekleri için **48 dakika**.

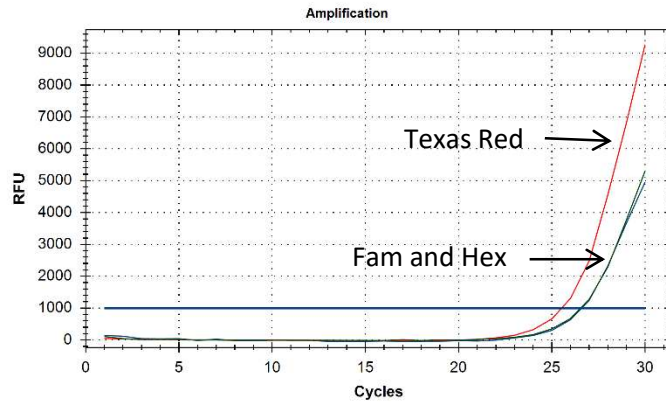
*** Beyaz PCR tüpü/ Strip kullanılması tavsiye edilir.**

IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

- Amplifikasyon pik görüntüsü;



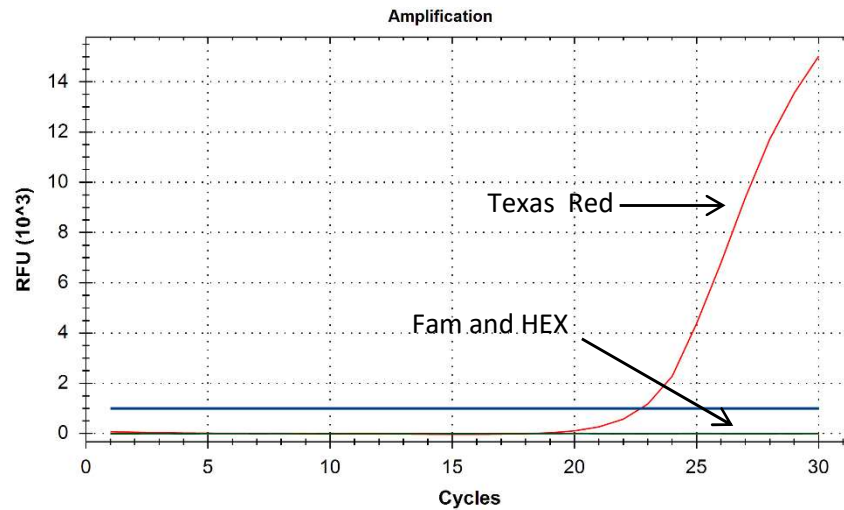
TAŞIYICI



NORMAL

IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

- Amplifikasyon pik görüntüsü;



HOMOZİGOT DELESYON

IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

- ▶ **Taşıyıcı ve homozigot delesyon** tespiti için;
 - ▶ Intra-Q yazılımı uyumluluğundan dolayı kit yalnızca **Bio-Rad CFX96** ile kullanılabilir.
- ▶ Sadece **homozigot delesyon** tespiti için kit tüm cihazlarla uyumludur.



IntRa-Q Yazılımı

- ▶ IntRa-Q yazılımı ile sonuçların görüntülenmesi – Ekzon 7

Data Analysis [INTRA - EXON 7]

Dosya Dil Hakkında INTRA - EXON 7 Yeni

Analiz Ayarlar

Dosya seç C:\Users\Dem\Desktop\SMA\SMA ANALIZ\IntRaFast-Q\SMA-Deneme-46-52980_09062021-tr - Quantification Cq Results.xls Rapor

INTRA - EXON 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Örnek 1 Carrier 8.25	Örnek 9 Carrier 11.13										
B	Örnek 2 Carrier 11.43	Örnek 10 Carrier 10.16										
C	Örnek 3 Carrier 14.49	Örnek 11 No DNA -2										
D	Örnek 4 Wild-Type 5.27	Örnek 12 Wild-Type 3.40										
E	Örnek 5 Wild-Type 2.27	Örnek 13 Wild-Type 3.89										
F	Örnek 6 Wild-Type 2.16	Örnek 14 Wild-Type 2.53										
G	Örnek 7 Wild-Type 4.27	Örnek 15 Wild-Type 4.13										
H	Örnek 8 Homozygous -1	Örnek 16 Wild-Type 4.65										

IntRa-Q Yazılımı

- IntRa-Q yazılımı ile sonuçların görüntülenmesi – Ekzon 8

Data Analysis [INTRA - EXON 8]

Dosya Dil Hakkında INTRA - EXON 8 Yeni

Analiz Ayarlar

Dosya seç: C:\Users\Demir\Desktop\SMA\SMA ANALIZ\IntRaFast-Q-SMA-Deneme-46-52980_09062021-tr - Quantification Cq Results.xls Rapor

INTRA - EXON 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Örnek 1 Carrier 6.96	Örnek 9 Carrier 10.22										
B	Örnek 2 Carrier 9.51	Örnek 10 Carrier 12.29										
C	Örnek 3 Carrier 11.19	Örnek 11 No DNA -2										
D	Örnek 4 Wild-Type 2.64	Örnek 12 Wild-Type 4.09										
E	Örnek 5 Wild-Type 1.94	Örnek 13 Wild-Type 4.75										
F	Örnek 6 Wild-Type 1.99	Örnek 14 Wild-Type 2.51										
G	Örnek 7 Wild-Type 3.29	Örnek 15 Wild-Type 4.60										
H	Örnek 8 Homozygous 965.70	Örnek 16 Wild-Type 5.20										

IntRaFast-Q SMA Tarama Kiti

GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS
Volume 24, Number 9, 2020
© Mary Ann Liebert, Inc.
Pp. 1–9
DOI: 10.1089/gtmb.2020.0085

Intelligent Ratio: A New Method for Carrier and Newborn Screening in Spinal Muscular Atrophy

Busranur Cavdarli,¹ Fatma Nihal Ozturk,² Sezen Guntekin Ergun,³ Mehmet Ali Ergun,⁴
Ozlem Dogan,⁵ and Emriye Ferda Percin⁴

Aim: Spinal muscular atrophy (SMA) is an inherited, autosomal recessive neuromuscular disease that causes high morbidity and mortality. The prevalence is 1–2/100,000, while the incidence is 1/6000–1/10,000 among live births. Due to the high carrier frequency (1/40–1/60) of SMA, screening can prevent new cases. The aim of the current study was to present the development of a new, quantitative, real-time, polymerase chain reaction (PCR)-based screening test that uses an intelligent ratio (IR) for analyses, as well as a comparison of the results with the gold standard.

Materials and Methods: Included in the study were 100 patients with various risk genotypes for survivor motor neuron 1 (*SMN1*) and *SMN2* genes whose genetics had been previously investigated using multiplex ligation probe amplification (MLPA). A combination of the 5' nuclease assay and allele-specific PCR was used to

Kaynaklar:

- ▶ 1. B. Cavdarli,1F. N. Ozturk, S. G. Ergun, M. A. Ergun, O. Dogan and E. F. Percin. "Intelligent Ratio:A New Method for Carrier and Newborn Screening in Spinal Muscular Atrophy". Genetic Testing And Molecular Biomarkers, Volume 24, Number 9, 2020.
- ▶ 2. Shin S1, Park SS, Hwang YS, Lee KW, Chung SG, Lee YJ, Park MH. Deletion of SMN and NAIP genes in Korean patients with spinal muscular atrophy. J Korean Med Sci. 2000;15:93-8.
- ▶ 3. Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, Cook SF, Lochmüller H. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. Orphanet J Rare Dis. 2017;12:124.
- ▶ 4. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy. Hum Mutat. 2000;15:228–37.
- ▶ 5. Boardman FK, Young PJ, Warren O, Griffiths FE. The role of experiential knowledge within attitudes towards genetic carrier screening: A comparison of people with and without experience of spinal muscular atrophy. Health Expect. 2017 Jul 13. doi: 10.1111/hex.12602.
- ▶ 6. Shuji Ogino, Debra G. B. Leonard, Hanna Rennert, and Robert B. Wilson. Spinal Muscular Atrophy Genetic Testing Experience at an Academic Medical Center. J Mol Diagn. 2002 Feb; 4(1): 53–58.
- ▶ 7. Han C. Phan, Jennifer L. Taylor, Harry Hannon and Rodney Howel. Newborn screening for spinal muscular atrophy: Anticipating an imminent need. Seminars in Perinatology. April 2015 Volume 39, Issue 3, Pages 217–229.
- ▶ 8. Thomas W Prior, Narasimhan Nagan, Elaine A Sugarman, Sat Dev Batish and Corey Braastad. Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing. Genetics in Medicine volume 13, pages 686–694 (2011)
- ▶ 9. Jin He, Qi-Jie Zhang, Qi-Fang Lin, Ya-Fang Chen, Xiao-Zhen Lin, Min-Ting Lin, Shen-Xing Murong, Ning Wang and Wan-Jin Chen. Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy. Gene Volume 518, Issue 2, 15 April 2013, Pages 325-329
- ▶ 10. Amara A1, Adala L, Ben Charfeddine I, Mamaï O, Mili A, Lazreg TB, H'mida D, Amri F, Salem N, Boughammura L, Saad A and Gribaa M.. Correlation of SMN2, NAIP, p44, H4F5 and Occludin genes copy number with spinal muscular atrophy phenotype in Tunisian patients.Eur J Paediatr Neurol. 2012 Mar;16(2):167-74
- ▶ 11. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Genetics in collaboration with committee members Britton Rink, Stephanie Romero, Joseph R Biggio Jr, Devereux N. Saller Jr. and Rose Giardine.Committee Opinion. Number 691. March 2017.