

artus[®] TPMT LC PCR Kit

Εγχειρίδιο



24 (Αρ. Καταλόγου 4622063)

Διαγνωστικό προϊόν in vitro ποιοτικού προσδιορισμού

Για τη χρήση με το όργανο *LightCycler*[®]

Απρίλιος 2007 – Έκδοση 1η



4622063



1046980EL



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

MAT

1046980EL

artus TPMT LC PCR Kit

Μάρκες και αποποιήσεις
QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Group); *LightCycler*®, COBAS® AMPLICOR® (Roche Diagnostics).

Εμπορικά ονόματα, σήματα κ.τ.λ. που αναφέρονται στο εγχειρίδιο αυτό είναι κατοχυρωμένα ακόμα και αν αυτά δεν έχουν χαρακτηριστεί.

Το *artus* TPMT LC PCR Kit είναι σημειωμένο CE διαγνωστικό kit σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό 98/79/EC σχετικό με τη διαγνωστική *in vitro*. Δεν είναι διαθέσιμο σε όλες τις χώρες.

Τα kit QIAamp προορίζονται γενικά για εργαστηριακή χρήση. Τα δεδομένα ή η περιγραφή του προϊόντος δεν προβλέπονται για τη παροχή πληροφοριών όσο αφορά την διάγνωση, προφύλαξη και τη θεραπεία μιας ασθένειας.

Η αγορά των kit *artus* PCR περιλαμβάνει περιορισμένη άδεια χρήσης αυτών στη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στη διαγνωστική *in vitro* για ανθρώπους και ζώα, σε συνδυασμό με θερμικό κυκλοποιητή του οποίου η χρήση στην αυτόματη εκτέλεση της διαδικασίας της PCR καλύπτεται με προπληρωμένο τέλος αδείας το οποίο καταβάλλεται είτε στην Applied Biosystems ή μέσω της αγοράς εξουσιοδοτημένου θερμικού κυκλοποιητή. Η διαδικασία της PCR είναι κατοχυρωμένη μέσω αντίστοιχων διεθνών προστατευομένων δικαιωμάτων των U.S. πατεντών με τα νούμερα 5,219,727 και 5,322,770 και 5,210,015 και 5,176,995 και 6,040,166 και 6,197,563 και 5,994,056 και 6,171,785 και 5,487,972 και 5,804,375 και 5,407,800 και 5,310,652 και 5,994,056 ιδιοκτησία της F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007 QIAGEN, όλα τα δικαιώματα είναι κατοχυρωμένα.

Πίνακας περιεχομένων

1. Περιεχόμενο	4
2. Αποθήκευση	4
3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές	5
4. Γενικά μέτρα ασφάλειας.....	5
5. Σχετικές πληροφορίες.....	6
6. Αρχή της αντίδρασης Real-Time PCR.....	7
7. Περιγραφή προϊόντος	7
8. Πρωτόκολλο.....	8
8.1 Απομόνωση DNA	8
8.2 Προετοιμασία της PCR.....	9
8.3 Προγραμματισμός του οργάνου <i>LightCycler</i> [®]	12
9. Αξιολόγηση	15
10. Αντιμετώπιση προβλημάτων	20
11. Ειδικά χαρακτηριστικά	21
11.1 Αναλυτική ευαισθησία.....	21
11.2 Ειδικότητα.....	22
11.3 Διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα	22
12. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος	22
13. Πληροφορίες ασφάλειας	23
14. Ποιοτικός έλεγχος.....	23
15. Βιβλιογραφία	23
16. Ερμηνεία των συμβόλων	24

artus[®] TPMT LC PCR Kit^{*}

Για τη χρήση με το όργανο *LightCycler[®]*.

1. Περιεχόμενο

	Ονομασία και περιεχόμενο	Αρ. είδους 4622063 24 αντιδράσεις
Μπλε	TPMT LC Master A	2 x 12 rxns
Μπλε	TPMT LC Master B	2 x 12 rxns
Κίτρινο	TPMT LC Mg-Sol [‡]	1 x 400 µl
Κόκκινο	TPMT LC Control Aw	1 x 200 µl
Κόκκινο	TPMT LC Control Av	1 x 200 µl
Κόκκινο	TPMT LC Control B	1 x 200 µl
Λευκό	Water (PCR grade)	1 x 1.000 µl

[‡] Mg-Sol = Διάλυμα μαγνησίου

2. Αποθήκευση

Τα υλικά του artus TPMT LC PCR Kit αποθηκεύονται στους -20 °C και διατηρούνται μέχρι την ημερομηνία που αναγράφεται στην ετικέτα. Η επαναληπτική ψύξη/απόψυξη (> 2 x) θα πρέπει να αποφεύγεται, γιατί με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η ευαισθησία. Για το λόγο αυτό, εάν η χρήση δεν είναι τακτική, θα πρέπει να γίνεται επιμερισμός των αντιδραστηρίων. Εάν παραστεί ανάγκη αποθήκευσης των υλικών στους +4 °C, το χρονικό διάστημα αποθήκευσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις πέντε ώρες.

^{*} TPMT = Θείο-μεθυλοτρανσφεράση της θειοπουρίνης.

3. Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά και συσκευές

- Γάντια εργαστηρίου χωρίς πούδρα
- Κιτ απομόνωσης DNA (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**)
- Πιπέτες (ρυθμιζόμενες)
- Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια 2 ml
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Αρ. κατ. 2 158 850) για την εγκατάσταση ενός αρχείου *Crosstalk Color Compensation*
- Τριχοειδείς σωλήνες *LightCycler*[®] (20 µl)
- Cooling Block *LightCycler*[®]
- Όργανο *LightCycler*[®]
- Capping Tool *LightCycler*[®]

4. Γενικά μέτρα ασφαλείας

Ο χρήστης πρέπει πάντοτε να λαμβάνει υπόψη του τα ακόλουθα σημεία:

- Αναλύστε **το ανώτερο δώδεκα δείγματα** ανά διαδικασία της PCR. Εάν αναλυθούν περισσότερα από δώδεκα δείγματα παράλληλα, μπορεί να παρατηρηθεί μία τεχνικά εξηρημένη άτυπη συμπεριφορά της καμπύλης τήξης της ετεροζυγωτικής παραλλαγής nt 238.
- Χρησιμοποίηση στείρων ρυγχών πιπέτας με φίλτρο.
- Το θετικό υλικό (δείγματα, πρότυπα ελέγχου, προϊόντα πολλαπλασιασμού) πρέπει να καθαρίζεται, αποθηκεύεται και να προστίθεται στην αντίδραση σε διαφορετικό χώρο από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.
- Πλήρη απόψυξη όλων των υλικών σε θερμοκρασία δωματίου, πριν από τη χρήση τους.
- Στη συνέχεια καλή ανάμιξη των υλικών και εκτέλεση μιας σύντομης φυγοκέντρωσης.
- Η εργασία πρέπει να γίνεται μεθοδικά και γρήγορα, σε πάγο ή σε Cooling Block *LightCycler*[®].

5. Σχετικές πληροφορίες

Εκτός από την επιρροή της ηλικίας, φύλου, διατροφής και της φαρμακευτικής αγωγής, τη δραστηριότητα του ενζύμου μπορούν να επηρεάσουν κυρίως γενετικοί παράγοντες. Είναι γνωστό ότι ασθενείς που εμφανίζουν γενετικά εξαρτημένη καμμία ή ελάχιστη δραστηριότητα του ενζύμου θειο-μεθυλοτρανσφεράση της θειοπουρίνης (TPMT) παρουσιάζουν, υπό αγωγή με τη 6-θειογουανίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη ή αζαθειοπρίνη, υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών παρενεργειών [π.χ. αιματολογικές τοξικότητες, ηπατικές τοξικότητες (1 - 3)]. Μία εξέταση του γονιδίου TPMT επιτρέπει τον υπολογισμό του γενετικά εξαρτημένου κινδύνου, των από τη θεραπεία επιφερομένων παρενεργειών. Φορείς μιας γενετικής παραλλαγής του γονιδίου TPMT μπορούν να εντοπισθούν πριν από το ξεκίνημα μιας θεραπείας και εάν είναι απαραίτητο να νοσηλευθούν με εναλλακτική θεραπεία ή σαφώς με χαμηλότερη δόση φαρμάκων.

Η ενζυματική δραστηριότητα της θειο-μεθυλοτρανσφεράσης της θειοπουρίνης προσδιορίζεται μεταξύ άλλων μέσω μεταβολών στο γονίδιο TPMT. Γενετικές μεταβολές μπορούν π.χ. να έχουν σαν επακόλουθο μία αλλαγή θέσεως των αμινοξέων. Η επομένως μεταβαλλόμενη μοριακή διάταξη του ενζύμου επιδρά στη δραστηριότητα του ενζύμου. Οι συχνότερες γενετικές παραλλαγές του γονιδίου TPMT αφορούν τα νουκλεοτίδια (nt) 238, 460 και 719. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και άλλες γενετικές παραλλαγές οι οποίες όμως έχουν παρατηρηθεί σπάνια ή μία μόνο φορά σε κάποιο πληθυσμό. Περίπου 10 % του λευκού πληθυσμού παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα της TPMT κατά 75 %, ενώ 0,3 % περίπου του πληθυσμού αυτού δεν εμφανίζουν καταμετρητή ενζυματική δραστηριότητα. Συγκριτικές εξετάσεις μεταξύ γενοτύπου και φενοτύπου έδειξαν μία συσχέτιση 87 % μεταξύ της γονοτύπωσης των γονιδίων και της δραστηριότητας της TPMT.

Η γονοτύπωση των γονιδίων μπορεί να βοηθήσει στην ευνοϊκότερη φαρμακευτική αγωγή για κάθε άτομο. Η ανάλυση του γονιδίου TPMT είναι σημαντική, ιδιαίτερα κατά τη θεραπεία όγκου με θειοπουρίνη, θεραπεία χρόνιων φλεγμονών του εντέρου ή μετά από μεταμοσχεύσεις και έτσι μπορεί

να μειωθούν ανεπιθύμητες παρενέργειες και επομένως το θεραπευτικό κόστος (μακρόχρονη παραμονή στο νοσοκομείο κτλ.).

6. Αρχή της αντίδρασης Real-Time PCR

Η γενετική διάγνωση με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στον πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του ανθρώπου. Στην αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου, η ανίχνευση γίνεται με τη βοήθεια φθορίζουσων χρωστικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές είναι συνήθως συνδεδεμένες σε ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι προσκολλώνται ειδικά στο προϊόν του πολλαπλασιασμού της PCR. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης που ακολουθεί αμέσως μετά τον πολλαπλασιασμό με την PCR καθιστά δυνατή την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση των γονιδιακών παραλλαγών. Επειδή τα σωληνάρια των δειγμάτων δεν χρειάζεται να ανοιχθούν μετά τη διαδικασία της PCR, ο κίνδυνος επιμόλυνσης μειώνεται σημαντικά (Mackay, 2004).

7. Περιγραφή προϊόντος

Με το *artus* TPMT LC PCR Kit εξετάζεται το DNA του ανθρώπου απλά γρήγορα και με σιγουριά για την ύπαρξη μιας κλινικά σημαντικής γενετικής παραλλαγής στο γονίδιο TPMT. Η ανάλυση αυτή καθιστά δυνατή την εκτίμηση επιφερομένων κινδύνων από τη θεραπεία, π.χ. μέσω της αγωγής με θειοπουρίνες.

Η ανάλυση διεξάγεται μέσω της διάγνωσης των γενετικών παραλλαγών εντός του γονιδίου TPMT, με τη βοήθεια του οργάνου *LightCycler*[®]. Τα αντιδραστήρια περιέχουν εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος του γονιδίου TPMT του ανθρώπου καθώς και φθοριομαρκασμένους ανιχνευτές για τη διάγνωση των γενετικών παραλλαγών στις θέσεις των νουκλεοτιδίων nt 238 του εξονίου 5, nt 460 του εξονίου 7 και nt 719 του εξονίου 10. Επιπλέον για τον έλεγχο των αντιδράσεων, ελέγχονται παράλληλα τα θετικά πρότυπα ελέγχου A (A_w / A_v) και B σε ξεχωριστές αναλύσεις.

Επειδή η εξέταση αυτή βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του γενωμικού DNA του ανθρώπου, πρέπει να γίνονται εμφανή σήματα φθορισμού στο τμήμα της καμπύλης τήξης, ανεξάρτητα από την παρουσία ενός εναλλακτικού αλληλόμορφου. Η απουσία σήματος φθορισμού σημαίνει μη αποτελεσματική εκχύλιση του DNA ή αναστολή της PCR. Έτσι σε αυτή τη γενετική εξέταση δεν είναι απαραίτητος ένας επιπρόσθετος εσωτερικός έλεγχος.

Λάβετε υπόψη: Αποφασιστικό ρόλο για την αξιολόγηση παίζουν τα σήματα της ανάλυσης της καμπύλης τήξης. Κατά τη χρησιμοποίηση του *artus* TPMT LC PCR Kit, στη διάρκεια της διαδικασίας *LightCycler*[®], στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρείται ποσοτικός πολλαπλασιασμός. Αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά την ανάλυση της καμπύλης τήξης.

8. Πρωτόκολλο

8.1 Απομόνωση DNA

Κιτ απομόνωσης DNA από αίμα διατίθενται από διάφορους κατασκευαστές. Ανάλογα με το πρωτόκολλο του επιλεγμένου κατασκευαστή, χρησιμοποιήστε την καθορισμένη ποσότητα δείγματος για απομόνωση και εκτελέστε την απομόνωση DNA σύμφωνα με τις οδηγίες. Συνιστώνται τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης:

Υλικό δείγματος	Κιτ απομόνωσης	Αρ. καταλόγου	Κατασκευαστής
Αίμα	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	51 104	QIAGEN

- Το *artus* TPMT LC PCR Kit δεν είναι κατάλληλο για διαδικασίες απομόνωσης που λειτουργούν με βάση τη **φαινόλη**.
- Σε διαδικασίες απομόνωσης, στις οποίες χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης που περιέχει **αιθανόλη**, βεβαιωθείτε οπωσδήποτε ότι πριν από την εκχύλιση εκτελείται ένα επιπλέον βήμα φυγοκέντρησης (3 λεπτά, 13.000 στρ./λεπτό) για την απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης. Αυτό εμποδίζει πιθανές αναστολές της PCR.

8.2 Προετοιμασία της PCR

Λάβετε υπόψη: Αναλύστε το ανώτερο δώδεκα δείγματα ανά διαδικασία της PCR. Εάν αναλυθούν περισσότερα από δώδεκα δείγματα παράλληλα, μπορεί να παρατηρηθεί μία τεχνικά εξηρημένη άτυπη συμπεριφορά της καμπύλης τήξης της ετεροζυγωτικής παραλλαγής nt 238.

Βεβαιωθείτε ότι το Cooling Block (μονάδα ψύξης) με τους περιεχόμενους προσαρμογείς (εξάρτημα του οργάνου *LightCycler*[®]) έχει προψυχθεί στους +4°C. Τοποθετήστε τον απαραίτητο για τις προγραμματισμένες αντιδράσεις αριθμό τριχοειδών σωληναρίων *LightCycler*[®] στον προσαρμογέα του Cooling Block. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται πλήρως πριν από την έναρξη της εξέτασης σε θερμοκρασία δωματίου, να αναμιγνύονται καλά (με επαναληπτική αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα ή με σύντομο στροβιλισμό) και τελικά να φυγοκεντρούνται για σύντομο χρονικό διάστημα.

Σε κάθε διαδικασία λάβετε υπόψη ότι στο *artus* TPMT LC PCR Kit περιλαμβάνονται θετικά πρότυπα ελέγχου (*TPMT LC Control Aw*, *TPMT LC Control Av* και *TPMT LC Control B*) και ένα αρνητικό πρότυπο ελέγχου (*Water, PCR grade*).

Κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων της PCR χρησιμοποιήστε το ακόλουθο σχήμα επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε και τη σχηματική επισκόπηση στην Εικ. 1):

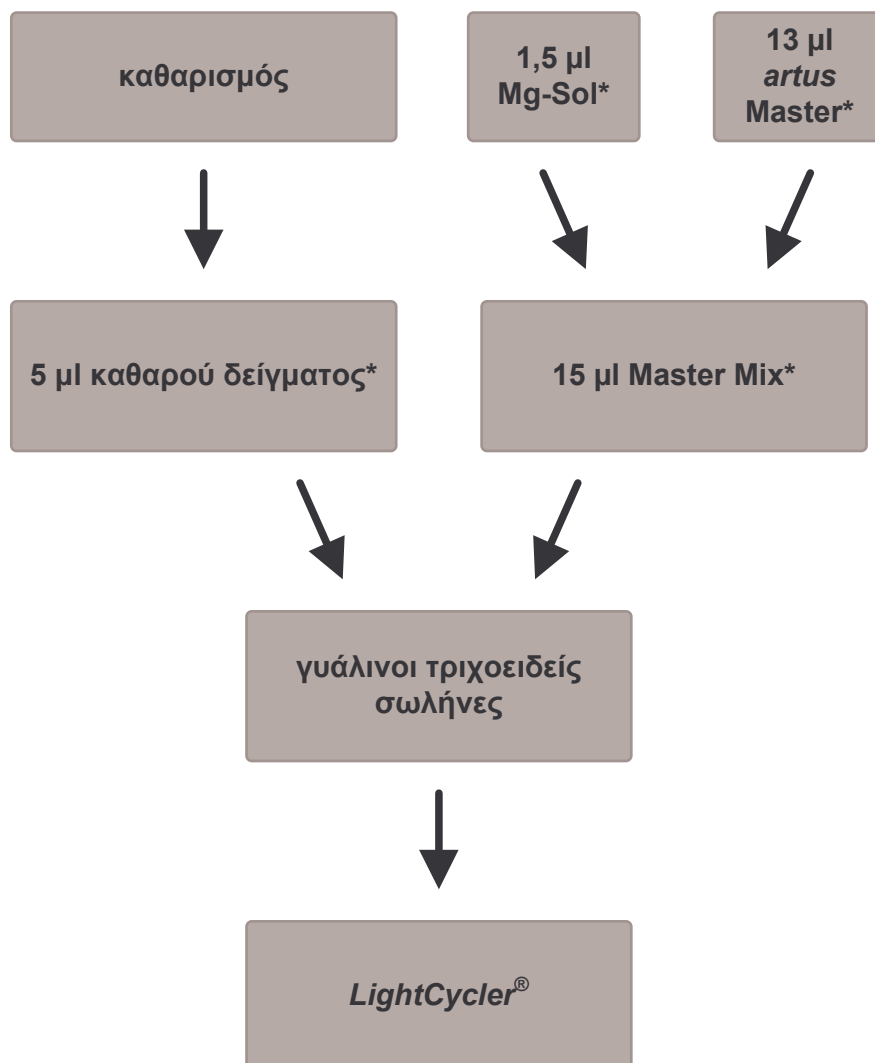
Αριθμός δειγμάτων		1
1. Προετοιμασία του Master Mix	<i>TPMT LC Master A</i> ή <i>TPMT LC Master B</i>	16 μl
	<i>TPMT LC Mg-Sol</i>	2 μl
	Συνολικός όγκος	18 μl
2. Προετοιμασία της αντίδρασης PCR	Master Mix	18 μl
	Δείγμα	2 μl
	Συνολικός όγκος	20 μl

Εισάγετε με την πιπέτα στο πλαστικό δοχείο κάθε τριχοειδούς σωλήνα 18 μl του Master Mix. Στη συνέχεια προσθέστε 2 μl από το εκχύλισμα του απομονωμένου DNA. Αντίστοιχα πρέπει να προστεθούν ως θετικό πρότυπο

ελέγχου 2 μl του *TPMT LC Control A* (*Aw / An*) ή *TPMT LC Control B* και ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου 2 μl νερού (*Water, PCR grade*). Κλείστε τους τριχοειδείς σωλήνες. Για να μεταφέρετε το μίγμα από το πλαστικό δοχείο στους τριχοειδείς σωλήνες, φυγοκεντρήστε τους προσαρμογείς με τους τριχοειδείς σωλήνες που περιέχονται σε αυτούς σε μία επιτραπέζια φυγόκεντρο για 10 δευτ. σε 400 x g (2.000 στρ./λεπτό) κατ' ανώτατο όριο.

Λάβετε υπόψη: Για την αποφυγή επιμολύνσεων η τοποθέτηση των καλυμμάτων στους τριχοειδείς σωλήνες να γίνεται με τη χρήση του Capping Tool *LightCycler*[®].

Προετοιμασία της PCR



Εικ. 1: Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασιών.

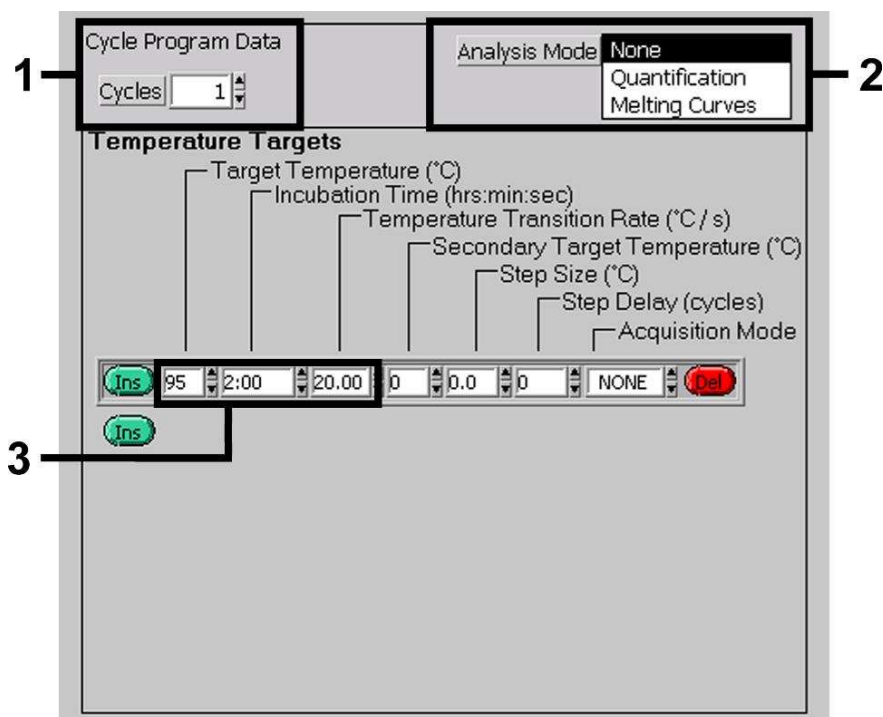
* Σε κάθε βήμα επεξεργασίας με πιπέτα πρέπει οπωσδήποτε να φροντίσετε για την πλήρη απόψυξη, την καλή ανάμιξη και τη σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

8.3 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler*[®]

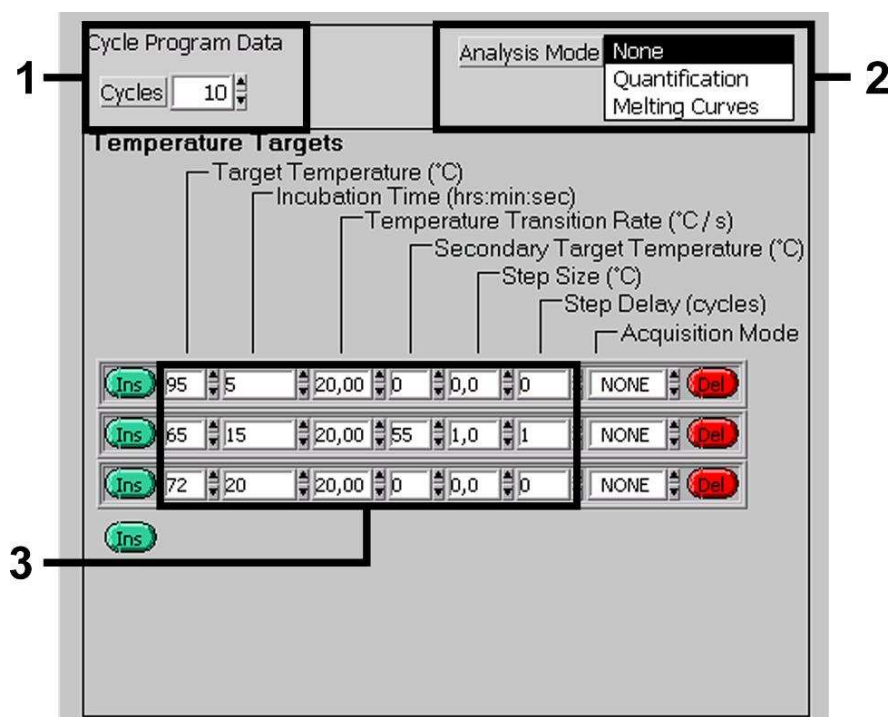
Για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου TPMT ρυθμίστε στο όργανό σας *LightCycler*[®] ένα προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με τα ακόλουθα πέντε στάδια εργασίας (βλέπε Εικ. 2 - 6).

- | | | |
|----|---|--------|
| A. | Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου Hot Start | Εικ. 2 |
| B. | Στάδιο Touch Down | Εικ. 3 |
| C. | Πολλαπλασιασμός του DNA | Εικ. 4 |
| D. | Καμπύλη τήξης | Εικ. 5 |
| E. | Ψύξη | Εικ. 6 |

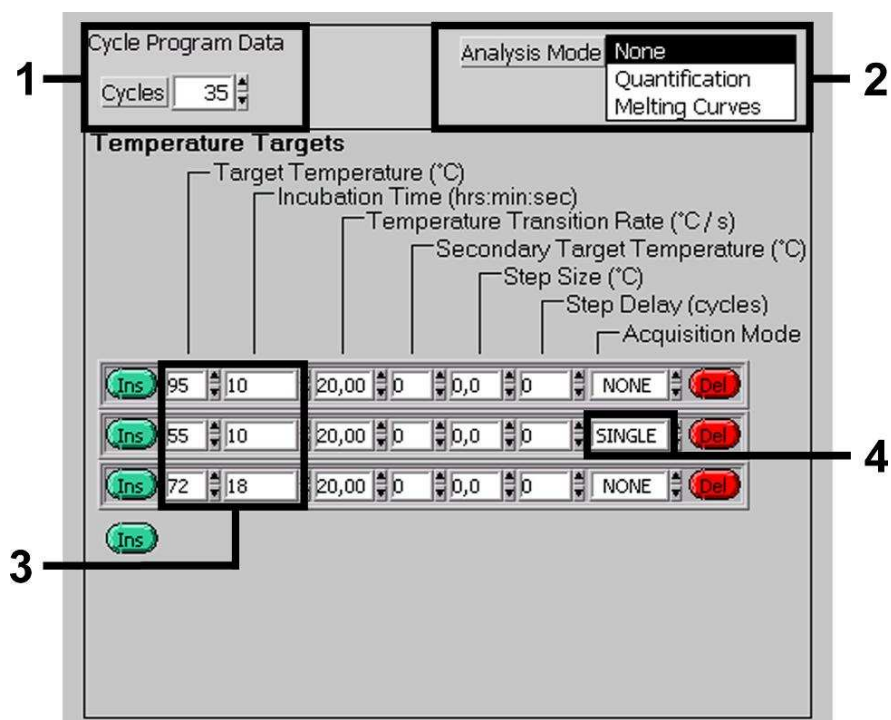
Προσέξτε ιδιαίτερα τις ρυθμίσεις που αφορούν τις παραμέτρους *Analysis Mode* (Τρόπος λειτουργίας ανάλυσης), *Cycle Program Data* (Δεδομένα προγράμματος κυκλοποίησης) και *Temperature Targets* (Στόχοι θερμοκρασίας). Στις εικόνες οι ρυθμίσεις αυτές επισημαίνονται με μαύρο πλαίσιο. Οδηγίες για τον προγραμματισμό του οργάνου *LightCycler*[®] θα βρείτε στο *LightCycler Operator's Manual*.



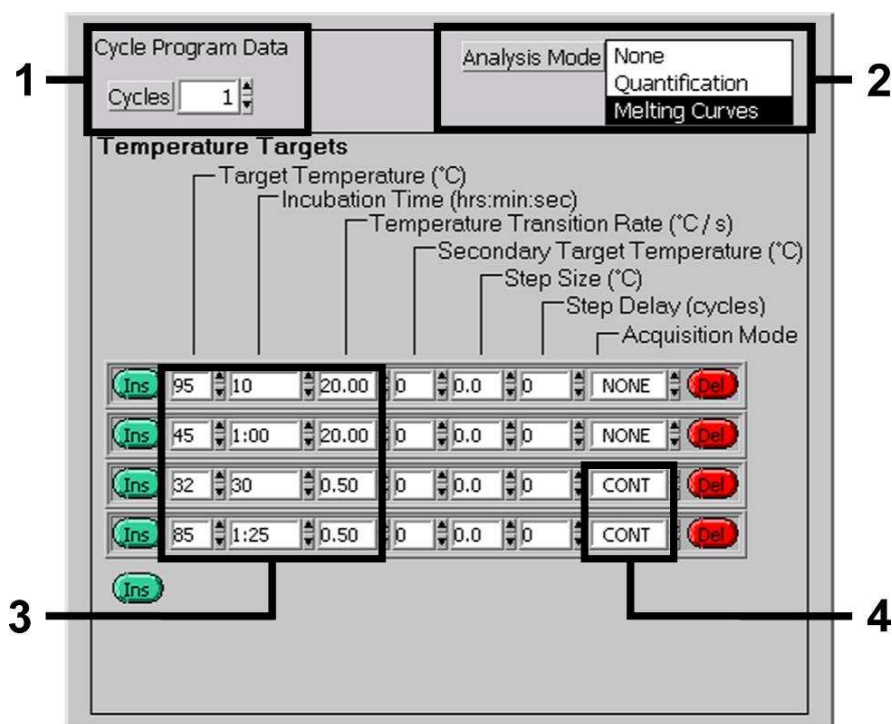
Εικ. 2: Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου Hot Start.



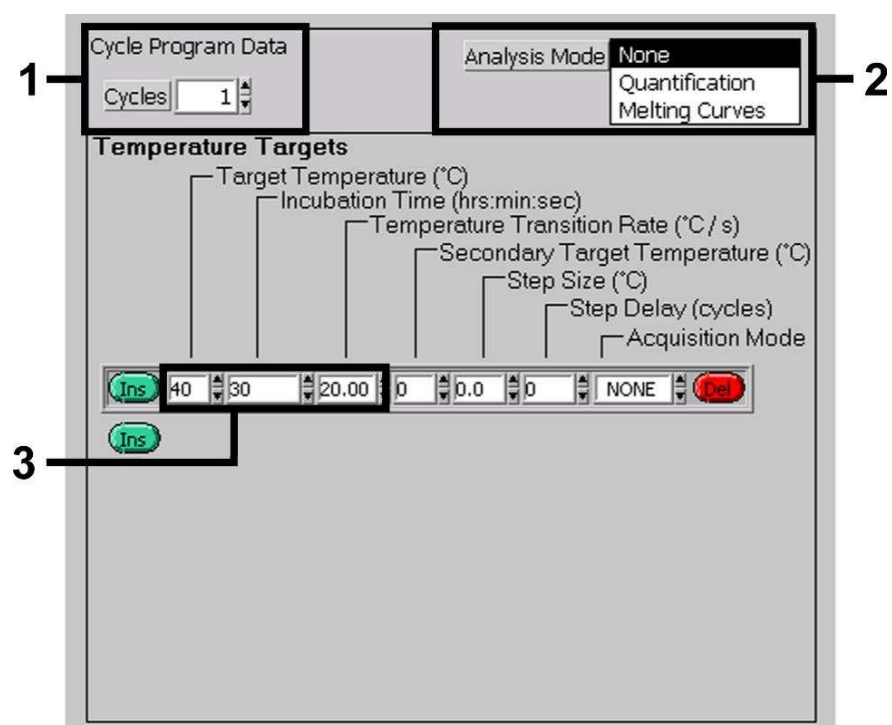
Εικ. 3: Στάδιο Touch Down.



Εικ. 4: Πολλαπλασιασμός του DNA.



Εικ. 5: Καμπύλη τήξης.



Εικ. 6: Ψύξη.

9. Αξιολόγηση

Στις αναλύσεις πολλών χρωμάτων προκύπτουν παρεμβολές μεταξύ των φθοριομετρικών καναλιών. Το λογισμικό του οργάνου *LightCycler*[®] περιέχει ένα αρχείο με το χαρακτηρισμό *Color Compensation File*, το οποίο αντισταθμίζει αυτές τις παρεμβολές. Το αρχείο αυτό μπορείτε να το ανοίξετε πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης της PCR με το πάτημα του πλήκτρου *Choose CCC File* ή *Select CC Data*. Εάν δεν υπάρχει εγκατεστημένο αρχείο *Color Compensation File*, δημιουργήστε το οι ίδιοι με βάση τις οδηγίες που υπάρχουν στο *LightCycler Operator's Manual*. Μετά την ενεργοποίηση του *Color Compensation File* εμφανίζονται στα φθοριομετρικά κανάλια F1, F2 και F3 ξεχωριστά σήματα. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR, η οποία επιτυγχάνεται με το *artus* TPMT LC PCR Kit, παρακαλούμε επιλέξτε τις λειτουργίες προβολής F2/Back-F1 και F3/Back-F1 για την PCR της TPMT. Κατά τη χρησιμοποίηση του *artus* TPMT LC PCR Kit, στη διάρκεια της διαδικασίας *LightCycler*[®], στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρείται ποσοτικός πολλαπλασιασμός.

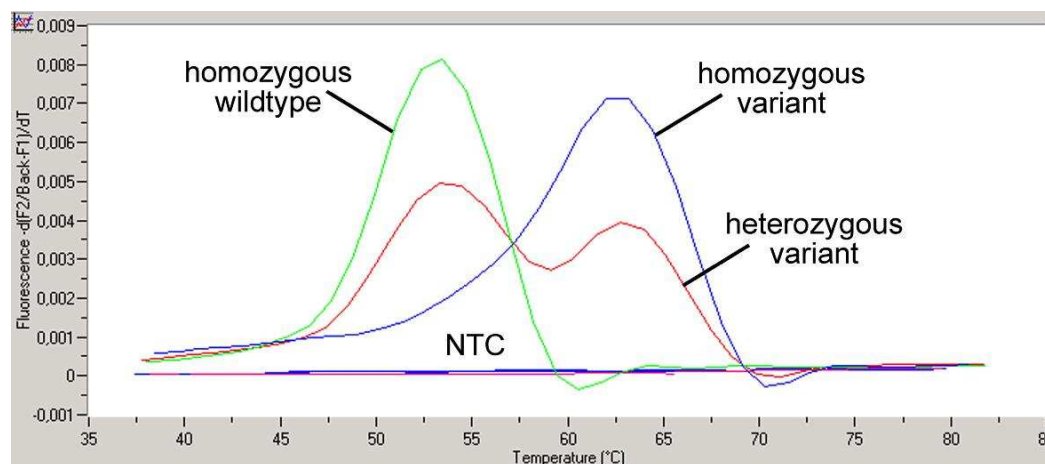
Τα συστατικά του *artus* TPMT LC PCR Kit χρησιμεύουν για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών [άγριος (αρχικός) τύπος = ατ; παραλλαγή = παρ] στις θέσεις των νουκλεοτιδίων (nt) 238, 460 και 719 του γονιδίου TPMT. Ο προσδιορισμός των γενετικών παραλλαγών ακολουθεί με τη βοήθεια του προγράμματος *Melting Curve*. Τα σημεία τήξης υποδεικνύουν στο φθοριόγραμμα την παρουσία του άγριου τύπου ή της γενετικής παραλλαγής στις θερμοκρασίες που δίδονται στον επόμενο πίνακα (βλέπε Πίνακας 1). Στην περίπτωση ετεροζυγωτίας παρουσιάζεται η καμπύλη με δύο κορυφές.

Πίνακας 1: Σημεία τήξης του άγριου τύπου (ατ) και των γενετικών παραλλαγών (παρ).

Master	Κανάλι F2			Κανάλι F3		
	nt	ατ	παρ	nt	ατ	παρ
A	238	54 °C	64 °C	-	-	-
B	460	57 °C	47 °C	719	42 °C	54 °C

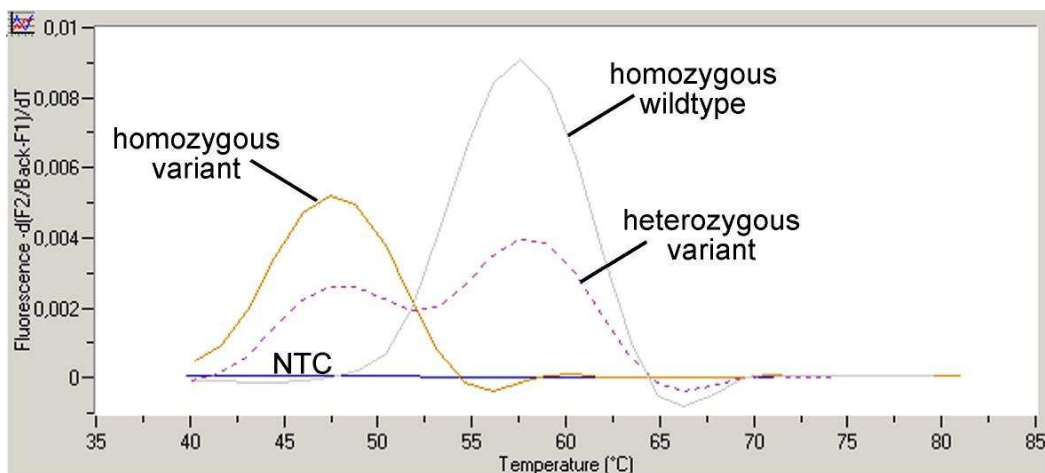
Λάβετε υπόψη ότι το σημείο τήξης μπορεί να παρουσιάσει απόκλιση κατά $\pm 2^{\circ}\text{C}$ από την δεδομένη θερμοκρασία. Για την καλύτερη παρουσίαση του φθοριογράμματος προτείνεται σε πολλές περιπτώσεις η διακοπή της λειτουργίας του *Digital Filter*.

Η επόμενη εικόνα (βλέπε Εικ. 7 - 9) δείχνει το φθοριόγραμμα της ανακάλυψης του πολυμορφισμού στις θέσεις των νουκλεοτιδίων nt 238, 460 και 719 στην ομοζυγωτική άγριου τύπου μορφή καθώς και στην ετεροζυγωτική ή ομοζυγωτική μεταβλητή μορφή. Τα θετικά πρότυπα ελέγχου που παραδίδονται μαζί με το *artus* TPMT LC PCR Kit (*TPMT LC Control A* (*Aw* / *Av*) και *B*) δείχνουν την ετεροζυγωτική κατάσταση των εκάστοτε γενετικών παραλλαγών.

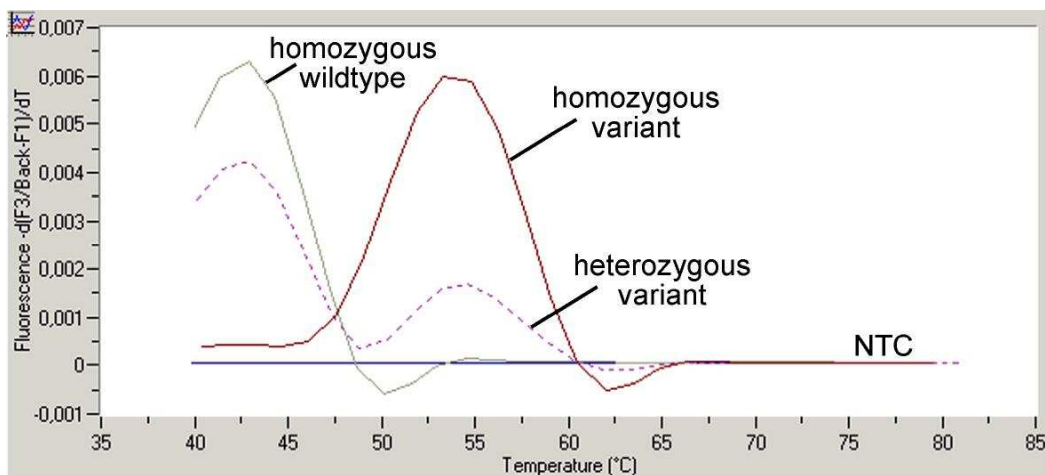


Εικ. 7: Φθοριόγραμμα για την ανακάλυψη της αλλαγής θέσης του νουκλεοτιδίου nt 238 με τη βοήθεια του *artus* TPMT LC PCR Kit (**Master A**) στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1. NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).

Λάβετε υπόψη: Αναλύστε το ανώτερο δώδεκα δείγματα ανά διαδικασία της PCR. Εάν αναλυθούν περισσότερα από δώδεκα δείγματα παράλληλα, μπορεί να παρατηρηθεί μία τεχνικά εξηρημένη άτυπη συμπεριφορά της καμπύλης τήξης της ετεροζυγωτικής παραλλαγής nt 238.



Εικ. 8: Φθοριόγραμμα για την ανακάλυψη της αλλαγής θέσης του νουκλεοτιδίου nt 460 με τη βοήθεια του *artus* TPMT LC PCR Kit (**Master B**) στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1. NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).



Εικ. 9: Φθοριόγραμμα για την ανακάλυψη της αλλαγής θέσης του νουκλεοτιδίου nt 719 με τη βοήθεια του *artus* TPMT LC PCR Kit (**Master B**) στο φθοριομετρικό κανάλι F3/Back-F1. NTC: non-template control (αρνητικό πρότυπο).

Ο γονότυπος καθορίζεται μέσω του συνδυασμού των εναλλακτικών αλληλόμορφων (βλέπε Πίνακας 2). Συγχρόνως πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στη περίπτωση παρουσίας δύο ετεροζυγωτικών παραλλαγών, αυτές μπορεί να βρίσκονται μαζί σε ένα αλληλόμορφο καθώς επίσης και σε δύο αλληλόμορφα. Σε περίπτωση παρουσίας τουλάχιστον μιας γενετικής παραλλαγής, αναμένεται μειωμένη ενζυματική δραστηριότητα της TPMT.

Από φορείς δύο αλληλόμορφων άγριου τύπου αναμένεται μία φυσιολογική ενζυματική δραστηριότητα, με την προϋπόθεση ότι δεν συνυπάρχουν άλλοι μη γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυματική δραστηριότητα. Μία μειωμένη ενζυματική δραστηριότητα αναμένεται στους φορείς τουλάχιστον ενός γενετικώς τροποποιημένου αλληλόμορφου. Η παρουσία π.χ. μιας ετεροζυγωτίας στη θέση nt 460 και nt 719 οδηγεί στο γονότυπο TPMT*3A/*1 καθώς και στο TPMT*3B/*3C. Εάν η τροποποίηση αφορά και τα δύο αλληλόμορφα, ο κίνδυνος μιας γενετικά εξαρτημένης παρενέργειας είναι υψηλός. Με τη βοήθεια του *artus* TPMT LC PCR Kit, ελέγχονται οι παραλλαγές των νουκλεοτιδίων σε τρεις διαφορετικές θέσεις στο γονίδιο TPMT, πράγμα που επιτρέπει την ανίχνευση των αλληλόμορφων TPMT*1, TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B και TPMT*3C.

Πίνακας 2: Γενετικές παραλλαγές του γονιδίου TPMT.

Αλληλό- μορφα	nt 238 F2	nt 460 F2	nt 719 F3	Ενζυματική δραστηριότητα
TPMT*1				Κανονική
TPMT*2	x			Μειωμένη
TPMT*3A		x	x	Απουσία
TPMT*3B		x		Μειωμένη
TPMT*3C			x	Μειωμένη

Από τα παραπάνω αναφερόμενες αλληλομορφίες προκύπτουν διάφοροι πιθανοί γονότυποι. Αυτοί αναφέρονται στον επόμενο πίνακα (βλέπε Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Επίδραση του γονοτύπου στην ενζυματική δραστηριότητα της TPMT.

Ομοζυγωτικός γονότυπος άγριου τύπου	Ετεροζυγωτικός ή ομοζυγωτικός γονότυπος παραλλαγής	Ομοζυγωτικός γονότυπος παραλλαγής
TPMT*1/*1	TPMT*1/*2	TPMT*3A/*3A
	TPMT*1/*3A	
	TPMT*1/*3B	
	TPMT*1/*3C	
	TPMT*2/*2	
	TPMT*2/*3A	
	TPMT*2/*3B	
	TPMT*2/*3C	
	TPMT*3A/*3B	
	TPMT*3A/*3C	
	TPMT*3B/*3B	
	TPMT*3B/*3C	
	TPMT*3C/*3C	
κανονική ενζυματική δραστηριότητα	μειωμένη ενζυματική δραστηριότητα	απουσία ενζυματικής δραστηριότητας

10. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Κανένα σήμα στα θετικά πρότυπα ελέγχου (*TPMT LC Control Aw, An ή B*) ή στα δείγματα στο φθοριομετρικό κανάλι *F2/Back-F1* ή *F3/Back-F1*:

- Ο προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας του οργάνου *LightCycler®* είναι εσφαλμένος.
 - ➔ Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με τα περιεχόμενα του πρωτοκόλλου (βλέπε **8.3 Προγραμματισμός του οργάνου *LightCycler®***).
- Εσφαλμένη διάταξη της αντίδρασης της PCR.
 - ➔ Ελέγξτε τα στάδια εργασίας σας με τη βοήθεια του σχήματος επεξεργασίας με πιπέτα (βλέπε **8.2 Προετοιμασία της PCR**) και επαναλάβετε την PCR, εάν είναι απαραίτητο.
- Οι συνθήκες αποθήκευσης, για ένα ή περισσότερα υλικά του κιτ, δεν αντιστοιχούν στις αναφερόμενες προδιαγραφές του κεφαλαίου **2. Αποθήκευση** ή η ημερομηνία λήξης του *artus TPMT LC PCR Kit* έχει περάσει.
 - ➔ Παρακαλούμε ελέγξτε τόσο τις συνθήκες αποθήκευσης όσο και την ημερομηνία λήξης (βλέπε ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, εάν είναι απαραίτητο.
- Έγινε αναστολή της PCR.
 - ➔ Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.
 - ➔ Βεβαιωθείτε ότι κατά την απομόνωση του DNA το επιπλέον προτεινόμενο βήμα φυγοκέντρωσης, για την απόλυτη απομάκρυνση των καταλοίπων αιθανόλης πριν από την εκχύλιση, έχει εκτελεστεί (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**).
- Υφίστανται απώλειες DNA κατά τον καθαρισμό.
 - ➔ Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε μία διαδικασία απομόνωσης που συνιστάται από εμάς (βλέπε **8.1 Απομόνωση DNA**) και τηρείτε πιστά τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

Κανένα σήμα για το *TPMT LC Master A* στο φθοριομετρικό κανάλι F3/Back-F1:

TPMT LC Master A παράγει μόνο ένα σήμα στο φθοριομετρικό κανάλι F2/Back-F1.

Ατυπη συμπεριφορά της καμπύλης τήξης στην ανακάλυψη της αλλαγής θέσης του νουκλεοτιδίου nt 238 στο φθοριομετρικό κανάλι F3/Back-F1:

- Αναλύθηκαν παράλληλα περισσότερα από δώδεκα δείγματα.

Ασθενής κορυφή φθορισμού:

- ➔ Αναμίξτε πλήρως τα συστατικά πριν από τη χρήση τους.
- ➔ Ελέγξτε τις συνθήκες πολλαπλασιασμού.
- ➔ Προψύξτε το Cooling Block μαζί με τους προσαρμογείς που περιέχονται εντός αυτού στους +4 °C περίπου.
- ➔ Κατά τη διάρκεια της χρήσης της πιπέτας όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται υπό ψύξη.

Στην περίπτωση που προκύψουν άλλα ερωτήματα ή προβλήματα, παρακαλούμε επικοινωνήστε με την τεχνική μας εξυπηρέτηση.

11. Ειδικά χαρακτηριστικά

11.1 Αναλυτική ευαισθησία

Το *artus* TPMT LC PCR Kit χρησιμεύει για την ανίχνευση της ατομικής γενετικής σύστασης όσον αφορά τις γενετικές παραλλαγές nt 238, nt 460 και nt 719 στο γονίδιο TPMT του ανθρώπου, με τη βοήθεια της τεχνολογίας *LightCycler*[®]. Ανθρώπινο γενωμικό DNA απομονώθηκε από δείγματα αίματος, προσδιορίστηκε ποσοτικά με σπεκτροφωτομετρία και αραιώθηκε σε διαδοχικά στάδια αραιώσης. Για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών επαρκεί το λιγότερο 0,12 ng γενωμικού DNA (20 αντίγραφα) ανά PCR (αντιστοιχεί με 0,005 - 0,02 μl αίματος, ανά δόση αίματος και απομόνωσης).

11.2 Ειδικότητα

Η ειδικότητα του *artus* TPMT LC PCR Kit εξασφαλίζεται κατά κύριο λόγο με την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών καθώς και με την επιλογή αυστηρών συνθηκών αντίδρασης. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές έχουν ελεγχθεί με βάση την ανάλυση της σύγκρισης αλληλουχιών για τυχόν ομολογία με κάποια από όλες τις αλληλουχίες που έχουν δημοσιευθεί σε τράπεζες γονιδίων. Ακόμη η ειδικότητα για την ανίχνευση αυτού του γενετικού πολυμορφισμού εξασφαλίστηκε μέσω ανάλυσης αλληλουχίας των μεμονομένων εναλλακτικών αλληλόμορφων και ακολούθως με σύγκριση αλληλουχίας σε διεθνείς τράπεζες δεδομένων.

11.3 Διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα

Η συχνότητα του πολυμορφισμού στον πληθυσμό του Καυκάσου διαπιστώθηκε βάσει 300 δειγμάτων DNA και των συστατικών του kit, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

12. Ειδικές υποδείξεις για τη χρήση του προϊόντος

- Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για διαγνωστικούς σκοπούς *in vitro*.
- Η χρήση πρέπει να γίνεται από ειδικά εκπαιδευμένο και καταρτισμένο προσωπικό στις διαγνωστικές διαδικασίες *in vitro* (EN375).
- Η ακριβής τήρηση του πρωτοκόλλου είναι απολύτως απαραίτητη, για την επίτευξη άριστων αποτελεσμάτων της PCR.
- Προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στη συσκευασία και στις ετικέτες των επιμέρους στοιχείων. Τα αντιδραστήρια των οποίων έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

13. Πληροφορίες ασφάλειας

Πληροφορίες ασφάλειας σχετικά με το *artus* TPMT LC PCR Kit μπορείτε να βρείτε στο φυλλάδιο δεδομένων ασφάλειας (material safety data sheet, MSDS). Αυτό μπορείτε να το βρείτε ως σύντομο και ευκολόχρηστο αρχείο PDF στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/support/msds.aspx.

14. Ποιοτικός έλεγχος

Σε ταυτοποίηση με το σύστημα αποδεδειγμένης ποιοτικής διαχείρισης ISO 9001 και ISO 13485 της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *artus* TPMT LC PCR Kit ελέγχθηκε έναντι προκαθορισμένων προδιαγραφών για την εγγύηση της σταθερής ποιότητας του προϊόντος.

15. Βιβλιογραφία

- (1) Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr.* 1998 Jan; 87 (1): 108 - 11.
- (2) Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Feb 14; 92 (4): 949 - 53.
- (3) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (4) Schwab M, Schaffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger UM, Kaskas BA. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2002 Aug; 12 (6): 429 - 36.

16. Ερμηνεία των συμβόλων



Ημερομηνία λήξης



Αριθμός παρτίδας



Κατασκευαστής



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός υλικού



Εγχειρίδιο



Διαγνωστικό ιατρικό προϊόν in-vitro



Το περιεχόμενο επαρκεί για <N> τεστ



Περιορισμοί θερμοκρασίας

Mg-Sol

Διάλυμα μαγνησίου

Austria ■ QIAGEN Vertriebs GmbH ■ Löwengasse 47/6 ■ 1030 Wien

Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Canada ■ QIAGEN Inc. ■ 2800 Argentia Road ■ Unit 7 ■ Mississauga ■ Ontario ■ L5N 8L2

Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

France ■ QIAGEN S.A. ■ 3 avenue du Canada ■ LP 809 ■ 91974 COURTABOEUF CEDEX

Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

Germany ■ QIAGEN GmbH ■ QIAGEN Strasse 1 ■ 40724 Hilden

Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Italy ■ QIAGEN S.p.A. ■ Via Grosio, 10/10 ■ 20151 Milano

Orders 02-33430-411 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ QIAGEN K.K. ■ Forefront Tower II ■ 13-1, Kachidoki 3 Chome ■ Chuo-ku, Tokyo 104-0054

Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

Switzerland ■ QIAGEN AG ■ Garstligweg 8 ■ 8634 Hombrechtikon

Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

USA ■ QIAGEN Inc. ■ 27220 Turnberry Lane ■ Valencia ■ CA 91355

Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046980EL 127132194