

Κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

REF FLS-OE-02

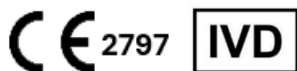
Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*

Δεν ενδείκνυται για θεραπευτική χρήση

Έκδοση: 3.1

Ημερομηνία έκδοσης: 21/05/2024

Γλώσσα: Ελληνικά



Firalis SA
35 rue du Fort
68330 – Huningue FRANCE

Τηλέφωνο: +33 389 911 320
Email: contact@firalis.com
Ιστοσελίδα: www.firalis.com

Περιεχόμενα:

1. Προβλεπόμενη χρήση	5
2. Εισαγωγή	5
3. Αρχή της δοκιμής	6
4. Όργανα και υλικά	7
4.1. Αντιδραστήρια και υλικά που παρέχονται με το κιτ	7
4.2. Διάφορα απαιτούμενα υλικά και εξοπλισμοί	8
4.3. Προϋποθέσεις αποθήκευσης και διάρκεια ζωής του κιτ	8
5. Εξαγωγή γονιδιωματικού DNA (gDNA) και ποσοτικοποίηση	9
5.1. Εξαγωγή	9
5.2. Ποσοτικοποίηση	9
6. Διαδικασία δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®	9
6.1. Βήμα 1. Προετοιμασία αντίδρασης γονοτυπικής ανάλυσης PCR πραγματικού χρόνου	9
6.2. Βήμα 2. Εκτέλεση qPCR	11
6.3. Βήμα 3. Ανάλυση αποτελέσματος	14
6.4. Βήμα 4. Ερμηνεία	16
7. Αντιμετώπιση προβλημάτων	16
8. Αναλυτικές παράμετροι	18
9. Κλινική απόδοση	18
10. Υπολειπόμενοι κίνδυνοι και προειδοποιήσεις	19
11. Περιορισμοί της διαδικασίας	21
12. Οδηγίες χημικής ασφάλειας	22
13. Τεχνικές συμβουλές	23
14. Ευθύνη	23
Τεχνική βοήθεια	23
Υπόδειξη για τη δήλωση σοβαρών περιστατικών	23
Περίληψη ασφάλειας και απόδοσης	24
Παραπομπές	24
Υπόμνημα συμβόλων που χρησιμοποιούνται στο IFU και στις ετικέτες του κιτ	26

Πίνακες:

Πίνακας 1. Αναφορά του εξοπλισμού που είναι αναγκαίος για την εκτέλεση του κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®	7
Πίνακας 2. Αναφορά του προτεινόμενου κιτ εξαγωγής gDNA (δεν παρέχεται μαζί με το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®).....	7
Πίνακας 3. Περιεχόμενα του Κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®	7
Πίνακας 1. Επισκόπηση της διαδικασίας δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy.....	9
Πίνακας 5. Δομή μοντέλου μιας πλάκας 96 δοχείων για γονοτυπική ανάλυση APOE 24 δειγμάτων, 3 ελέγχων/SNP σε διπλότυπο και 2 NTC/SNP για το Κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®	10
Πίνακας 2. Αντιστοίχιση προτύπων για τον προσδιορισμό SNP της δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy.....	11
Πίνακας 7. Πρόγραμμα εκτέλεσης qPCR στη συσκευή QS5.....	13
Πίνακας 8. Ερμηνεία του γονότυπου από τα αποτελέσματα των SNP rs429358 και rs7412.	163
Πίνακας 9. Συστάσεις αντιμετώπισης προβλημάτων για το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy.....	16
Πίνακας 10. Η γονοτυπική ανάλυση APO-Easy έχει 100% ακρίβεια.....	18
Πίνακας 11. Συγκρίσεις βάσει γονότυπων μεταξύ AD και NAD + HC.....	19

Σχήματα:

Σχήμα 1. Σχηματικό διάγραμμα του ανθρώπινου γονιδίου APOE και των πολυμορφισμών σε 2 μονονουκλεοτίδια που έχουν ως αποτέλεσμα 3 αλληλόμορφα γονίδια ε2, ε3 και ε4.	6
Σχήμα 2. Επιλογή τύπου δοκιμής στις ιδιότητες δοκιμής του λογισμικού QS5. Πρέπει να επιλέξετε τη γονοτυπική ανάλυση ως τύπο δοκιμής (κόκκινο βέλος).	12
Σχήμα 3. Ρύθμιση SNP για το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy στο λογισμικό QS5.....	13
Σχήμα 4. Σελίδα αποτελεσμάτων εκτέλεσης qPCR στο λογισμικό QS5. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει τον τύπο αποτελέσματος προς επιλογή (Αλληλόμορφη διάκριση) και το πράσινο βέλος υποδεικνύει το εικονίδιο για την επιλογή των SNP.....	14
Σχήμα 5. Μοτίβο των σημάτων των προτύπων για το SNP rs429358 (Κύριο μείγμα 1) μετά την ανάλυση qPCR.	154
Σχήμα 6. Μοτίβο των σημάτων των προτύπων για το SNP rs7412 (Κύριο μείγμα 2) μετά την ανάλυση qPCR.....	15
Σχήμα 7. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων στο λογισμικό QS5. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει το εικονίδιο το οποίο ερμηνεύει το σήμα, ενώ το πράσινο βέλος υποδεικνύει την κατάσταση ασθενούς για κάθε SNP που προσδιορίζεται από το λογισμικό μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	15

Λίστα συντομογραφιών:**SNP:** μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί**gDNA:** γονιδιωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ**APOE:** Απολιποπρωτεΐνη E**AD:** Νόσος Alzheimer**qPCR:** ποιοτική Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου**IVD:** Διαγνωστικό προϊόν In Vitro**QS5-Dx:** Σύστημα PCR πραγματικού χρόνου QuantStudio 5 Dx**NTC:** Δείγμα αναφοράς χωρίς DNA**MUT:** Μεταλλαγμένος οργανισμός**WT:** Άγριος τύπος**Het:** Ετερόζυγος**RCF:** Σχετική φυγοκεντρική δύναμη**°C:** Βαθμός Κελσίου**ng:** νανογραμμάριο**μL:** μικρολίτρο**STD:** πρότυπο**IFU:** Οδηγίες χρήσης**SDS:** Φύλλα δεδομένων ασφαλείας

1. Προβλεπόμενη χρήση

Το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® είναι μια ποιοτική διαγνωστική δοκιμή *in vitro* που προβλέπεται για την ανίχνευση δύο μονών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP) rs429358 και rs7412 στο ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA. Το κιτ επιτρέπει τον προσδιορισμό έξι γονότυπων Απολιποπρωτεΐνης E (APOE): e2/e2, e2/e3, e3/e3, e2/e4, e3/e4 και e4/e4 βάσει του RT-PCR.

Το αποτέλεσμα της δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® προβλέπεται για χρήση από γιατρούς, σε συνδυασμό με άλλους κλινικούς ελέγχους, προκειμένου να αξιολογηθεί το επίπεδο κινδύνου για την εκδήλωση της Νόσου Alzheimer (AD) σε ένα άτομο. Ένα άτομο με αλληλόμορφα γονίδια e2 εμφανίζει τον χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης AD, γεγονός που υποδεικνύει την προστατευτική δράση του. Η παρουσία αλληλόμορφων γονιδίων e3 παρατηρείται κυρίως σε φυσιολογικά άτομα και δεν αλλάζει τον κίνδυνο εκδήλωσης AD. Ένα άτομο με ένα μονό αλληλόμορφο γονίδιο e4 (ετερόζυγο e2/e4 ή e3/e4) σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης AD, σε σύγκριση με άλλους γονότυπους APOE χωρίς e4 (e2/e2, e2/e3 και e3/e3). Η παρουσία διπλών αλληλόμορφων γονιδίων e4 (ομόζυγο e4/e4) σχετίζεται με τον υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης AD, σε σύγκριση με όλους τους άλλους γονότυπους APOE.

Προϋποθέσεις χρήσης

- Για συνταγογραφούμενη χρήση
- Για χρήση σε ενήλικα άτομα (> 18 ετών)
- Για χρήση σε εργαστήρια μοριακής διάγνωσης από εξειδικευμένους χρήστες
- Αυτή η δοκιμή δεν αποτελεί αυτοματοποιημένη μέθοδο
- Η δοκιμή δεν μπορεί να εκτελεστεί από τον ασθενή στο σπίτι. Δεν αποτελεί ούτε συσκευή παρακλινικής διαγνωστικής εξέτασης, ούτε αυτοχορηγούμενη συσκευή δοκιμής.
- Αυτή η δοκιμή δεν έχει προβλεφθεί για να αντικαθιστά οποιαδήποτε κλινική και διαγνωστική εξέταση.

2. Εισαγωγή

Η Απολιποπρωτεΐνη E (APOE) είναι μια απολιποπρωτεΐνη χυλομικρών που εκφράζεται σε διάφορα όργανα όπως το ήπαρ, ο εγκέφαλος, η σπλήν, οι νεφροί, οι σεξουαλικοί αδένες, τα επινεφρίδια και τα μακροφάγα ([Marias, 2019](#)). Η APOE έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για διάφορες διεργασίες όπως για τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, των λιποδιαλυτών βιταμινών και της γλυκόζης/ενέργειας, καθώς και για τη μεταγωγή σήματος, τη μετάσταση και την αγγειογένεση. Επειδή είναι σημαντική για τον μεταβολισμό των λιπιδίων, η APOE συνδέεται στενά με καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς απαιτείται για τον φυσιολογικό καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνικών συστατικών ([Semaev et al., 2022](#)). Η σημασία της APOE στην παθογένεια των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως η μετωποκροταφική άνοια, η νόσος του Πάρκινσον, η άνοια με σωμάτια Lewy και η νόσος Alzheimer (AD), έχει καταγραφεί επαρκώς ([Davis et al., 2020](#); [Mishra et al., 2017](#)).

Το γονίδιο APOE έχει τρία κοινά αλληλόμορφα γονίδια (ε2, ε3 και ε4) και έξι σχετικούς γονότυπους (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 και ε2ε4) [Su et al., 2017]. Οι αντίστοιχες ισομορφές χαρακτηρίζονται από αμινοξέα στις θέσεις 112 και 158 και προσδιορίζουν τη σχέση με τους υποδοχείς λιποπρωτεΐνης. Το APOE ε3 είναι το πιο κοινό αλληλόμορφο γονίδιο που πιστεύεται ότι ούτε αυξάνει, ούτε μειώνει τον κίνδυνο εκδήλωσης AD. Έχει αποδειχτεί ότι το APOE ε2 έχει προστατευτική δράση ενάντια στην ανάπτυξη AD (Ohm et al., 1999), ενώ το APOE ε4 ελάττωσε την κάθαρση του βήτα-αμυλοειδούς (Αβ) το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη απόθεση Αβ εντός των νευρώνων στο μοντέλο ποντικού AD (Yamazaki et al., 2019). Περίπου το 25 τοις εκατό των ανθρώπων έχουν ένα αντίγραφο APOE ε4, ενώ το 2 με 3 τοις εκατό έχουν δύο αντίγραφα (<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>). Οι Mayeux et al., 1998 μελέτησαν 2188 ασθενείς AD και απέδειξαν ότι η παρουσία του γονότυπου APOE ε4 βελτιώνει την ακρίβεια της διάγνωσης AD, όταν συνδυάζεται με κλινικά κριτήρια. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο γονότυπος APOE ε4 σχετίζεται με την καθυστερημένη εκδήλωση γνώριμων και σποραδικών τύπων AD (Corder et al., 1993, Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993, Farrer et al., 1997, Bu G., 2009).

Το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® χρησιμοποιεί ποιοτική τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) για τον καθορισμό *in vitro* των δύο μεταλλάξεων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP): rs429358 και rs7412. Αυτή η δοκιμή IVD χρησιμοποιεί αισθητήρες φθορίζουσας σήμανσης (FAM και VIC), οι οποίοι επιτρέπουν την αλληλόμορφη διάκριση και τον καθορισμό των γονότυπων APOE.

3. Αρχή της δοκιμής

Το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® περιέχει αντιδραστήρια που είναι αναγκαία για την εκτέλεση της ανάλυσης qPCR, για τον έλεγχο γονιδιωματικού DNA (gDNA) που έχει εξαχθεί από δείγματα PAXgene DNA για τον προσδιορισμό γονότυπων APOE. Η δοκιμή αξιολογεί 2 SNP (rs429358 και rs7412) στο γονίδιο APOE και εμπεριέχει θετικό έλεγχο για κάθε SNP (άγριου τύπου, μεταλλαγμένο και ετερόζυγο). Ο γονότυπος προσδιορίζεται με βάση την κατάσταση μετάλλαξης και των δύο μεταλλάξεων υπό ανάλυση, οδηγώντας σε έναν από τους έξι πιθανούς γονότυπους (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4, και ε2ε4).

Για το αλληλόμορφο γονίδιο άγριου τύπου (ApoE3), η κυστεΐνη αμινοξέων εντοπίζεται στη θέση 112 και η αργινίνη στη θέση 158. Η μετάλλαξη ApoE4 (SNP rs429358) επηρεάζει το αμινοξύ στη θέση 112 με αποτέλεσμα την αλλαγή της θυμίνης σε κυτοσίνη προκαλώντας τη μετατροπή της αργινίνης αντί της κυστεΐνης. Ενώ η μετάλλαξη ApoE2 (SNP rs7412) επηρεάζει το αμινοξύ στη θέση 158, με αποτέλεσμα την αλλαγή της κυτοσίνης σε θυμίνη προκαλώντας τη μετατροπή της κυστεΐνης αντί της αργινίνης (Σχήμα 1).

APOE2	APOE3	APOE4
• CYS 112: TGC	• CYS 112: I GC	• ARG 112: C GC
• CYS 158: I GC	• ARG 158: C GC	• ARG 158: CGC

Σχήμα 1. Σχηματικό διάγραμμα του ανθρώπινου γονιδίου APOE και των πολυμορφισμών σε 2 μονονουκλεοτιδικά που έχουν ως αποτέλεσμα 3 αλληλόμορφα γονίδια ε2, ε3 και ε4.

4. Όργανα και υλικά

Το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® περιέχει αναλώσιμα για την εκτέλεση της ενίσχυσης qPCR και του φθορίζοντα εντοπισμού μεταλλάξεων APOE χρησιμοποιώντας το ThermoFisher QS5-Dx (αυτός ο εξοπλισμός δεν περιλαμβάνεται στο κιτ). Ο εξοπλισμός που είναι αναγκαίος για τη δοκιμή αλλά δεν διατίθεται με το κιτ και οι αναφορές του παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 3. Αναφορά του εξοπλισμού που είναι αναγκαίος για την εκτέλεση του κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®

Όργανο	Σκοπός	Κατασκευαστής	Αρ. αναφοράς	Πιστοποιήσεις
Nanodrop 2000/2000c	Ποσοτικοποίηση του gDNA	ThermoFisher	ND-2000	UL/CSA και CE
QS5-Dx	qPCR	ThermoFisher	A31928	FDA 510K (K190302)

Για την εξαγωγή gDNA από σωλήνες DNA πλήρους αίματος PAXgene, η Firalis προτείνει τη χρήση της αναφοράς που παρατίθεται στον πίνακα 2 σύμφωνα με την οδηγία του κατασκευαστή που παρέχεται μαζί με το κιτ.

Σε περίπτωση χρήσης άλλης αναφοράς, η Firalis δεν μπορεί να εγγυηθεί ούτε τα αποτελέσματα, ούτε την απόδοση της δοκιμής. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται στον σωλήνα DNA αίματος PAXgene® (BD Biosciences, αρ. αναφοράς: 761165) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης που παρέχονται από τον κατασκευαστή του σωλήνα συλλογής.

Πίνακας 4. Αναφορά του προτεινόμενου κιτ εξαγωγής gDNA (δεν παρέχεται μαζί με το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®).

Περιγραφή	Κατασκευαστής	Σκοπός	Αποθήκευση	Αναφορά	Ποσότητα
Μίνι κιτ DNA αίματος QIAamp DSP	Qiagen	Εξαγωγή gDNA	Σύμφωνα με τη σύσταση του προμηθευτή	61104	1κιτ/50δείγματα

4.1. Αντιδραστήρια και υλικά που παρέχονται με το κιτ

Το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® περιέχει έτοιμα για χρήση κύρια μείγματα για 32 αντιδράσεις ανά SNP, θετικοί έλεγχοι: Πρότυπο A, Πρότυπο B, Πρότυπο C, Πρότυπο D, Πρότυπο E και ένα φιαλίδιο δείγματος αναφοράς χωρίς DNA (NTC). Είναι δυνατές συνολικά 32 αντιδράσεις χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια από ένα κιτ, συμπεριλαμβανομένων 6 αντιδράσεων για τα πρότυπα και 2 NTC για κάθε SNP και για κάθε ανάλυση (Πίνακας 3).

Πίνακας 5. Περιεχόμενα του Κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®.

Περιγραφή	Αποθήκευση	Αναφορά	Ποσότητα
-----------	------------	---------	----------

			(32 αντιδράσεις)
Κύριο Μείγμα 1 rs429358 γονοτυπικής ανάλυσης TaqMan™	-15°C έως - 25°C	FLS-MM1OE- 02	1 φιαλίδιο
Κύριο Μείγμα 2 rs7412 γονοτυπικής ανάλυσης TaqMan™	-15°C έως - 25°C	FLS-MM2OE- 02	1 φιαλίδιο
Δείγμα αναφοράς χωρίς DNA (NTC)	-15°C έως - 25°C	FLS-NTC-01	1 φιαλίδιο
Πρότυπο Α: Μεταλλαγμένος οργανισμός (MUT) rs7412	-15°C έως - 25°C	FLS-OE2S-01	1 φιαλίδιο
Πρότυπο Β: Άγριος τύπος (WT) rs429358 και rs7412	-15°C έως - 25°C	FLS-OE3S-01	1 φιαλίδιο
Πρότυπο Γ: Μεταλλαγμένος οργανισμός (MUT) rs429358	-15°C έως - 25°C	FLS-OE4S-01	1 φιαλίδιο
Πρότυπο Δ: Ετερόζυγο (Het) rs7412	-15°C έως - 25°C	FLS-OE23S-01	1 φιαλίδιο
Πρότυπο Ε: Ετερόζυγο (Het) rs429358	-15°C έως - 25°C	FLS-OE34S-01	1 φιαλίδιο

*Θετικοί έλεγχοι: Πρότυπο Α, Πρότυπο Β, Πρότυπο Γ, Πρότυπο Δ, Πρότυπο Ε. Αρνητικός έλεγχος: NTC

4.2. Διάφορα απαιτούμενα υλικά και εξοπλισμοί

- ❧ Νερό χωρίς νουκλεάση
- ❧ Χρησιμοποιείτε μόνο πιστοποιημένα ακροφύσια χωρίς νουκλεάση και σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης
- ❧ Πιπέτες ακριβείας - Πιπέτα πολλαπλών καναλιών
- ❧ Θάλαμος BSL2
- ❧ Μικροφυγοκεντρητής (17000, Σχετική φυγόκεντρος δύναμη (RCF))
- ❧ Στρόβιλος και μικροφυγοκεντρητής
- ❧ Πλάκες PCR πραγματικού χρόνου
- ❧ Περιστροφέας συμπαγών πλακών PCR

4.3. Προϋποθέσεις αποθήκευσης και διάρκεια ζωής του κιτ

- ❧ Το κιτ πρέπει να φυλάσσεται στους -20°C.
- ❧ Τα εξαρτήματα του κιτ επιτρέπεται να αποψύχονται και να καταψύχονται επανειλημμένα τρεις φορές και παραμένουν σταθερά. Η υπέρβαση του συνιστώμενου κύκλου κατάψυξης και απόψυξης ενδέχεται να μειώσει τη λειτουργικότητα του κιτ.

- Το κιτ είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης του, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του κουτιού.

5. Εξαγωγή γονιδιωματικού DNA (gDNA) και ποσοτικοποίηση

5.1. Εξαγωγή

Εξαγωγή του gDNA από πλήρες ανθρώπινο αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωλήνες DNA αίματος PAXgene με τη χρήση του Μίνι κιτ DNA αίματος QIAamp DSP, όπως παρατίθεται στον πίνακα 2 σύμφωνα με το φύλλο δεδομένων των οδηγιών χρήσης που παρέχεται μαζί με το κιτ.

5.2. Ποσοτικοποίηση

Η ποσοτικοποίηση του εξαχθέντος gDNA πραγματοποιείται με τη χρήση Nanodrop. Τα δείγματα πρέπει να προσαρμοστούν, ώστε να έχουν 6,25 ng/μL εκ των οποίων τα 2 μL (12,5 ng) θα χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμή. Εάν τα δείγματα έχουν συγκέντρωση η οποία υπερβαίνει την προτεινόμενη συγκέντρωση, πρέπει να αραιώνονται σε νερό χωρίς νουκλεάση (Μοριακός βαθμός). Εάν τα δείγματα έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με την απαιτούμενη ποσότητα, προτείνεται η χρήση 2 μL συνολικά. **Η ποσότητα του δείγματος gDNA που χρησιμοποιείται για τη Δοκιμή γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® είναι 12,5 ng.**

6. Διαδικασία δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®

Η επισκόπηση της διαδικασίας δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Ο απαιτούμενος χρόνος για τη δοκιμή είναι : 2h30.

Πίνακας 6. Επισκόπηση της διαδικασίας δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy.

Διαδικασία	
Βήμα 1	Προετοιμασία αντίδρασης γονοτυπικής ανάλυσης PCR πραγματικού χρόνου
Βήμα 2	Εκτέλεση qPCR
Βήμα 3	Ανάλυση αποτελέσματος
Βήμα 4	Ερμηνεία

6.1. Βήμα 1. Προετοιμασία αντίδρασης γονοτυπικής ανάλυσης PCR πραγματικού χρόνου

Το κιτ αποτελείται από δύο έτοιμα για χρήση κύρια μείγματα γονοτυπικής ανάλυσης TaqMan™ για την αξιολόγηση των SNP APOE (rs429358 και rs7412), νερό χωρίς νουκλεάση για το NTC και από τα πρότυπα για τη μίμηση συνθηκών άγριου τύπου, μεταλλάξεων και ετερόζυγων για κάθε μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (SNP).

Κάθε κύριο μείγμα αποτελεί μια διπλοπλεγματική δοκιμή για την αξιολόγηση του SNP που σας ενδιαφέρει:

Κύριο μείγμα 1: αποτελούμενο απο 2 αισθητήρες για την αξιολόγηση του SNP rs429358 και για την επίτευξη της αλληλόμορφης διάκρισης για το νουκλεοτίδιο άγριου τύπου (T), το μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο (C) καθώς και για την ετεροζυγωτική κατάσταση.

Κύριο μείγμα 2: αποτελούμενο απο 2 αισθητήρες για την αξιολόγηση του SNP rs7412 και για την επίτευξη της αλληλόμορφης διάκρισης για το νουκλεοτίδιο άγριου τύπου (C), το μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο (T) καθώς και για την ετεροζυγωτική κατάσταση.

Πρότυπα A, B, C, D και E:

Κάθε πρότυπο (STD) είναι ένα πρότυπο DNA, σχεδιασμένο έτσι ώστε να μιμείται τα τρία αλληλόμορφα γονίδια και τον συνδυασμό των διαφορετικών προτύπων DNA που μιμούνται την ετερόζυγη κατάσταση.

Πρότυπο A: Πρότυπο DNA του αλληλόμορφου γονιδίου ApoE2

Πρότυπο B: Πρότυπο DNA του αλληλόμορφου γονιδίου ApoE3

Πρότυπο C: Πρότυπο DNA του αλληλόμορφου γονιδίου ApoE4

Πρότυπο D: Πρότυπο DNA με αλληλόμορφα γονίδια ApoE2 και ApoE3

Πρότυπο E: Πρότυπο DNA με αλληλόμορφα γονίδια ApoE3 και ApoE4

Σημείωση: Αποψύξτε τα κύρια μείγματα και τα πρότυπα που βρίσκονται σε κατάσταση κατάψυξης. Αναμείξτε τα αντιδραστήρια επιμελώς, περιστρέψτε τα σύντομα προς τα κάτω και καταψύξτε τα.

1. Διανείμετε κύριο μείγμα δοκιμής ανίχνευσης ποσότητας 23 μL/δοχείο σε μια πλάκα 96 δοχείων (πρέπει να προστεθεί για κάθε κύριο δείγμα που αντιστοιχεί και στα δύο SNP).
2. Προσθέστε 2 μL gDNA ή τα Πρότυπα στα αντίστοιχα δοχεία και περιστρέψτε τα σύντομα προς τα κάτω. Η συνολική ποσότητα gDNA σε μια αντίδραση θα πρέπει να είναι 12,5 ng.
 - Κάθε μεμονωμένο SNP **απαιτεί ανάλυση των προτύπων WT, MUT και HET**, καθώς και του **NTC** (μοριακός βαθμός νερού χωρίς νουκλεάση). Ένα σχέδιο δομής μοντέλου για την ανάλυση έως και 24 δειγμάτων DNA PAXgene που έχουν μετρηθεί για 2 SNP σε μια πλάκα PCR 96 δοχείων απεικονίζεται στον Πίνακα 5.
 - Σημείωση: Το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy επιτρέπει την εκτέλεση έως και 32 αντιδράσεων qPCR. Κάθε κύριο μείγμα προορίζεται για 8 STD και για έως και 24 δείγματα. Εάν πρόκειται να αξιολογηθεί μικρότερος αριθμός δειγμάτων, το κιτ μπορεί να χρησιμοποιηθεί δύο φορές, για παράδειγμα 8 STD συν 8 ασθενείς μπορούν να αξιολογηθούν μία φορά, ενώ τη δεύτερη φορά μπορούν να αξιολογηθούν ξανά 8 STD συν 8 ασθενείς.

Πίνακας 7. Δομή μοντέλου μιας πλάκας 96 δοχείων για γονοτυπική ανάλυση APOE 24 δειγμάτων, 3 ελέγχων/SNP σε διπλότυπο και 2 NTC/SNP για το Κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®.

APOE (rs429358)						APOE (rs7412)						
	Col 1	Col 2	Col 3	Col 4	Col 5	Col 6	Col 7	Col 8	Col 9	Col 10	Col 11	Col 12
A	STD B: WT	Δείγμα #1	Δείγμα #9	Δείγμα #17			STD B: WT	Δείγμα #1	Δείγμα #9	Δείγμα #17		
B	STD B: WT	Δείγμα #2	Δείγμα #10	Δείγμα #18			STD B: WT	Δείγμα #2	Δείγμα #10	Δείγμα #18		
C	STD C: MUT	Δείγμα #3	Δείγμα #11	Δείγμα #19			STD A: MUT	Δείγμα #3	Δείγμα #11	Δείγμα #19		
D	STD C: MUT	Δείγμα #4	Δείγμα #12	Δείγμα #20			STD A: MUT	Δείγμα #4	Δείγμα #12	Δείγμα #20		
E	STD E: HET	Δείγμα #5	Δείγμα #13	Δείγμα #21			STD D: HET	Δείγμα #5	Δείγμα #13	Δείγμα #21		
F	STD E: HET	Δείγμα #6	Δείγμα #14	Δείγμα #22			STD D: HET	Δείγμα #6	Δείγμα #14	Δείγμα #22		
G	NTC	Δείγμα #7	Δείγμα #15	Δείγμα #23			NTC	Δείγμα #7	Δείγμα #15	Δείγμα #23		
H	NTC	Δείγμα #8	Δείγμα #16	Δείγμα #24			NTC	Δείγμα #8	Δείγμα #16	Δείγμα #24		

- Τα ακόλουθα STD πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε προσδιορισμό της δοκιμής SNP όπως αναφέρεται παρακάτω. Για το rs429358 (Κύριο μείγμα 1) πρέπει να χρησιμοποιούνται τα πρότυπα B, C και E, ενώ για την αξιολόγηση του rs7412 (Κύριο μείγμα 2) πρέπει να χρησιμοποιούνται τα πρότυπα B, A και D (Πίνακας 6).

Πίνακας 8. Αντιστοίχιση προτύπων για τον προσδιορισμό SNP της δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy.

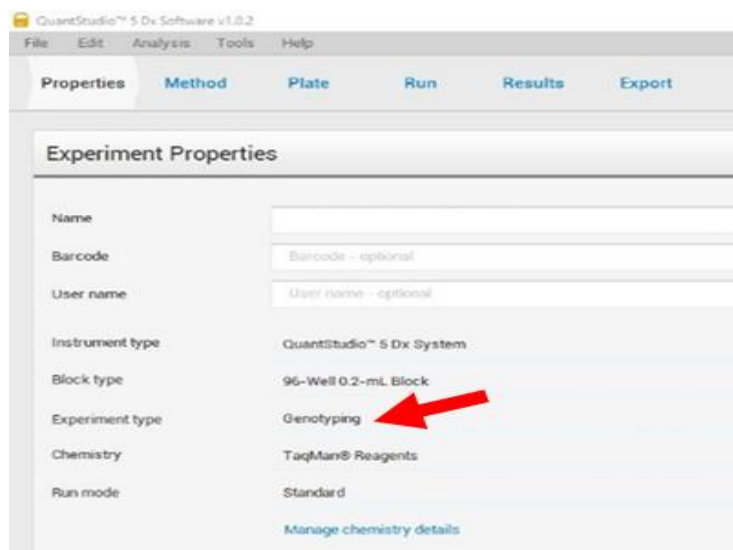
APOE (rs429358)	APOE (rs7412)
STD B (WT)	STD B (WT)
STD C (MUT)	STD A (MUT)
STD E (HET)	STD D (HET)

3. Στροβιλίστε την πλάκα για 5 δευτ. και φυγοκεντρίστε στα 500g για 30 δευτερόλεπτα.
4. Συνεχίστε αμέσως με την εκτέλεση.

6.2. Βήμα 2. Εκτέλεση qPCR

5. Ρύθμιση του QS5 Dx για τη δοκιμή γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy:

A. Στη σελίδα "Ιδιότητες", εκχωρήστε το όνομα της δοκιμής και επιλέξτε **γονοτυπική ανάλυση** ως τον τύπο δοκιμής (Σχήμα 2).



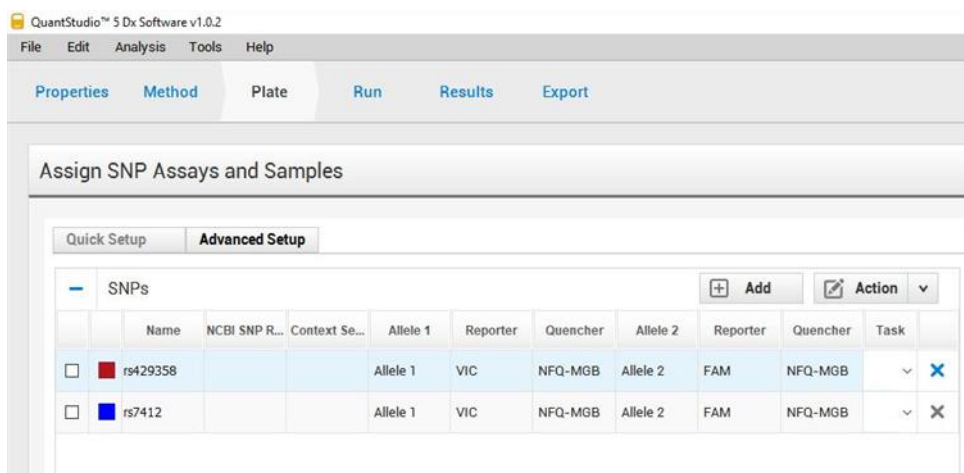
Σχήμα 2. Επιλογή τύπου δοκιμής στις ιδιότητες δοκιμής του λογισμικού QS5. Πρέπει να επιλέξετε τη γονοτυπική ανάλυση ως τύπο δοκιμής (κόκκινο βέλος).

Β. Στη σελίδα "Μέθοδος", ρυθμίστε τον συνολικό όγκο της αντίδρασης PCR, **25 µL** του μείγματος αντίδρασης.

Γ. Στο "Φύλλο πλάκας," μεταβείτε στις προηγμένες ρυθμίσεις. Για να ρυθμίσετε τον βαθμό φθορισμού, κάντε κλικ στο πεδίο "(+) Προσθήκη" για να λάβετε **δύο δοκιμές SNP** (Δοκιμή SNP 1 και Δοκιμή SNP 2). Κάντε κλικ στο κουμπί OK για να συνεχίσετε. Στη συνέχεια, για κάθε Δοκιμή SNP, κάντε κλικ στο κουμπί "Ενέργεια" και επιλέξτε "Επεξεργασία" για να συμπληρώσετε το όνομα ως εξής (Σχήμα 3):

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για τη **Δοκιμή SNP 1: rs429358** (Κύριο μείγμα 1). Βεβαιωθείτε ότι το **Αλληλόμορφο γονίδιο 1** έχει ρυθμιστεί με το γονίδιο αναφοράς **VIC** και το **Αλληλόμορφο γονίδιο 2** με το γονίδιο αναφοράς **FAM**

Για τη **Δοκιμή SNP 2: rs7412** (Κύριο μείγμα 2). Βεβαιωθείτε ότι το **Αλληλόμορφο γονίδιο 1** έχει ρυθμιστεί με το γονίδιο αναφοράς **VIC** και το **Αλληλόμορφο γονίδιο 2** με το γονίδιο αναφοράς **FAM**



Σχήμα 3. Ρύθμιση SNP για το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy στο λογισμικό QS5.

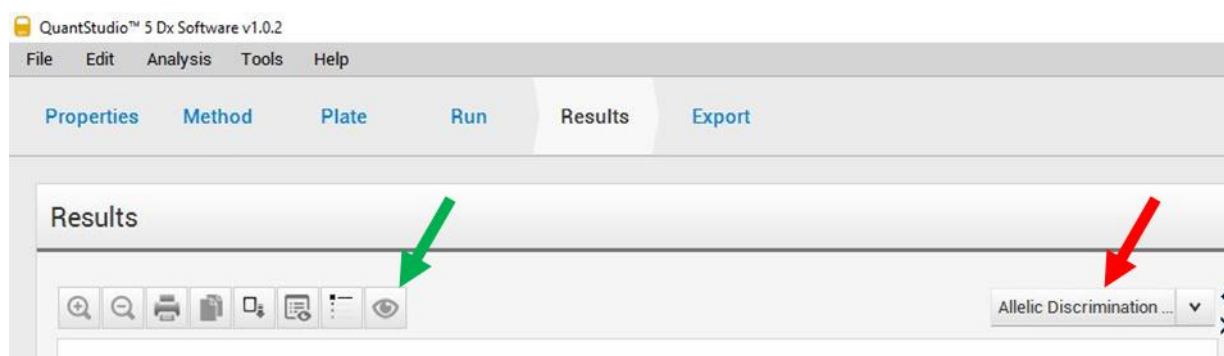
6. Για τον καθορισμό των προτύπων για το rs429358 (Κύριο μείγμα 1), επιλέξτε τη στήλη 1 στον σχεδιασμό της πλάκας και επιλέξτε τη Δοκιμή SNP 1 (rs429358). Στη συνέχεια, επιλέξτε A1 και B1 ("STD B (WT)") και καταχωρήστε 2/2 στη γραμμή εργασιών. Επιλέξτε C1 και D1 ("STD C (MUT)") και καταχωρήστε 1/1 στη γραμμή εργασιών. Επιλέξτε E1 και F1 ("STD E (HET)") και καταχωρήστε 1/2 στη γραμμή εργασιών. Επιλέξτε G1 και H1 και καταχωρήστε N στη γραμμή εργασιών "NTC".
7. Για τον καθορισμό των προτύπων για το rs7412 (Κύριο μείγμα 2), επιλέξτε τη στήλη 7 στον σχεδιασμό της πλάκας και επιλέξτε τη Δοκιμή SNP 2 (rs7412). Στη συνέχεια, επιλέξτε A7 και B7 ("STD B (WT)") και καταχωρήστε 1/1 στη γραμμή εργασιών. Επιλέξτε C7 και D7 ("STD A (MUT)") και καταχωρήστε 2/2 στη γραμμή εργασιών. Επιλέξτε E7 και F7 ("STD D(HET)") και καταχωρήστε 1/2 στη γραμμή εργασιών. Επιλέξτε G7 και H7 και καταχωρήστε N στη γραμμή εργασιών "NTC".
8. Για τον καθορισμό των δειγμάτων για το rs429358 (Κύριο μείγμα 1), επιλέξτε τις στήλες 2 έως 4 στον σχεδιασμό της πλάκας και επιλέξτε τη Δοκιμή SNP 1 (rs429358).
9. Για τον καθορισμό των δειγμάτων για το rs7412 (Κύριο μείγμα 2), επιλέξτε τις στήλες 8 έως 10 στον σχεδιασμό της πλάκας και επιλέξτε τη Δοκιμή SNP 2 (rs7412).
10. Μόλις η πλάκα είναι έτοιμη και η ρύθμιση έχει πραγματοποιηθεί, μεταβείτε στο φύλλο "Εκτέλεση" για την έναρξη της εκτέλεσης.
11. Το πρόγραμμα εκτέλεσης qPCR θα επιλεγεί αυτόματα από το QS5-Dx και οι προδιαγραφές του προγράμματος θα πρέπει να είναι όπως αναγράφεται στον Πίνακα 7 :

Πίνακας 9. Πρόγραμμα εκτέλεσης qPCR στη συσκευή QS5.

Πρόγραμμα	Θερμοκρασία °C	Χρόνος	Κύκλοι
Ενεργοποίηση	95	10 λεπτά	40
Μετουσίωση	95	15 δευτ	
Επέκταση	60	1 λεπτό	

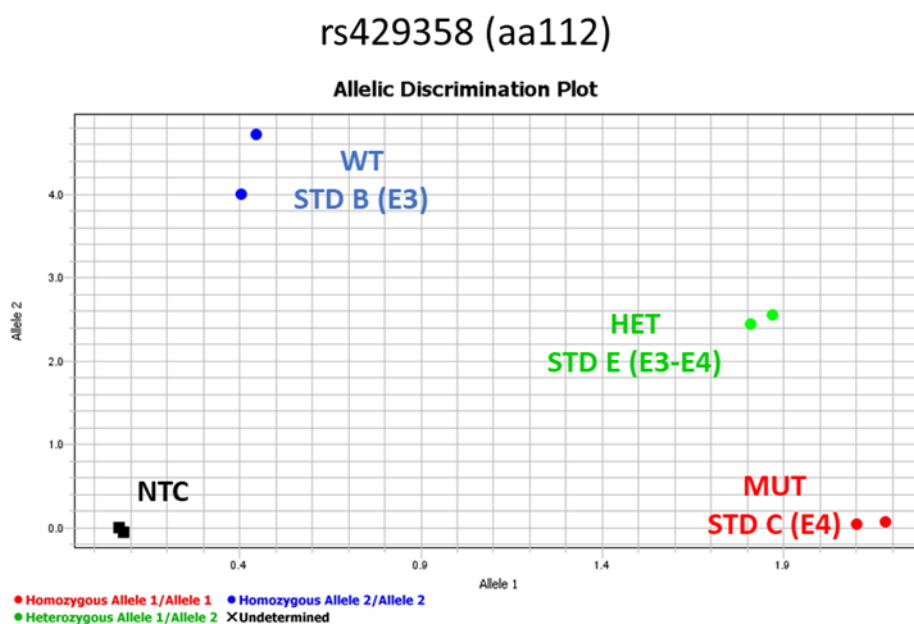
6.3. Βήμα 3. Ανάλυση αποτελέσματος

Πριν από την ανάλυση αποτελέσματος του δείγματος, επαληθεύστε το σήμα που έχει αποκτηθεί για το STD με την αντίστοιχη δοκιμή ανίχνευσης στη λειτουργία αλληλόμορφης διάκρισης. Τα αποτελέσματα της εκτέλεσης qPCR παρατίθενται στη σελίδα αποτελεσμάτων του λογισμικού QS5 Dx (Σχήμα 4). Στη σελίδα αυτή, επιλέξτε Αλληλόμορφη διάκριση (κόκκινο βέλος). Η εγκυρότητα της ανάλυσης θα πρέπει να αξιολογείται ξεχωριστά για κάθε μετάλλαξη. Η επιλογή του rs429358 ή του rs7412 μπορεί να πραγματοποιηθεί κάνοντας κλικ στο εικονίδιο που επισημαίνεται από το πράσινο βέλος.



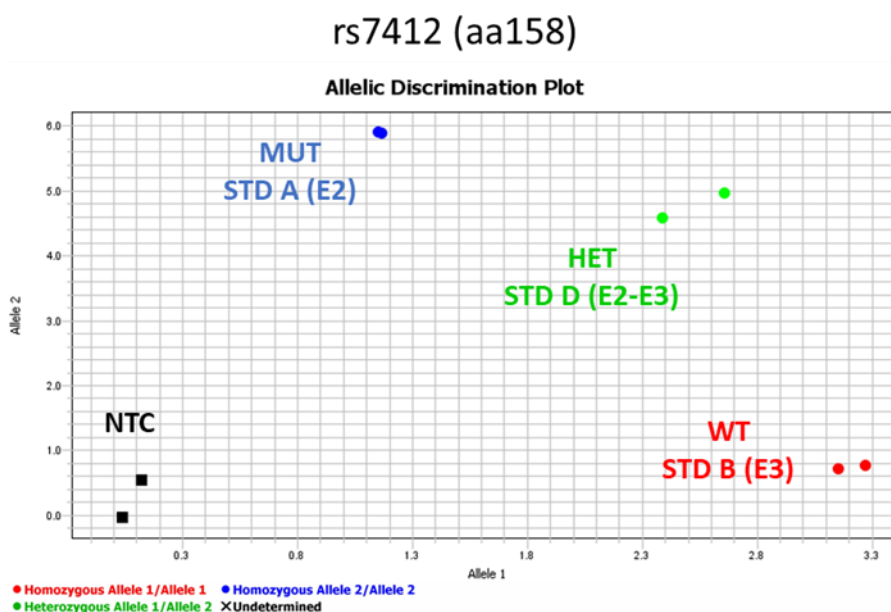
Σχήμα 4. Σελίδα αποτελεσμάτων εκτέλεσης qPCR στο λογισμικό QS5. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει τον τύπο αποτελέσματος προς επιλογή (Αλληλόμορφη διάκριση) και το πράσινο βέλος υποδεικνύει το εικονίδιο για την επιλογή των SNP.

Για το STD και το NTC, η ανάλυση μπορεί να συνεχιστεί όταν τα σήματα STD αντιστοιχούν στο ακόλουθο παράδειγμα. Βεβαιωθείτε ότι τα πρότυπά σας έχουν μοτίβο παρόμοιο με αυτό που απεικονίζεται στο Σχήμα 3. Για το rs429358, ο άγριος τύπος (WT) θα εμφανίζει το σήμα στην επάνω αριστερή περιοχή του γραφήματος στον άξονα y (αλληλόμορφο γονίδιο 2) που αντιστοιχεί στο ομόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο2/αλληλόμορφο γονίδιο2 (e3). Το πρότυπο μεταλλαγμένου οργανισμού (MUT) θα εμφανίζει σήμα κοντά στον άξονα x (αλληλόμορφο γονίδιο 1) στην κάτω δεξιά περιοχή του γραφήματος που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο γονίδιο1/αλληλόμορφο γονίδιο1 (e4). Το ετερόζυγο πρότυπο θα βρίσκεται μεταξύ των MUT και WT που αντιστοιχεί στο ετερόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο1/αλληλόμορφο γονίδιο2 (e3/e4), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5**. Το NTC δεν θα δημιουργήσει κανένα σήμα και θα βρίσκεται στην κάτω αριστερή περιοχή του γραφήματος.



Σχήμα 5. Μοτίβο των σημάτων των προτύπων για το SNP rs429358 (Κύριο μείγμα 1) μετά την ανάλυση qPCR.

Για το rs7412, ο άγριος τύπος (WT) θα εμφανίζει το σήμα κάτω δεξιά, κοντά στην περιοχή του άξονα x του γραφήματος που αντιστοιχεί στο ομόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο1/αλληλόμορφο γονίδιο1 (e3). Το πρότυπο μεταλλαγμένου οργανισμού (MUT) θα εμφανίζει ένα σήμα στην επάνω αριστερή περιοχή του άξονα y του γραφήματος που αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο γονίδιο2/αλληλόμορφο γονίδιο2 (e3). Το ετερόζυγο πρότυπο θα βρίσκεται μεταξύ των MUT και WT που αντιστοιχεί στο ετερόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο1/αλληλόμορφο γονίδιο2 (e2/e3), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6**. Το NTC δεν θα δημιουργήσει κανένα σήμα και θα βρίσκεται στην κάτω αριστερή περιοχή του γραφήματος.



Σχήμα 6. Μοτίβο των σημάτων των προτύπων για το SNP rs7412 (Κύριο μείγμα 2) μετά την ανάλυση qPCR.

6.4. Βήμα 4. Ερμηνεία

Μετά την επικύρωση των ελέγχων, τα σήματα των δειγμάτων ερμηνεύονται μέσω πατήματος στο εικονίδιο που υποδεικνύεται από το κόκκινο βέλος. Για κάθε SNP, η κατάσταση ασθενούς διατίθεται στη στήλη "Κλήση" (πράσινο βέλος, Σχήμα 7).



#	Well	Sample Na...	SNP Assay...	Task	Allele 1	Allele 2	Call
1	A1		rs429358	Unknown	Allele 1	Allele 2	Homozygous Allele 2/Allele 2
2	A2		rs429358	Unknown	Allele 1	Allele 2	Homozygous Allele 2/Allele 2
3	A3		rs429358	Unknown	Allele 1	Allele 2	Heterozygous Allele 1/Allele 2

Σχήμα 7. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων στο λογισμικό Q55. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει το εικονίδιο το οποίο ερμηνεύει το σήμα, ενώ το πράσινο βέλος υποδεικνύει την κατάσταση ασθενούς για κάθε SNP που προσδιορίζεται από το λογισμικό μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Για το rs429358, το ομόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο 2 / αλληλόμορφο γονίδιο 2 αντιστοιχεί στο WT, το ομόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο 1 / αλληλόμορφο γονίδιο 1 αντιστοιχεί στο MUT και το ετερόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο 1 / αλληλόμορφο γονίδιο 2 αντιστοιχεί στο HET.

Για το rs7412, το ομόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο 1 / αλληλόμορφο γονίδιο 1 αντιστοιχεί στο WT, το ομόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο 2 / αλληλόμορφο γονίδιο 2 αντιστοιχεί στο MUT και το ετερόζυγο αλληλόμορφο γονίδιο 1 / αλληλόμορφο γονίδιο 2 αντιστοιχεί στο HET.

Μόλις εκχωρηθεί η κατάσταση για κάθε SNP, ο γονότυπος του δείγματος μπορεί να καθοριστεί μέσω του παρακάτω Πίνακα 8.

Πίνακας 10. Ερμηνεία του γονότυπου από τα αποτελέσματα των SNP rs429358 και rs7412.

rs429358	rs7412	Γονότυπος
WT	MUT	e2/e2
WT	HET	e2/e3
WT	WT	e3/e3
HET	HET	e2/e4
MUT	WT	e4/e4
HET	WT	e3/e4

7. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών θα πρέπει να εκτελείται αφότου οι θετικοί και οι αρνητικοί έλεγχοι έχουν εξεταστεί και κριθεί ως έγκυροι και αποδεκτοί. Αν οι έλεγχοι δεν είναι έγκυροι, τα αποτελέσματα των δειγμάτων δεν μπορούν να ερμηνευτούν.

Σε περίπτωση αποτυχίας της δοκιμής:

- Ελέγξτε τις ημερομηνίες λήξης για κάθε αντιδραστήριο και βεβαιωθείτε ότι όλα τα αντιδραστήρια έχουν αποθηκευτεί όπως υποδεικνύεται στην ετικέτα του προϊόντος. Σε περίπτωση μη αυστηρής ακολούθησης των συνθηκών αποθήκευσης, τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα και το κιτ δεν μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί.
- Βεβαιωθείτε ότι οι βαθμονομήσεις των πιπετών που χρησιμοποιούνται έχουν διεξαχθεί πρόσφατα.
- Βεβαιωθείτε ότι οι ρυθμίσεις του κυκλοποιητή συμφωνούν με αυτές του IFU.

Οι πιθανοί λόγοι και οι διορθωτικές ενέργειες για μερικά από τα ευρήματα της δοκιμής διατίθενται παρακάτω στον Πίνακα 9.

Πίνακας 11. Συστάσεις αντιμετώπισης προβλημάτων για το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy

Ευρήματα	Πιθανοί λόγοι και διορθωτικές ενέργειες
Καμία κλήση σε όλα τα κανάλια ενός δείγματος	Πιθανότητα: προβλήματα με την ποσότητα του gDNA ή παρεμποδίζουσες ουσίες Σύσταση: εξάγετε το δείγμα ξανά και επαναλάβετε το qPCR.
Κανένα σήμα σε ένα ή δύο κανάλια	Πιθανότητα: εάν πρόκειται για ένα μόνο δείγμα, τότε επαναλάβετε το qPCR. Εάν πρόκειται για όλα τα δείγματα, τότε ελέγξτε την ημερομηνία λήξης του κιτ και τις συνθήκες αποθήκευσης.
Απροσδιόριστος γονότυπος για ένα SNP	Πιθανότητα: η ποσότητα gDNA δεν ήταν επαρκής. Σύσταση: Επαναλάβετε τη δοκιμή. Κατά τη διάρκεια της ίδιας δοκιμής και για το ίδιο δείγμα, χρησιμοποιήστε 2μL από το gDNA του δείγματος με 23μL του κύριου δείγματος και 4μL του gDNA του δείγματος με 21μL του κύριου μείγματος.
Μετά την εκ νέου διεξαγωγή της δοκιμής, ο γονότυπος παραμένει απροσδιόριστος	Πιθανότητα: παρουσία μίας παρεμποδίζουσας ουσίας στο δείγμα. Σύσταση: - Η προσθήκη του K2EDTA στον σωλήνα DNA PAXgene μπορεί να προκαλέσει παρεμβολές στη γονοτυπική ανάλυση του δείγματος. Παρακαλούμε ελέγξτε εάν προστέθηκαν EDTA στον σωλήνα ή εάν ο όγκος του δείγματος αίματος συλλέχθηκε σωστά, σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή. - Τα τριγλυκερίδια στο αίμα δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τη φυσιολογική συγκέντρωση (φυσιολογικό εύρος συγκέντρωσης αίματος: 0,5 - 1,5 g/L). Σε περίπτωση ύπαρξης υπερβολικής ποσότητας τριγλυκερίδιων στο

	δείγμα αίματος, τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης του ασθενούς ενδέχεται να είναι λανθασμένα. - Η αλβουμίνη δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τη φυσιολογική συγκέντρωση (φυσιολογικό εύρος συγκέντρωσης αίματος: 35 - 50 g/L). Σε περίπτωση ύπαρξης υπερβολικής ποσότητας αλβουμίνης στο δείγμα αίματος, τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης ενδέχεται να είναι λανθασμένα. Αν το πρόβλημα παραμένει, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής βοήθειας.
Τα χειριστήρια δεν έχουν σήμα	Βεβαιωθείτε ότι τηρήθηκαν οι συνθήκες αποθήκευσης, καθώς και οι οδηγίες που δόθηκαν. Ενδέχεται να έχει προκληθεί κάποιο πρόβλημα στις πιπέτες. Σύσταση: Επαναλάβετε τη δοκιμή. Εάν εξακολουθεί να μην υπάρχει σήμα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής βοήθειας.
Σήμα στο NTC	Πιθανότητα: το μείγμα αντίδρασης πιθανόν μολύνθηκε με πρότυπο δείγμα. Σύσταση: Επαναλάβετε το qPCR. Αν το πρόβλημα παραμένει, μην επαναχρησιμοποιήσετε το κιτ και επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής βοήθειας.

8. Αναλυτικές παράμετροι

Ακρίβεια: το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® είναι 100% ακριβές στην ανίχνευση γονότυπων APOE σε σύγκριση με τις μεθόδους αναφοράς (Αμφίδρομος προσδιορισμός αλληλουχίας του Sanger και προσδιορισμός αλληλουχίας επόμενης γενιάς).

Ευαισθησία: η δοκιμή γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® ανιχνεύει 12,5 ng ανθρώπινου gDNA κατά τη χρήση με το σύστημα QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR.

Εγκυρότητα: το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® είναι αναπαραξιμο με αποτελέσματα 100% θετικής συμφωνίας κατά τη δοκιμή διαφορετικών παρτίδων ή κατά τη χρήση απο διαφορετικούς χρήστες.

Παρεμβολές: μια πρόσθετη ποσότητα αιθανόλης έως 20%, μια πρόσθετη ποσότητα χολερυθρίνης έως 200 mg/mL, μια πρόσθετη ποσότητα K2EDTA έως 20 mg/mL, μια πρόσθετη ποσότητα αλβουμίνης έως 25 g/L, μια πρόσθετη ποσότητα αιμοσφαιρίνης έως 100 g/L ή μια πρόσθετη ποσότητα τριγλυκερίδιων έως 18,2 g/L στο δείγμα **δεν προκαλεί παρεμβολές** στα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης.

9. Κλινική απόδοση

Το κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy εκπληρώνει την προβλεπόμενη χρήση του, καθώς έχει 100% θετική συμφωνία εάν τα αποτελέσματα συγκριθούν με τον Αμφίδρομο προσδιορισμό αλληλουχίας του Sanger και τον Στοχευμένο προσδιορισμό αλληλουχίας επόμενης γενιάς.

Πίνακας 12 Η γονοτυπική ανάλυση APO-Easy έχει 100% ακρίβεια

Γονότυπος APOE	APO-Easy®	Στοχευμένος NGS	Σωστές κλήσεις γονότυπου	Ακρίβεια	Προσδιορισμός αλληλουχίας Sanger	Σωστές κλήσεις γονότυπου	Ακρίβεια
e3/e3	25	25	25	100	25	25	100
e4/e4	21	21	21	100	21	21	100
e2/e4	6	6	6	100	6	6	100
e3/e4	23	23	23	100	23	23	100
e2/e3	21	21	21	100	21	21	100

Όταν οι συχνότητες των γονότυπων APOE των ατόμων με νόσο Αλτσχάιμερ συγκρίθηκαν με τις συχνότητες των ατόμων χωρίς νόσο Αλτσχάιμερ και των ατόμων υγιούς ελέγχου, η παρουσία δύο αντιγράφων του αλληλόμορφου γονιδίου e4 (ομοζυγωτικό e4/e4) αύξησε τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου AD 48,56 φορές σε σύγκριση με το αλληλόμορφο γονίδιο e2/e3. Η παρουσία ενός αντιγράφου του αλληλόμορφου γονιδίου e4 αύξησε τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου AD 9.54 φορές και 5.78 φορές για ετεροζυγωτικά e3/e4 και ετεροζυγωτικά e2/e4 αντίστοιχα σε σύγκριση με τα e2/e3.

Πίνακας 13 Συγκρίσεις βάσει γονότυπων μεταξύ AD και NAD + HC

Γονότυπος	Ομάδα		OR [95% CI]	p
	AD (n=234)	NAD + HC (n=302)		
e2/e2	0 (0)	1 (0.33)	1.47 [0.05-39.32]	0.8181
e2/e3	8 (3.42)	37 (12.25)	1 (ref)	
e2/e4	5 (2.14)	4 (1.32)	5.78 [1.26-26.45]	0.0237*
e3/e3	80 (34.19)	208 (68.87)	1.78 [0.79-3.98]	0.1616
e3/e4	99 (42.31)	48(15.89)	9.54 [4.12-22.06]	<0.0001*
e4/e4	42 (17.95)	4 (1.32)	48.56 [13.52-174.49]	<0.0001*

10. Υπολειπόμενοι κίνδυνοι και προειδοποιήσεις

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης και σχεδιασμού του κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® έχουν βελτιστοποιηθεί μέσω εκτενών δοκιμών εντός της εταιρείας, καθώς και από προβλεπόμενους χρήστες, όπως επαληθεύεται κατά τη δοκιμή σε πληθυσμούς που αντιπροσωπεύουν τον προβλεπόμενο πληθυσμό ασθενών. Η Firalis, η κατασκευάστρια εταιρεία, θεωρεί τους υπολειπόμενους κινδύνους για τους χρήστες και τους ασθενείς ως αμελητέους και αποδεκτούς για γενετικές δοκιμές.

- Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τους κινδύνους για την υγεία και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη διαχείριση των ασθενών.

Τα αρνητικά και τα θετικά αποτελέσματα πρέπει να συνδυάζονται με κλινικές εξετάσεις, με το ιστορικό των ασθενών και με άλλα στοιχεία ελέγχου.

Οι κίνδυνοι από τη χρήση του κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy είναι ελάχιστοι εάν η δοκιμή χρησιμοποιείται με τον προβλεπόμενο τρόπο. Οι χρήστες μπορούν να ελαχιστοποιήσουν περαιτέρω τον κίνδυνο τηρώντας τις παρακάτω συστάσεις:

Επιμόλυνση δειγμάτων: η επιμόλυνση των δειγμάτων με εξωγενές DNA ή πιθανές παρεμβολές μπορούν να προκαλέσουν ανακριβή αποτελέσματα. Η χρήση καθαρών χώρων εργασίας, γαντιών μίας χρήσης και ειδικού εξοπλισμού για την προετοιμασία των δειγμάτων θα μετριάσει αυτόν τον υπολειπόμενο κίνδυνο.

Διασταυρούμενη επιμόλυνση: ο ακατάλληλος χειρισμός αντιδραστηρίων ή δειγμάτων μπορεί να προκαλέσει διασταυρούμενη επιμόλυνση και συνεπώς λανθασμένα αποτελέσματα. Διατηρείτε ξεχωριστούς χώρους εργασίας για την προετοιμασία δειγμάτων, την εξαγωγή DNA, τη ρύθμιση PCR και εργάζεστε σε καθαρό περιβάλλον κατά τον χειρισμό των πιπετών και άλλου εξοπλισμού για την αποτροπή της διασταυρούμενης επιμόλυνσης.

Ανάγνωση αποτελεσμάτων: Οι άπειροι χρήστες ενδέχεται να παρερμηνεύσουν τα αποτελέσματα και να εξάγουν λανθασμένα συμπεράσματα. Η ερμηνεία της δοκιμής γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy πρέπει να γίνεται από εκπαιδευμένο προσωπικό για την ελαχιστοποίηση οποιουδήποτε κινδύνου λήψης λανθασμένων αποτελεσμάτων.

Ανεπαρκής εκπαίδευση: οι χρήστες με ανεπαρκή εκπαίδευση ή εμπειρία ενδέχεται να είναι επιρρεπείς σε λάθη κατά τη ρύθμιση ή την ερμηνεία της δοκιμής. Η χρήση του τεστ APO-Easy θα πρέπει να γίνεται μόνο από προσωπικό υψηλής εξειδίκευσης.

11. Περιορισμοί της διαδικασίας

- ❧ Τα αντιδραστήρια δεν προβλέπονται για χρήση σε θεραπευτικές διαδικασίες.
- ❧ Δεν πρόκειται για αυτοματοποιημένη μέθοδο, ούτε για συσκευή αυτοδιάγνωσης.
- ❧ Η δοκιμή αυτή έχει σχεδιαστεί για τον εντοπισμό του γονότυπου APOE από σωλήνες ανθρώπινου DNA PAXgene, εντός του εύρους εντοπισμού της δοκιμής.
- ❧ Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτήν τη δοκιμή πρέπει να ερμηνεύονται εντός του πλαισίου όλων των σχετικών κλινικών εργαστηριακών ευρημάτων και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά σε οποιαδήποτε διάγνωση.
- ❧ Η μόλυνση των γονιδιωματικών υλικών από εξωτερικές πηγές πρέπει να αποφεύγεται μέσω προσεκτικού χειρισμού των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων του κιτ, καθώς και μέσω ενός καθαρού περιβάλλοντος εργασίας.
- ❧ Οι χρήστες πρέπει να αποφεύγουν τους μικροβιακούς ρύπους κατά τη διάρκεια των διαδικασιών και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούν τα εξαρτήματα του κιτ σε περίπτωση παρατήρησης εμφανούς μικροβιακής ανάπτυξης.
- ❧ Αυτό το κιτ προβλέπεται για χρήση μαζί με το σύστημα PCR πραγματικού χρόνου QS5-Dx (ThermoFisher).
- ❧ Η αυστηρή συμμόρφωση με τις συστάσεις που παρέχονται στο κιτ δοκιμής IFU είναι εξαιρετικά σημαντική για την απόκτηση των βέλτιστων αποτελεσμάτων.
- ❧ Πρέπει να δίνεται προσοχή στις ημερομηνίες λήξης και στις συνθήκες αποθήκευσης για κάθε κουτί στο κιτ. Απαγορεύεται η χρήση εάν το κιτ έχει λήξει ή εάν δεν έχει αποθηκευτεί σωστά.
- ❧ Απαγορεύεται η ανάμειξη ή η αντικατάσταση των αντιδραστηρίων με άλλα αντιδραστήρια από άλλες παρτίδες ή πηγές.
- ❧ Χρησιμοποιείτε μόνο πιστοποιημένα ακροφύσια χωρίς νουκλεάση και σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης.
- ❧ Χρησιμοποιείτε νερό χωρίς νουκλεάση που έχει αποθηκευτεί σε καθαρά δοχεία.
- ❧ Οποιαδήποτε αλλαγή στη διαδικασία που περιγράφεται στο IFU μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα.
- ❧ Η γονοτυπική ανάλυση APO-Easy® δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη ή την αναγνώριση των τρόπων θεραπείας ή για την επιλογή της βέλτιστης θεραπείας για τους ασθενείς.

12. Οδηγίες χημικής ασφάλειας

Για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων από χημικές ουσίες:

- ❧ Πρέπει να διαβάσετε και να κατανοήσετε τα Δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS) που παρέχονται από τον κατασκευαστή της χημικής ουσίας προτού αποθηκεύσετε, χειριστείτε ή εργαστείτε με οποιαδήποτε χημική ουσία ή επικίνδυνο υλικό.
- ❧ Αποφύγετε την άμεση επαφή με τις χημικές ουσίες.
- ❧ Φοράτε κατάλληλο εξοπλισμό ατομικής προστασίας κατά τον χειρισμό των χημικών ουσιών, όπως προστατευτικά γυαλιά, γάντια και ρουχισμό.
- ❧ Αποφύγετε την εισπνοή των χημικών ουσιών. Μην καπνίζετε και μην αφήνετε τα χημικά δοχεία ανοιχτά. Η χρήση τους πρέπει να γίνεται μόνο εφόσον υπάρχει επαρκής εξαερισμός ή απορροφητήρας αερίων.
- ❧ Για πρόσθετες οδηγίες ασφαλείας, συμβουλευτείτε το ΔΔΑ.
- ❧ Ελέγχετε τακτικά αν υπάρχουν διαρροές ή σταξίματα χημικών ουσιών. Σε περίπτωση διαρροής ή σταξίματος, τηρείτε τις διαδικασίες καθαρισμού του κατασκευαστή όπως συστήνεται στο ΔΔΑ.
- ❧ Τηρείτε όλους τους τοπικούς, κρατικούς/δημοτικούς ή εθνικούς νόμους και κανονισμούς που σχετίζονται με την αποθήκευση, τον χειρισμό και την απόρριψη χημικών ουσιών.

13. Τεχνικές συμβουλές

- ❧ Για τεχνική βοήθεια σχετικά με την εξαγωγή DNA ανατρέξτε στο φύλλο δεδομένων που παρέχεται με το προτεινόμενο μίνι κιτ DNA αίματος QIAamp DSP (αναφορά: 61104) από τη Qiagen.
- ❧ Αποφεύγετε οποιαδήποτε επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων. Για αυτόν τον σκοπό, αλλάζετε ακροφύσια σε κάθε βήμα. Η μόλυνση από βακτήρια ή μύκητες σε οποιοδήποτε αντιδραστήριο μπορεί να προκαλέσει λανθασμένα αποτελέσματα.
- ❧ Απορρίψτε τα αναλώσιμα υλικά και τα μη χρησιμοποιημένα περιεχόμενα στα κατάλληλα δοχεία.
- ❧ Η διαδικασία πρέπει να διεξάγεται μόνο με χρήση πλήρους αίματος από σωλήνες DNA PAXgene.

14. Ευθύνη

- ❧ Αυτό το κιτ προβλέπεται μόνο για τον προσδιορισμό *in vitro* του γενότυπου APOE σε πλήρες ανθρώπινο αίμα από σωλήνες PAXgene DNA.
- ❧ Αυτό το κιτ προβλέπεται για χρήση μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό.
- ❧ Η Firalis δεν φέρει καμία ευθύνη για οποιαδήποτε ζημιά ή απώλεια λόγω της χρήσης του κιτ με οποιονδήποτε διαφορετικό τρόπο από αυτόν που δηλώνεται ρητά στις παρούσες οδηγίες.
- ❧ Η Firalis δεν φέρει καμία ευθύνη για τυχόν παραβιάσεις διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας οι οποίες μπορεί να προκληθούν από τη χρήση ή τα παράγωγα αυτού του προϊόντος.

Τεχνική βοήθεια

Για τεχνική βοήθεια, καλέστε τη Firalis SA Technical Services στο +33-389 911 320 ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα της Firalis SA στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.firalis.com> ή στείλτε e-mail στο "contact@firalis.com".

Υπόδειξη για τη δήλωση σοβαρών περιστατικών

Ένα σοβαρό περιστατικό αποτελεί την αιτία οποιασδήποτε δυσλειτουργίας ή επιδείνωσης των χαρακτηριστικών ή της απόδοσης μιας συσκευής και μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες συνέπειες:

- Θάνατος ενός ασθενούς, χρήστη ή άλλου ατόμου
- Προσωρινή ή μόνιμη σοβαρή επιδείνωση στην κατάσταση της υγείας ενός ασθενούς, χρήστη ή κάποιου άλλου ατόμου
- Σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία.

Σε περίπτωση αμφιβολίας, οι χρήστες θα πρέπει πάντα να δηλώνουν το περιστατικό.

Εάν καταλήξετε στο συμπέρασμα ότι έχει προκύψει περιστατικό το οποίο πρέπει να δηλωθεί, παρακαλούμε επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή στην ηλεκτρονική διεύθυνση clinical@firalis.com. Μπορείτε επίσης να βρείτε τα στοιχεία επικοινωνίας του αρμόδιου φορέα στη χώρα σας στην ακόλουθη ιστοσελίδα: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en.

Κατά τη δήλωση ενός σοβαρού περιστατικού, παρακαλούμε συλλέξτε τις ακόλουθες πληροφορίες:

- Εμπορικό όνομα της συσκευής ("TM" σημαίνει "Εμπορικό όνομα", "©" σημαίνει "Πνευματικά δικαιώματα")
- Όνομα και διεύθυνση του κατασκευαστή
- Αριθμός παρτίδας
- Σειριακός αριθμός
- Κωδικός UDI (Μοναδικό Αναγνωριστικό Συσκευής)
- Μια ακριβής και περιεκτική περιγραφή του σοβαρού περιστατικού και των σοβαρών ή δυνητικά σοβαρών συνεπειών για τον ασθενή, τον χρήστη ή ένα τρίτο άτομο.

Η εν λόγω συσκευή δεν θα πρέπει να απορρίπτεται και θα πρέπει να αποστέλλεται στον κατασκευαστή για περαιτέρω ανάλυση για τον προσδιορισμό των αιτιών του συμβάντος. Μπορείτε να προσθέσετε το αίτημά σας για επιστροφή του προϊόντος κατά την επικοινωνία σας με τον κατασκευαστή για τη δήλωση του περιστατικού.

Περίληψη ασφάλειας και απόδοσης

Η Περίληψη ασφάλειας και απόδοσης του κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® έχει επικυρωθεί από τον αρμόδιο φορέα 2797 (BSI group) και διατίθεται δημόσια στην ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής βάσης δεδομένων ιατροτεχνολογικών συσκευών (Eudamed) μέσω της χρήσης του αριθμού UDI-DI του κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy® στη βάση δεδομένων. Αυτό το αναγνωριστικό διατίθεται μαζί με τον κωδικό QR, ο οποίος υπάρχει στην ετικέτα συσκευασίας του κιτ.

Η Περίληψη ασφάλειας και απόδοσης θα ενημερώνεται τακτικά με οποιαδήποτε σχετική πληροφορία που αφορά στο κιτ γονοτυπικής ανάλυσης APO-Easy®.

Παραπομπές

1. Marias, A.D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health, and cardiovascular disease. *Pathology* **2019**, 51, 165–176.
2. Semaev, S., Shakhtshneider, E., Shcherbakova, L., Ivanoshchuk, D., Orlov, P., Malyutina, S., Gafarov, V., Ragino, Y., Voevoda, M. Associations of APOE Gene Variants rs429358 and rs7412 with Parameters of the Blood Lipid Profile and the Risk of Myocardial Infarction and Death in a White Population of Western Siberia. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022, 44, 1713-1724. <https://doi.org/10.3390/cimb44040118>.

3. Davis AA et al (2020) APOE genotype regulates pathology and disease progression in synucleinopathy. *Sci Transl Med*:12(529)
4. Mishra A, Ferrari R, Heutink P, Hardy J, Pijnenburg Y, Posthuma D, et al. Gene-based association studies report genetic links for clinical subtypes of frontotemporal dementia. *Brain*. 2017;140(5):1437–46.
5. Su WH, Shi ZH, Liu SL, Wang XD, Liu S, Ji Y. Updated meta-analysis of the role of APOE ε2/ε3/ε4 alleles in frontotemporal lobar degeneration. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):43721-43732. doi: 10.18632/oncotarget.17341.
6. Ohm, T., Scharnagl, H., März, W. et al. Apolipoprotein E isoforms and the development of low and high Braak stages of Alzheimer's disease-related lesions. *Acta Neuropathol* 98, 273–280 (1999). <https://doi.org/10.1007/s004010051080>.
7. Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T.R. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* 15, 501–518 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>.
8. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's disease centers consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 1998;338(8):506–11.
9. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921–3. doi: 10.1126/science.8346443. PMID: 8346443.
10. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 15;90(20):9649–53. doi: 10.1073/pnas.90.20.9649.
11. Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., et al. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1977–1981. doi: 10.1073/pnas.90.5.1977
12. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, et al. Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-analysis. *JAMA*. 1997;278(16):1349–1356. doi:10.1001/jama.1997.03550160069041.
13. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2009 May;10(5):333–44. doi: 10.1038/nrn2620.

Υπόμνημα συμβόλων που χρησιμοποιούνται στο IFU και στις ετικέτες του κιτ

	In vitro διαγνωστική συσκευή		Μη αποστειρωμένη ιατροτεχνολογική συσκευή
	Αριθμός καταλόγου		Απαγορεύεται η χρήση εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιές
	Κωδικός παρτίδας		Αξιολόγηση Ευρωπαϊκής Συμμόρφωσης από την BSI
	Περιορισμοί θερμοκρασίας		Προειδοποίηση
	Ημερομηνία λήξης		Επαρκές περιεχόμενο για <n> δοκιμές
	Ημερομηνία κατασκευής		Τοξικό ή πολύ τοξικό
	Κατασκευαστής		Ανατρέξτε στις οδηγίες λειτουργίας
	Βιολογικός κίνδυνος		Απαγορεύεται η επαναχρησιμοποίηση



Σας ευχαριστούμε που επιλέξατε τη Firalis

Για περαιτέρω πληροφορίες, MSDS ή οδηγίες σε άλλες γλώσσες, παρακαλούμε επικοινωνήστε μαζί μας στην ακόλουθη ηλεκτρονική διεύθυνση:

contact@firalis.com