

Οδηγίες χρήσης Elucigene[®] TRP

Το Elucigene[®] είναι εμπορικό σήμα της Gen-Probe Life Sciences Ltd.

Το ARMS[®] είναι σήμα κατατεθέν της AstraZeneca UK Ltd.

Το QIAamp[®] είναι εμπορικό σήμα της Qiagen Group

Το NuSieve[®] είναι εμπορικό σήμα της Lonza. Το AmpliTaq Gold[®] είναι εμπορικό σήμα της Roche Molecular Systems Inc.

Τα κιτ Elucigene αναπτύχθηκαν και κατασκευάζονται από την Gen-Probe Life Sciences Ltd. με συστήματα ποιότητας που έχουν πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα ISO9001:2008 και ISO13485:2003.

Κατασκευάζεται από την Gen-Probe Life Sciences Ltd.

Heron House
Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester
M23 9HZ

Για πωλήσεις, εξυπηρέτηση πελατών και τεχνική υποστήριξη:

Τηλ.: +49 (0) 6122 7076451

Φαξ: +49 (0) 6122 7076155

E-mail: customerservice@gen-probe.eu

E-mail: technicalsupport@gen-probe.eu



Elucigene[®] TRP (Ομάδα εξετάσεων κινδύνου θρόμβωσης)

Κωδικός καταλόγου: TH003B2 – 50 εξετάσεις (με MTHFR)

Κωδικός καταλόγου: TH002B2 – 50 εξετάσεις (χωρίς MTHFR)

Σημείωση: Για τον αριθμό καταλόγου TH002B2 αγνοήστε όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές σε εκκινήτες και ανάλυση MTHFR.

Χρήση για την οποία προορίζεται

Για την ταυτόχρονη *in vitro* ποιοτική ανίχνευση μεταλλάξεων του παράγοντα V Leiden (R506Q), της προθρομβίνης (παράγοντας II 20210A) και της αναγωγάσης του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού οξέος (MTHFR C677T) σε DNA που έχει εκχυλιστεί από ολικό αίμα (συντηρημένο σε EDTA) ή από δείγματα αποξηραμένων κηλίδων αίματος.

Σύνοψη και επεξήγηση

Η φλεβική θρόμβωση προκαλεί κατ' εκτίμηση 50.000 θανάτους/έτος στις Η.Π.Α. και έχει επίπτωση 1 στους 1000 ετησίως (1). Υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου που αναφέρεται ότι συνεισφέρουν στη θρόμβωση, όπως η χειρουργική επέμβαση, η εγκυμοσύνη, τα αντισυλληπτικά από του στόματος και η παρατεταμένη ακινητοποίηση (σύνδρομο οικονομικής θέσης) (2).

Ένα γενετικό στοιχείο επηρεάζει επίσης την ευαίσθητη ισορροπία της διαδικασίας πήξης του αίματος. Η βιοχημική οδός της πήξης είναι σύνθετη και περιλαμβάνει πολλούς παράγοντες που είτε ενισχύουν είτε αναστέλλουν τη διαδικασία, με αποτέλεσμα είτε ελλιπή (αιμοφιλία) είτε υπερβολική (θρομβοφιλία) πήξη. Από αυτούς τους παράγοντες, έχουν αναγνωρισθεί 3 ως βασικοί και σε αυτούς οφείλεται η πλειονότητα των κληρονομικών περιστατικών θρομβοφιλίας (3)(4)(5). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών των παραγόντων είναι χρήσιμοι δείκτες αυξημένου κινδύνου φλεβικής θρόμβωσης. Αυτοί είναι ο παράγοντας V Leiden (R506Q), ο παράγοντας II (Προθρομβίνη 20210A) και η MTHFR (677C>T). Η MTHFR (αναγωγάση του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού οξέος) είναι βασική για τη διατήρηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης, η οποία επηρεάζει τη διαδικασία πήξης του αίματος.

Ο παράγοντας V Leiden είναι η πιο συχνή κληρονομική μορφή θρομβοφιλίας. Ετεροζυγωτία του παράγοντα V Leiden εμφανίζεται στο 3 έως 8% του γενικού πληθυσμού των Η.Π.Α. και της Ευρώπης (6). Η συχνότητα ομοζυγωτίας για τη μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden είναι περίπου 1 στους 5.000, παρόλο που ο επιπολασμός ποικίλει σημαντικά σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Ο κίνδυνος φλεβικής θρομβοεμβολής εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και από «επίκτητους» παράγοντες. Η ηλικία είναι σημαντικός παράγοντας: όσο αυξάνεται η ηλικία αυξάνεται και με μεγαλύτερο ρυθμό ο κίνδυνος σε ασθενείς με μετάλλαξη παράγοντα V Leiden. Ένα άτομο που είναι ετερόζυγο για τη μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden είναι 7 φορές πιο πιθανό να αναπτύξει φλεβική θρομβοεμβολή, ενώ ένα άτομο που είναι ομόζυγο για τη μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden έχει 80 (ογδόντα) φορές πιο αυξημένο κίνδυνο (7). Άλλοι γενετικοί παράγοντες (Προθρομβίνη 20210A και MTHFR 677C) συμβάλλουν επίσης στην αύξηση του κινδύνου, π.χ. ένας ετεροζυγώτης του παράγοντα V Leiden έχει 20 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο εάν είναι επίσης ετεροζυγώτης για την 20210A (8). Σε γυναίκες που χρησιμοποιούν αντισυλληπτικά από του στόματος, ο κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης είναι έως και 30 φορές πιο αυξημένος εάν είναι ετερόζυγες για τον παράγοντα V Leiden ή αρκετές εκατοντάδες φορές πιο αυξημένος εάν είναι ομόζυγες για τον παράγοντα V (9).

Η εξέταση γενικά απευθύνεται σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 50 ετών με φλεβική θρόμβωση και σε ασθενείς ή συγγενείς με οικογενειακό ιστορικό θρομβολυτικής νόσου. Η εξέταση συνιστάται επιπλέον να γίνεται σε συγγενείς ατόμων που είναι γνωστό ότι έχουν παράγοντα V Leiden και γυναίκες με υποτροπιάζουσες αποβολές, βαριά προεκλαμψία ή θνησιγενή νεογνά. Η γνώση της κατάστασης του παράγοντα V Leiden μπορεί να επηρεάσει την

αντιμετώπιση μιας κύησης ή να επηρεάσει τη διαδικασία λήψης αποφάσεων σχετικά με τα από του στόματος αντισυλληπτικά (10). Μετά από την ταυτοποίηση του παράγοντα V Leiden, είναι πολύ χρήσιμο να εξεταστούν επίσης και οι υπόλοιποι παράγοντες κινδύνου θρόμβωσης όπως η προθρομβίνη (παράγοντας II) και η MTHFR. Τα οφέλη της ταυτοποίησης των μεταλλάξεων του παράγοντα V Leiden σε ασθενείς με φλεβική θρόμβωση είναι ότι τα ασυμπτωματικά μέλη της οικογένειας μπορούν να επιλέξουν να προσδιορίσουν εάν διατρέχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο και αυτό συνεπώς να τους βοηθήσει να κατευθύνουν την αντιθρομβολυτική τους αγωγή σε περιόδους που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο, όπως η χειρουργική επέμβαση, η εγκυμοσύνη, η λήψη αντισυλληπτικών από του στόματος ή μεγάλες περίοδοι ακινητοποίησης, για παράδειγμα αεροπορικά ταξίδια μεγάλης διάρκειας (11).

Αρχές της διαδικασίας

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται από την εξέταση Elucigene TRP βασίζεται στο σύστημα Amplification Refractory Mutation System (ARMS), μια ειδική τεχνολογία ενίσχυσης αλληλόμορφων με PCR που μπορεί να ανιχνεύει σημειακές μεταλλάξεις ή μικρές ελλείψεις στο δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA)(12). Η εξέταση αποτελείται από δύο συμπληρωματικά μίγματα αντίδρασης. Το πρώτο μίγμα αντίδρασης ενισχύει ειδικά όλα τα αλληλόμορφα TRP τα οποία δεν επηρεάζονται από μεταλλάξεις του παράγοντα V Leiden (R506Q), του παράγοντα II (Προθρομβίνη 20210A) και της MTHFR (677C>T), δηλαδή είναι φυσικού τύπου. Αντίθετα, το δεύτερο μίγμα αντίδρασης περιέχει εκκινητές οι οποίοι ενισχύουν ειδικά μόνο τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα R506Q, 20210A και 677C>T. Κάθε μίγμα αντίδρασης περιλαμβάνει επίσης εκκινητές που ενισχύουν αλληλουχίες DNA εκτός αυτών του παράγοντα V Leiden, της προθρομβίνης και της MTHFR ως εσωτερικό μάρτυρα ενίσχυσης της εξέτασης που υποδεικνύει επιτυχή ενίσχυση. Τα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί (αμπλικόνια) των δύο μιγμάτων αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης. Η παρουσία ή απουσία ζωνών στη γέλη υποδεικνύει την κατάσταση των αλληλόμορφων του παράγοντα V Leiden (R506Q), του παράγοντα II (Προθρομβίνη 20210A) και της MTHFR (677C>T).

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

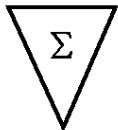
1. Για In Vitro διαγνωστική χρήση.
2. Ο μάρτυρας DNA που παρέχεται σε αυτό το kit είναι ανθρώπινης προέλευσης και έχει εξεταστεί ξεχωριστά χρησιμοποιώντας μέθοδο που βασίζεται σε PCR και έχει διαπιστωθεί αρνητικό για τους ιούς της ηπατίτιδας B (HBV), της ηπατίτιδας C (HCV) και για τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας 1 (HIV 1).
3. Θα πρέπει να προσέχετε κατά τον χειρισμό υλικού ανθρώπινης προέλευσης. Όλα τα δείγματα θα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά. Καμία μέθοδος εξέτασης δεν μπορεί να διασφαλίσει απόλυτα ότι απουσιάζουν οι ιοί HBV, HCV, HIV 1 ή άλλοι μολυσματικοί παράγοντες. Ο χειρισμός των δειγμάτων και των συστατικών της εξέτασης, η χρήση τους, η φύλαξη και η απόρριψή τους θα πρέπει να γίνονται σύμφωνα με τις διαδικασίες που ορίζει η ανάλογη εθνική κατευθυντήρια οδηγία ή κανονισμό ασφαλείας για βιολογικούς κινδύνους.
4. Φυλάσσετε όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία χαμηλότερη από -20 °C. Απορρίψτε 3 μήνες μετά από το άνοιγμα εκτός εάν υποκλασματοποιηθούν.
5. Σύμφωνα με την τρέχουσα ορθή εργαστηριακή πρακτική, τα εργαστήρια θα πρέπει να αναλύουν τα δικά τους δείγματα εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου γνωστού φαινοτύπου σε κάθε προσδιορισμό, ούτως ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η εγκυρότητα της διαδικασίας.

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες

Τα σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε όλες τις ετικέτες και τις συσκευασίες συμμορφώνονται με το εναρμονισμένο πρότυπο EN 980



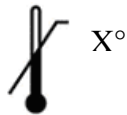
Παρασκευαστής



Αριθμός εξετάσεων



Δείτε τις οδηγίες χρήσης



Φυλάσσετε σε χαμηλότερη θερμοκρασία από την αναγραφόμενη



Χρήση πριν από την αναγραφόμενη ημερομηνία

REF

Κωδικός καταλόγου

LOT

Αριθμός παρτίδας

Υλικά που παρέχονται

Η φύλαξη των αντιδραστηρίων θα πρέπει να βρίσκεται σε περιοχή που δεν περιέχει μολυσματικό DNA ή προϊόν PCR.

Όλα τα αντιδραστήρια παρέχονται έτοιμα για χρήση. Φυλάσσετε τα μη ανοιγμένα και τα ανοιγμένα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία -20 °C. Τα ανοιγμένα αντιδραστήρια μπορούν να φυλάσσονται επί έως και 3 μήνες.

Παρέχονται επαρκή υλικά για 50 δοκιμασίες:

1. 2 φιαλίδια x 450 μl μίγματος εκκινητών A (TA) τα οποία περιέχουν εκκινητές που είναι ειδικοί για την ενίσχυση αλληλόμορφων που δεν επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις του παράγοντα V, του παράγοντα II ή της MTHFR, εκκινητές μαρτύρων και τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα (TH003TA, TH002TA (χωρίς MTHFR)).
2. 2 φιαλίδια x 450 μl μίγματος εκκινητών B (TB) τα οποία περιέχουν εκκινητές που είναι ειδικοί για την ενίσχυση αλληλόμορφων που επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις του παράγοντα V, του παράγοντα II ή της MTHFR, εκκινητές μαρτύρων και τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα (TH003TB, TH002TB (χωρίς MTHFR)).
3. 1 φιαλίδιο x 600 μl χρωστικής φόρτωσης (LD). (CR000TR)
4. 1 φιαλίδιο x 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης (DB). (CR000TV)
5. 1 φιαλίδιο x 50 μl μάρτυρα DNA (DC), φυσιολογικού για τις μεταλλάξεις του παράγοντα V Leiden R506Q, της προθρομβίνης 20210A και ομόζυγου για την παραλλαγή του αλληλόμορφου MTHFR 677C. (CR002TX)

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Εργαστηριακά αναλώσιμα – γάντια, σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης με βιδωτό πώμα, ρύγχη πιπτετών, λεπτοτοιχωματικά φιαλίδια PCR των 0,2 ml ή των 0,5 ml (η χρήση δύο φιαλιδίων διαφορετικού χρώματος θα συμβάλλει στην ταυτοποίηση του μίγματος εκκινητών).

Προετοιμασία DNA – Στείρο απιονισμένο νερό καλής ποιότητας, χλωριούχο νάτριο (NaCl), δινάτριο άλας του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), σφαιρίδια υδροξειδίου του νατρίου (NaOH), κρυσταλλοποιημένη 2-άμινο-2-υδροξυμέθυλο-1,3-προπανοδιόλη (βάση Tris), υδροχλωρικό οξύ 36% sp.gr.1.18 (HCl), χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl).

Ενίσχυση PCR – Ελαφρύ λευκό ορυκτέλαιο Sigma*, στείρο απεσταγμένο νερό καλής ποιότητας, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

Ηλεκτροφόρηση – Υλικά ηλεκτροφόρησης γέλης, συμπεριλαμβανομένης της αгарόζης NuSieve® 3:1 (Lonza), κλίμακα 50 ζευγών βάσεων (GE Healthcare), βρωμιούχο αιθίδιο.

* Για ενίσχυση που διενεργείται σε φιαλίδια PCR 0,5 ml ή θερμικούς κυκλοποιητές χωρίς θερμαινόμενα καπάκια

Απαιτούμενος εξοπλισμός

Εργαστηριακός εξοπλισμός – πιπέτες ακριβείας (2 σετ: 1 για τον χειρισμό πριν από την ενίσχυση και 1 για τον χειρισμό μετά την ενίσχυση:- κατά προτίμηση πιπέτες θετικής μετατόπισης), γυάλινος εργαστηριακός εξοπλισμός, προστατευτικός ρουχισμός, ανακινητήρας περιδίνησης τύπου vortex, μικροφυγόκεντρος, ζυγαριά, στατώ σωληναρίων.

Προετοιμασία DNA – Θερμαντικό στοιχείο (θέρμανση σε θερμοκρασία 100 °C).

Ενίσχυση – Θερμικός κυκλοποιητής που δέχεται φιαλίδια 0,5 ml ή 0,2 ml (με ακρίβεια θερμοκρασίας +/-1 °C μεταξύ 33 °C και 100 °C και ομοιομορφία στατικής θερμοκρασίας +/-1 °C), προαιρετικό θερμαινόμενο καπάκι.

Ηλεκτροφόρηση – Οριζόντια υποβρύχια δεξαμενή γέλης, συσκευή τροφοδοσίας, συσκευή μικροκυμάτων, υδατόλουτρο για την ψύξη αγαρόζης, συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας, φωτογραφικό σύστημα.

Συλλογή και φύλαξη δειγμάτων

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα ολικού αίματος (EDTA) και κηλίδων αίματος.

Οι διατάξεις συλλογής δειγμάτων έχει αναφερθεί ότι, κατά περιπτώσεις, είναι επιβλαβείς για την ακεραιότητα ορισμένων αναλυόμενων ουσιών και μπορεί να παρεμβάλλονται σε ορισμένες τεχνολογίες μεθόδων(9). Συνιστάται να επιβεβαιώνει κάθε χρήστης ότι η επιλεγμένη διάταξη χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ότι οι διατάξεις συλλογής δειγμάτων και οι εναλλακτικές μέθοδοι προετοιμασίας DNA είναι συμβατές με αυτή την εξέταση.

Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ πριν από την προετοιμασία του DNA. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη.

Προετοιμασία DNA από δείγματα ολικού αίματος (EDTA)

1. Μεταφέρετε με πιπέτα 80 μl κάθε δείγματος αίματος σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης με βιδωτό πώμα.
2. Μεταφέρετε με πιπέτα 320 μl διαλύματος NH_4Cl 170 mM (9,09 g/l) σε κάθε σωληνάριο.
3. Αναμίξτε για 20 λεπτά με ήπια περιδίνηση και αναστροφή. Αποφύγετε τη έντονη ανάδευση και τον σχηματισμό αφρού.
4. Φυγοκεντρίστε κάθε σωληνάριο για 2 λεπτά στα 12.000 g μέχρι να σχηματιστεί ένα σφαιρίδιο κυττάρων.
5. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
6. Μεταφέρετε με πιπέτα 300 μl διαλύματος NaCl 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 10 mM (3,72 g/l) σε κάθε σωληνάριο και επαναιωρήστε τα κύτταρα αναμειγνύοντας με ανακινητήρα περιδίνησης τύπου vortex.
7. Φυγοκεντρίστε κάθε σωληνάριο για 1 λεπτό στα 12.000 g μέχρι να σχηματιστεί ένα σφαιρίδιο κυττάρων.
8. Επαναλάβετε τα βήματα 5 έως 7 τουλάχιστον δύο ακόμη φορές μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ορατή κόκκινη χρώση στο υπερκείμενο υγρό.
9. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
10. Μεταφέρετε με πιπέτα 200 μl διαλύματος NaOH 50 mM σε κάθε σωληνάριο και επαναιωρήστε τα κύτταρα αναμειγνύοντας με ανακινητήρα περιδίνησης τύπου vortex.
11. Επώαστε σε θερμαινόμενο στοιχείο σε θερμοκρασία $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά.
12. Μεταφέρετε με πιπέτα 40 μl διαλύματος βάσης Tris 1 M (121,1 g/l)/HCl (pH 7,5) σε κάθε σωληνάριο και αναμίξτε με ανακινητήρα περιδίνησης τύπου vortex.
13. Προσθέστε 1 ml στείρου απιονισμένου νερού σε κάθε σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης για να δημιουργηθεί όγκος δείγματος DNA 1,24 ml.
14. Φυγοκεντρίστε κάθε σωληνάριο για 1 λεπτό στα 12.000 g μέχρι να σχηματιστεί ένα σφαιρίδιο υπολειμμάτων κυττάρων. Το DNA περιέχεται εντός του υπερκείμενου υγρού.

Προετοιμασία DNA από αποξηραμένες κηλίδες αίματος

1. Τρυπήστε δίσκους $2 \times 3\text{ mm}^{(B)}$ από την κάρτα δείγματος και τοποθετήστε τους σε σωληνάριο 1,5 ml με βιδωτό πώμα.

Οι κηλίδες θα πρέπει να διατρώνται από μία περιοχή της κάρτας που είναι πλήρως εμποτισμένη με αίμα.

Τρυπήστε διάφορες «καθαρές» κηλίδες από τις κάρτες και απορρίψτε τις πριν από τη λήψη κάθε δείγματος για να αποτρέψετε την επιμόλυνση από μεταφορά δείγματος.

2. Προσθέστε 1 ml διαλύματος NaCl 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 10 mM (3,72 g/l) και αναμίξτε σε περιστροφικό ανακινήτηρα για 15 – 20 λεπτά. Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος περιστροφικός ανακινήτηρας, τότε οι πλύσεις μπορεί να χρειάζεται να επεκταθούν έως και 30 λεπτά η καθεμία.
3. Αφαιρέστε και απορρίψτε το διάλυμα πλύσης.
4. Επαναλάβετε τα βήματα 2 και 3 μία ακόμη φορά.
5. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να έχει εκλουστεί η μεγαλύτερη ποσότητα χρωστικής αίμης από τον δίσκο. Δεν είναι ασυνήθιστη η αχνή καφέ χρώση των κηλίδων αίματος σε αυτό το στάδιο.
6. Μικροφυγοκεντρίστε σύντομα (3 δευτερόλεπτα) για να συλλέξετε το υπόλοιπο διάλυμα πλύσης στον πυθμένα του σωληναρίου. Χρησιμοποιώντας πιπέτα, αφαιρέστε και απορρίψτε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα διαλύματος, χωρίς να διαταράξετε τις κηλίδες.
7. Αυτό το σύντομο βήμα μικροφυγοκέντρισης συνήθως αφαιρεί τις πρόσθετες χρωστικές αίμης από τις κηλίδες αίματος.
8. Προσθέστε 150 μl διαλύματος NaOH 50 mM (2 g/l) σε κάθε σωληνάριο. Χτυπήστε ελαφρά, γρήγορα και προσεκτικά με το δάκτυλο για να τα αναμίξετε.
9. Βράστε σε καυτό στοιχείο για 10 λεπτά. Το καυτό στοιχείο θα πρέπει να εξισορροπηθεί στους 100 °C.
10. Μικροφυγοκεντρίστε σύντομα για να συλλέξετε το υπερκείμενο στον πυθμένα του σωληναρίου.
11. Μεταφέρετε με πιπέτα 30 μl διαλύματος βάσης Tris 1 M (121,1 g/l)/ HCl (pH 7,5) σε κάθε σωληνάριο για εξουδετέρωση και αναμίξτε προσεκτικά.
12. Προσθέστε 420 μl στείρου νερού Sigma σε κάθε σωληνάριο DNA για να δημιουργηθεί συνολικός όγκος 600 μl.
13. Αναμίξτε τα δείγματα καλά και μικροφυγοκεντρίστε για συλλογή.
14. Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάριο με βιδωτό πώμα και ετικέτα.

Φυλάξτε το DNA που εξάγεται σε θερμοκρασία -20 °C.

^(B) Το συνολικό εμβαδόν δείγματος αίματος που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ισοδύναμο με αυτό των κυκλικών κηλίδων αίματος 2 x 3 mm. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν κηλίδες καρτών 1 x 6 mm, εάν είναι βολικό.

Το kit QIAmp DNA Blood Kit (Qiagen) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για προετοιμασία DNA από ολικό υγρό αίμα και έχει βρεθεί δημιουργεί αναπαραγώγιμα και ερμηνεύσιμα αποτελέσματα.

Οι μέθοδοι προετοιμασίας DNA που περιγράφονται παραπάνω συνιστώνται από την Gen-Probe Life Sciences και έχει καταδειχθεί ότι δημιουργούν συνεπή και αξιόπιστα αποτελέσματα. Το DNA που προετοιμάζεται με χρήση άλλων μεθόδων ή άλλων τύπων δείγματος ενδέχεται να μην είναι η βέλτιστη για την εξέταση Elucigene TRP και μπορεί να δημιουργήσει υποβέλτιστα αποτελέσματα. Τα βασικά κριτήρια εναλλακτικών μεθόδων προετοιμασίας DNA είναι η συγκέντρωση του DNA και η απουσία αναστολέων PCR.

Συνιστάται η ενδεδειγμένη αξιολόγηση εναλλακτικών μεθόδων και τύπων δειγμάτων με τη δοκιμασία Elucigene TRP πριν από τη χρήση των αποτελεσμάτων για διαγνωστικούς

σκοπούς. Η εξέταση δειγμάτων DNA σε συγκεντρώσεις <10 ng/5 μl δεν συνιστάται. Υπό βέλτιστες συνθήκες PCR τα αποτελέσματα λαμβάνονται συνεπώς σε συγκεντρώσεις DNA μεταξύ 10 και 100 ng/5 μl.

Σημείωση: Λόγω κυμαινόμενης ποιότητας και απόδοσης του DNA μπορεί μερικές φορές να είναι απαραίτητο να αραιωθεί το τελικό διάλυμα DNA κατά επιπλέον 5 φορές για να διασφαλιστεί αποτελεσματική ενίσχυση.

Πρωτόκολλο εξέτασης

Διαδικασία ενίσχυσης

Οι αριθμοί που δίνονται στους πίνακες 1 και 2 μπορούν να αυξηθούν αναλογικά για αριθμούς εξετάσεων εκτός από αυτές που καθορίζονται. Ωστόσο, λόγω των μικρών όγκων που εμπλέκονται, η Gen-Probe Life Sciences συνιστά να μην προετοιμάζονται λιγότερες από 5 εξετάσεις κάθε φορά.

1. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή για αρχείο χρονοκαθυστέρησης για την ενεργοποίηση του AmpliTaq Gold σε θερμοκρασία 94 °C για 20 λεπτά, συνδεδεμένο με ένα πρόγραμμα κύκλου ενίσχυσης 30 δευτερολέπτων σε θερμοκρασία 94 °C (αποδιάταξη), 2 λεπτών σε θερμοκρασία 58 °C (υβριδοποίηση) και 1 λεπτού σε θερμοκρασία 72 °C (επιμήκυνση) για 35 κύκλους. Αυτό θα πρέπει να συνδεθεί σε αρχείο χρονοκαθυστέρησης διάρκειας 20 λεπτών σε θερμοκρασία 72 °C (επιμήκυνση) στον τελικό κύκλο.

Σημείωση: Επιλέξτε την μέθοδο «Block» στον θερμικό κυκλοποιητή για PCR σε φιαλίδια των 0,5 ml.

2. Αποψύξτε και φυγοκεντρίστε τα φιαλίδια του μίγματος εκκινητών A (TA), του μίγματος εκκινητών B (TB), του AmpliTaq Gold (δεν παρέχεται), της χρωστικής φόρτωσης (LD) και του ρυθμιστικού διαλύματος (DB) για 10 δευτερόλεπτα στα 12.000 g, αναμίξτε ήπια με ανακίνηση σε ανακινητήρα τύπου vortex και φυγοκεντρίστε ξανά τα φιαλίδια για 10 δευτερόλεπτα.

Σημείωση: Τα βήματα 3 - 6 πρέπει να διενεργούνται σε περιοχή που δεν περιέχει DNA

3. Συμβουλευόμενοι τον πίνακα 1 προετοιμάστε επαρκή αραιώση του διαλύματος AmpliTaq Gold στο ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης και στη χρωστική φόρτωσης που παρέχονται και στείρο απεσταγμένο νερό για τον αριθμό των δειγμάτων και των μαρτύρων που πρόκειται να εξεταστούν. **Αναμίξτε ενδελεχώς με ήπια αναρρόφηση και αποβολή από την πιπέτα.**

Πίνακας 1. Αραίωση του AmpliTaq Gold

	Αριθμός απαιτούμενων εξετάσεων			
	5	10	20	50
Όγκος στείρου απεσταγμένου νερού (μl)	21	42	84	210
Όγκος χρωστικής φόρτωσης (μl)	30	60	120	300
Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης (μl)	6	12	24	60
Όγκος AmpliTaq Gold (μl)	3	6	12	30
Ολικός όγκος (μl)	60	120	240	600

4. Συμβουλευόμενοι τον πίνακα 2, προετοιμάστε τα μίγματα αντίδρασης A και B. Αφαιρέστε την κατάλληλη μερίδα μίγματος εκκινητών A σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης με ετικέτα. Επαναλάβετε με το μίγμα εκκινητών B σε δεύτερο σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης με ετικέτα. Χρησιμοποιώντας διαφορετικά ρύγχη πιπτετών προσθέστε τον κατάλληλο όγκο αραιωμένου διαλύματος AmpliTaq Gold (από το βήμα 3) σε κάθε σωληνάριο μικροφυγοκέντρισης. Αναμίξτε ήπια με ανακίνηση σε ανακινήτηρα τύπου vortex και φυγοκεντρίστε ξανά τα φιαλίδια για 10 δευτερόλεπτα στα 12.000 g.

Πίνακας 2. Προετοιμασία των μιγμάτων αντίδρασης A και B

	Αριθμός απαιτούμενων εξετάσεων							
	5		10		20		50	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Όγκος μίγματος εκκινητών A (μl)	82,5		165		330		825	
Όγκος μίγματος εκκινητών B (μl)		82,5		165		330		825
Όγκος αραιωμένου ενζύμου (μl)	27,5	27,5	55	55	110	110	275	275
Ολικός όγκος (μl)	110	110	220	220	440	440	1100	1100

5. Επισημάνετε ένα φιαλίδιο με την ένδειξη «A» και ένα φιαλίδιο με την ένδειξη «B» για κάθε δείγμα ή εάν διατίθενται χρωματιστά φιαλίδια χρησιμοποιήστε διαφορετικό χρώμα για κάθε μίγμα εκκινητών.
6. Μεταφέρετε με πιπέτα 20 μl του προετοιμασμένου μίγματος αντίδρασης A στον πυθμένα κατάλληλου αριθμού φιαλιδίων PCR που επισημαίνονται με την ένδειξη «A». Επαναλάβετε με το μίγμα αντίδρασης B σε καθένα από τον κατάλληλο αριθμό φιαλιδίων PCR που επισημαίνονται με την ένδειξη «B».
7. Χρησιμοποιώντας διαφορετικά ρύγχη πιπτετών κάθε φορά προσθέστε 5 μl του δείγματος DNA σε κάθε φιαλίδιο του ζεύγους A και B. Προσθέστε μία σταγόνα από το ελαφρύ λευκό ορυκτέλαιο Sigma για να καλύψετε την υδατική φάση*. Επανατοποθετήστε σταθερά το πώμα.
8. Για τον αρνητικό μάρτυρα μην προσθέσετε DNA σε ένα ζεύγος φιαλιδίων A και B. Προσθέστε 1 σταγόνα από το ελαφρύ λευκό ορυκτέλαιο Sigma για να καλύψετε την υδατική φάση*. Επανατοποθετήστε σταθερά το πώμα.
9. Φυγοκεντρίστε ξανά τα φιαλίδια A και B για 10 δευτερόλεπτα στα 12.000 g.
10. Τοποθετήστε όλα τα φιαλίδια σταθερά στο στοιχείο του θερμικού κυκλοποιητή. Ξεκινήστε αρχείο χρονοκαθυστέρησης στους 94 °C, ακολουθούμενο από το πρόγραμμα κύκλου ενίσχυσης.
11. Απορρίψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα αραιωμένα διαλύματα AmpliTaq Gold και προετοιμασμένα μίγματα αντίδρασης A και B που απομένουν.
12. Κατά την ολοκλήρωση του προγράμματος κύκλου ενίσχυσης, τα δείγματα είναι δυνατόν να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου όλη τη νύχτα ή σε θερμοκρασία 2-8 °C για έως και 7 ημέρες πριν από την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση γέλης.

* Για ενίσχυση που διενεργείται σε φιαλίδια PCR 0,5 ml ή θερμικούς κυκλοποιητές χωρίς θερμοαινόμενα καπάκια.

Ηλεκτροφόρηση γέλης

Συνιστάται να επιβεβαιώνει κάθε χρήστης ότι ο επιλεγμένος εξοπλισμός χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ότι είναι συμβατός με αυτή τη δοκιμασία. Σε αυτό το πλαίσιο, οι βασικές παράμετροι είναι οι διαστάσεις της μήτρας γέλης και του χτενιού (εξάρτημα σχηματισμού κυψελίδων). Τα αποτελέσματα έχουν ληφθεί με χρήση των παρακάτω συνθηκών ηλεκτροφόρησης:

1. Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε γέλη αγαρόζης 3% NuSieve® 3:1, χρησιμοποιώντας διάλυμα tris-βορικού με βρωμιούχο αιθίδιο (TBE/EtBr) ως ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας. Το διάλυμα TBE/EtBr προετοιμάστηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα βάσης Tris 134 mM (16,2 g/l), βορικού οξέος 74,9 mM (4,63 g/l), EDTA 2,55 mM (0,95 g/l) με 0,1 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου.
2. 3 g διαλύματος NuSieve® 3:1 διαλύθηκαν σε 100 ml διαλύματος TBE/EtBr και εκχύθηκαν σε οριζόντιο δίσκο γέλης 15 x 12 cm με εξαρτήματα σχηματισμού κυψελίδων 1,5 mm x 5 mm, τα οποία αναρτήθηκαν 1 mm πάνω από τη βάση.
3. Θα πρέπει να φορτώνεται 15 µl προϊόντος PCR από κάθε φιαλίδιο PCR σε γειτονικές θέσεις κυψελίδων στην προετοιμασμένη γέλη αγαρόζης.
4. Αναλύθηκε μία κλίμακα 50 ζευγών βάσεων (GE Healthcare) δίπλα από τα δείγματα, ως δείκτης μοριακού βάρους.
5. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 5 έως 6 V/cm μεταξύ των ηλεκτροδίων, μέχρι το μέτωπο της χρωστικής να είχε μετατοπιστεί κατά 4 cm από τα πηγάδια φόρτωσης προς την άνοδο (1 έως 1,5 ώρες).
6. Μετά από την ηλεκτροφόρηση οι γέλες τοποθετήθηκαν σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας στα 260 nm και, στη συνέχεια, απεικονίστηκαν και φωτογραφήθηκαν.

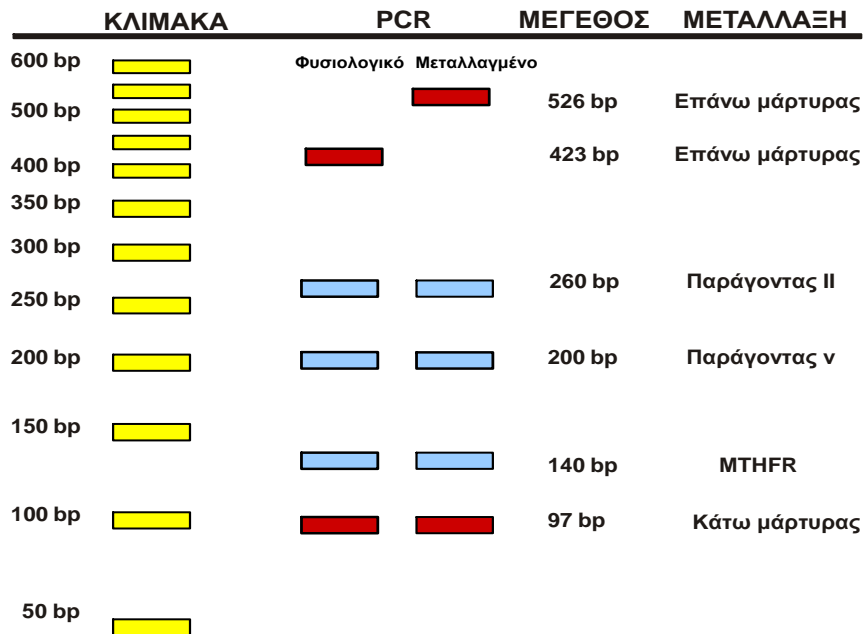
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

1. Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να μην παρουσιάζει ζώνες εντός την περιοχής που ορίζεται από τις επάνω και κάτω ζώνες μαρτύρων (βλ. εικόνα 1).
2. Οι επάνω και κάτω ζώνες μαρτύρων πρέπει να είναι εμφανώς ορατές σε όλα τα δείγματα (βλ. εικόνα 1).
3. Η θέση των επάνω και κάτω ζωνών μαρτύρων θα πρέπει να υποδεικνύουν το σωστό μοριακό βάρος (βλ. εικόνα 1).

Εάν δεν τηρηθεί οποιοδήποτε από τα παραπάνω σημεία, δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται τα αποτελέσματα και θα πρέπει να διενεργείται επαναληπτική εξέταση.

Η εικόνα 1 παρουσιάζει διαγραμματικά το μέγεθος, τα ζεύγη βάσεων και τη σχετική θέση των προϊόντων PCR σε γέλη που αναμένεται για ετερόζυγο γονότυπο θρόμβωσης (που φέρει τις μεταλλάξεις του παράγοντα V, του παράγοντα II ή της MTHFR) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο της εξέτασης κινδύνου θρόμβωσης.

Εικόνα 1



Σημείωση: Τα αλληλόμορφα MTHFR δεν ανιχνεύονται από την εξέταση Elucigene TRP, με αριθμό καταλόγου TH002B2

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Εξετάστηκαν τριάντα δείγματα, τα οποία είχαν γονοτυπηθεί προηγουμένως με χρήση ανάλυσης πέψης με περιοριστικά ένζυμα, με το kit Elucigene TRP (TH003B2) σε μία εσωτερική μελέτη, με χρήση του συνιστώμενου kit πρωτοκόλλου. Είκοσι εννιά δείγματα DNA ενισχύθηκαν επιτυχώς με χρήση του kit Elucigene TRP. Ένα δείγμα DNA δεν μπόρεσε να ενισχυθεί αλλά έδωσε αποδεκτό αποτέλεσμα στην επαναληπτική εξέταση. Είκοσι έξι δείγματα βρέθηκαν θετικά με την εξέταση για μεταλλάξεις που ανιχνεύονται με το kit Elucigene TRP. Δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε τέσσερα δείγματα. Από τα 30 δείγματα που εξετάστηκαν, 7 ήταν θετικά για τη μετάλλαξη του παράγοντα V (R506Q), 10 ήταν θετικά για τη μετάλλαξη του παράγοντα II (Προθρομβίνη 20210A) και 16 ήταν θετικά για τη μετάλλαξη της MTHFR (677C>T). Όλα τα αποτελέσματα που προσδιορίστηκαν από το kit Elucigene TRP επιβεβαιώθηκαν από τα αρχικά αποτελέσματα της γονοτύπησης.

Εξετάστηκαν τριάντα αντιστοιχισμένα δείγματα ολικού αίματος και κηλίδων αίματος, τα οποία είχαν ληφθεί από τριάντα άτομα, με το kit Elucigene TRP (TH003B2) σε μία εσωτερική μελέτη, με χρήση του συνιστώμενου kit πρωτοκόλλου. Δεκαοκτώ από τα αντιστοιχισμένα δείγματα βρέθηκαν θετικά με την εξέταση για μεταλλάξεις που ανιχνεύονται από το kit Elucigene TRP. Το αποτέλεσμα που λήφθηκε από κάθε δείγμα ολικού αίματος ήταν σύμφωνο με αυτό που λήφθηκε χρησιμοποιώντας το δείγμα κηλίδας αίματος από το ίδιο άτομο.

Περιορισμοί της διαδικασίας

1. Τα αποτελέσματα από αυτόν και άλλους διαγνωστικούς προσδιορισμούς θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα που έχει στη διάθεσή του ο κλινικός ιατρός.
2. Η απουσία μεταλλάξεων που ανιχνεύονται από αυτό το kit δεν αποτελεί εγγύηση ότι δεν υπάρχουν άλλες μεταλλάξεις στα γονίδια του παράγοντα V Leiden, του παράγοντα II και της MTHFR. Είναι πιθανή η παρουσία άλλων μεταλλάξεων και αυτές δεν ανιχνεύονται από αυτό το kit.
3. Όπως ισχύει με οποιαδήποτε γενετική εξέταση, είναι δυνατόν να ληφθούν εσφαλμένα αποτελέσματα από δείγματα αίματος που έχουν ληφθεί μετά από πρόσφατη μετάγγιση αίματος.

Ο χρήστης αυτών των δοκιμασιών θα πρέπει να τονίσει αυτά τα σημεία κατά την αναφορά αποτελεσμάτων στον κλινικό γιατρό που θα καθορίσει τη διάγνωση ή στον γενετικό σύμβουλο.

Βιβλιογραφία

1. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost* 2001;86:452-463.
2. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999;82:610-619.
3. Bertina RM, Rosendaal FR. Venous thrombosis – the interaction of genes and environment. *N Engl J Med* 1998;338:1840-1841.
4. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996 Nov 15;88:3698-3703.
5. Press RD, Bauer KA, Kujovich JL, Heit JA. Clinical utility of factor V Leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1304-1318.
6. Zöller B, Hillarp A, Berntorp E, Dählback B. Activated protein C resistance due to a common factor V gene mutation is a major risk factor for venous thrombosis. *Ann Rev Med* 1997;48:45-58.
7. Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, Cooper PC, Daly ME, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ. Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997;78:1426-1429.
8. Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta* 2003;330:31-55.
9. Hirsch DR, Mikkola KM, Marks PW, Fox EA, Dorfman DM, Ewenstein BM, Goldhaber SZ. Pulmonary embolism and deep venous thrombosis during pregnancy or oral contraceptive use: prevalence of factor V Leiden. *Am Heart J* 1996;131:1145-1148.
10. Bokarewa MI, Bremme K, Blombäck M. Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. *Br J Haematol* 1996;92:473-478.
11. Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, Palomaki GE, Bellissimo DB, Wolff DJ, et al. Technical standards and guidelines: venous thromboembolism (factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing): a disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. *Genet Med*. 2005 Jul-Aug;7(6):444-53
12. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
13. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).