



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

RIDA® GENE Factor V

REF PY1210



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
☎ +49 (0) 61 51 81 02-0 / 🖨 +49 (0) 61 51 81 02-20 / 🌐 www.r-biopharm.com



Deutsch	3
English.....	17
Español.....	31
Français.....	45
Italiano	59
Português	73

RIDA®GENE Factor V

REF

 PY1210

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Mit dem RIDA®GENE Factor V Kit wird eine Punktmutation G zu A an Position 1691 im humanen Faktor V-Gen (Factor V-Leiden Mutation) in genomischer DNA, die aus humanen EDTA-Vollblutproben isoliert wurde, mittels real-time PCR qualitativ nachgewiesen.

Das RIDA®GENE Factor V Kit soll die Diagnose bei der Beurteilung von Patienten mit Verdacht auf Thrombophilie unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Thrombosen sind ein großes medizinisches Problem, das altersabhängig ansteigt. Ungefähr 1 von 100.000 Personen unter 40 Jahren erkrankt an einer venösen Thrombose. Diese Wahrscheinlichkeit steigt bei Personen über 75 Jahre auf 1 von 100 Personen pro Jahr⁽¹⁾. Faktor V Leiden gilt als der häufigste genetische Faktor, der in Verbindung mit der Entwicklung von venösen Thromboembolien beschrieben wird⁽²⁾. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation im Faktor V Gen an Position 1691, die zu einem Basenaustausch von G zu A führt. Daraus resultierend steht die Bindestelle für das aktivierte Protein C mit gerinnungshemmender Wirkung nicht mehr zur Verfügung (APC Resistenz) und Faktor V wird im Vergleich zum Wildtyp weniger abgebaut, was zu einem hyperkoagulablen Zustand führt⁽³⁾. Faktor V Leiden ist weit verbreitet mit hoher Prävalenz in Europa und nahezu keinen Fällen in Asien und Afrika⁽²⁾. Die Wahrscheinlichkeit, eine venöse Thrombose zu erleiden ist mit der genetischen Veränderung im Faktor V Gen um das 3 bis 8-fache höher, wenn diese Veränderung heterozygot vorliegt. Bei einer homozygoten Mutation an Position 1691 steigt die Wahrscheinlichkeit auf das 10 bis 80-fache. Darüber hinaus steigt in diesem Fall auch die Möglichkeit, eine venöse Thrombose im jungen Alter zu erleiden⁽²⁾. Kommen zu dieser Mutation auch weitere Faktoren, wie z. B. eine Mutation im Faktor II Gen (G20210A), steigt zusätzlich das Risiko von wiederkehrenden Thrombosen⁽¹⁾.

3. Testprinzip

Mit dem RIDA®GENE Factor V Kit wird eine Punktmutation / SNP (single nucleotide polymorphism) G zu A an Position 1691 im humanen Faktor V-Gen (Factor V-Leiden Mutation) in genomischer DNA, die aus humanen EDTA-Vollblutproben isoliert wurde, mittels real-time PCR qualitativ nachgewiesen.

Nach der DNA-Isolierung wird das spezifische Genfragment (Wildtyp oder Mutation) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

Tab. 1: Packungsinhalt

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	gelb, gebrauchsfertig
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µl	rot, gebrauchsfertig
A	Control A	1 ×	200 µl	blau, gebrauchsfertig
B	Control B	1 ×	200 µl	grün, gebrauchsfertig

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-20 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-20 °C	20 Tau-/Frier-Zyklen

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Verwendung des RIDA®GENE Factor V Kits benötigt:

Zubehör
Extraktionsplattform: Maxwell® RSC (Promega)
Real-time PCR Geräte: • LightCycler® 480 II (Roche) • cobas z 480 Analyzer (Roche) • Mx3005P (Agilent Technologies) • ABI 7500 (Applied Biosystems) • CFX96™ (Bio-Rad)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) bei Verwendung des LightCycler® 480 II und cobas z 480 Analyzer
Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten (low profile, white wells, clear frame), Reaktionsgefäße, Folien)
Zentrifuge mit Rotor für Platten
Vortexer
Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
Pipettenspitzen mit Filtern
Puderfreie Einmalhandschuhe

Bei Fragen zur Verwendung von Geräten zur automatischen Abarbeitung wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG unter pcr@r-biopharm.de.

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken. Eine räumliche Trennung, gesonderte Kleidung und Instrumente für Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten um eine Querkontamination oder falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Control A, Control B) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit darf nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 Probenlagerung

Der Test ist für die Untersuchung humaner EDTA-Vollblutproben entwickelt worden. Bis zur DNA-Extraktion sind die Proben bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden und bei 2 - 8 °C bis zu 72 Stunden zu lagern⁽⁴⁾. Eine mikrobielle Kontamination der Proben ist unbedingt zu vermeiden. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut

Für die DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC Instrument (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Bei Verwendung des Maxwell® RSC Instruments (Promega) wird empfohlen die Blutproben für mindestens 5 min bei Raumtemperatur durchzumischen. Für die Probenvorbereitung sollen in ein 2 ml Reaktionsgefäß 30 µl Proteinase K zugefügt werden. Aus der Blutprobe sollen 200 µl und aus dem Lysepuffer 300 µl hinzugefügt werden. Den Ansatz 10 s vortexen und für 20 min bei 56 °C inkubieren. Bei der Extraktion müssen 100 µl des Elutionspuffers eingesetzt werden. Die weiteren Angaben des Herstellers sind zu beachten.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf müssen die Control A und Control B mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Control A** und die **Control B** auftauen, vortexen (mit Ausnahme der Taq-Polymerase) und kurz zentrifugieren. Reagenzien sind während der Arbeitsschritte stets geeignet zu kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Platten) pipettieren.

Proben: Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Kontrollen: Je 5 µl Control A zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Je 5 µl Control B zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 4, Tab. 5).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®GENE Assays wurde das RIDA®GENE Factor V Kit im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA und RNA Assays miteinander zu kombinieren. Daher ist im Universalprofil eine reverse Transkription vorangestellt.

Tab. 4: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® 480 II und cobas z 480 Analyzer

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 5: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500 und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 II	Faktor V WT	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	Mutation	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Faktor V WT	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	Mutation	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Faktor V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Faktor V WT	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	Mutation	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Faktor V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. **Control A** und **Control B** müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7).

Tab. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	FAM	VIC	Zielgen Ct
Control A	+	-	Siehe Certificate of Analysis
Control B	-	+	Siehe Certificate of Analysis

* + = positiv
- = negativ

Wenn die beiden Kontrollen, **Control A** und **Control B**, nicht spezifikationsgerecht sind, ist der gesamte PCR-Lauf zu wiederholen. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse*

Nachweis von		
<i>Faktor V WT</i>	<i>Mutante</i>	Ergebnis
+	-	Faktor V Wildtyp (homozygot) nachweisbar
-	+	Faktor V Mutation in Position 1691 (homozygot) nachweisbar
-	-	Zielsequenz nicht nachweisbar, ungültig
+	+	Heterozygoter Phänotyp

* + = positiv
- = negativ

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn die Kontrollen im Nachweissystem keine Amplifikationen bzw. keiner der Targetkanäle ein positives Ergebnis zeigen. Der gesamte PCR-Lauf ist zu wiederholen.

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn die Probe im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In diesem Fall wurde entweder die DNA nicht zugegeben oder ungeeignete Template-DNA (Qualität, PCR-Inhibitoren) verwendet. Die extrahierte Probe sollte erneut amplifiziert oder die Isolierung und Reinigung der Probe sollte verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das RIDA®GENE Factor V Kit weist die Position 1691 sowie deren möglichen SNP (single nucleotide polymorphism) im humanen Faktor V-Gen (Factor V-Leiden Mutation) aus humanen EDTA Vollblutproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur für humane EDTA-Vollblutproben validiert.
4. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
6. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.
7. Das Gendiagnostikgesetz (GenDG) setzt für alle genetischen Analysen gemäß GenDG eine ausführliche Aufklärung und eine schriftliche Einwilligung der Patienten voraus.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Leistungsmerkmale

13.1.1 Analytische Spezifität

Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund von verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst mit hohen Konzentrationen (Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht. Wurde in diesem Interferenz-Screen bei einer untersuchten Substanz eine mögliche Interferenz festgestellt, wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration der betreffenden Substanz und der Interferenz hergestellt.

Für die in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt

Tab. 9: Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Medunasal Heparin 500 I.U. Ampullen (Heparin)	15 U/ml
Cholesterin	3 mg/ml
Bilirubin	0,1 mg/ml
Hämoglobin	0,2 mg/ml
K ₂ EDTA	1,8 mg/ml

13.1.2 Präzision

Die Präzision des Factor V Kits wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem LightCycler® 480 II unter identischen Bedingungen.

Inter-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in 20 Läufen in Duplikaten an 10 Arbeitstagen (2 Läufe pro Tag) von zwei unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Die Testungen zur *Intra*- und *Inter*-Assay Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die Präzisionsdaten wurden mit fünf Kontrollproben, sowie dem Assay zugehörigen Kontrollen ermittelt.

Der höchste erhaltene Variationskoeffizient der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE Factor V Kit auf dem LightCycler® 480 II lag bei 1,37 %.

Tab. 10: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Factor V Kits für 1691G.

Ct- Mittelwert / VK		Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	27,9	28,3	28,3	28,3	28,2	28,4	28,3
	VK (%)	0,45 %	0,37 %	0,36 %	0,95 %	1,05 %	1,04 %	1,03 %
2	Ct	23,3	23,6	23,6	23,5	23,4	23,6	23,5
	VK (%)	0,38 %	0,28 %	0,19 %	1,07 %	1,37 %	1,25 %	1,24 %
3	Ct	22,0	22,3	22,3	22,3	22,3	22,4	22,3
	VK (%)	0,49 %	0,37 %	0,43 %	1,08 %	1,13 %	1,18 %	1,14 %
4	Ct	20,8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,1	21,1
	VK (%)	0,43 %	0,44 %	0,51 %	1,19 %	1,26 %	1,31 %	1,27 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tab. 11: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Factor V Kits für 1691A.

Ct- Mittelwert / VK		Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	24,2	24,2	24,2	24,2	24,5	24,6	24,4
	VK (%)	0,53 %	0,65 %	0,73 %	1,01 %	0,86 %	0,73 %	1,21 %
3	Ct	23,1	23,1	23,2	23,0	23,4	23,5	23,3
	VK (%)	0,67 %	0,58 %	0,75 %	0,76 %	0,98 %	1,02 %	1,35 %
4	Ct	21,8	21,8	21,8	21,7	22,0	22,1	21,9
	VK (%)	0,73 %	0,63 %	0,65 %	0,76 %	0,77 %	0,88 %	1,21 %
5	Ct	28,8	28,9	28,8	28,7	29,1	29,1	29,0
	VK (%)	0,39 %	0,72 %	0,41 %	0,56 %	0,77 %	0,92 %	1,04 %

14. Versionsübersicht

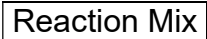
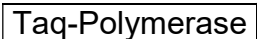
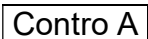
Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-03-08	Freigabeversion

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Taq-Polymerase
	Kontrolle A
	Kontrolle B

16. Literatur

1. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(12):1489-98.
2. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. Genet Med. 2011;13(1):1-16.
3. Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Nakaji P, Feigl GC, Gharabaghi A, Samii M, et al. Thrombophilia Due to Factor V and Factor II Mutations and Formation of a Dural Arteriovenous Fistula: Case Report and Review of a Rare Entity. Skull Base. 2008;18(2):135-43.
4. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005

RIDA®GENE Factor V

REF

 PY1210

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. The RIDA®GENE Factor V kit uses real-time PCR to qualitatively detect a point mutation of G to A at position 1691 in the human factor V gene (Factor V Leiden mutation) in genomic DNA that was isolated from human EDTA whole blood samples.

The RIDA®GENE Factor V kit is intended to support the diagnosis in the assessment of patients with suspected thrombophilia.

2. Summary and explanation of the test

Thromboses are a major medical problem that increases with age. Roughly 1 in 100,000 people under 40 years develop venous thrombosis. This probability increases in people over 75 years to 1 in 100 people per year⁽¹⁾. Factor V Leiden is considered the most common genetic factor that is described in combination with the development of venous thromboembolism⁽²⁾. In this case, it is a point mutation in the factor V gene at position 1691 that leads to a base exchange from G to A. As a result, the binding site for activated protein C with anticoagulant effect is no longer available (APC resistance), and factor V is broken down less compared with the wild type, which results in a hypercoagulable state⁽³⁾. Factor V Leiden is widely distributed with high prevalence in Europa and with practically no cases in Asia or Africa⁽²⁾. The probability of developing venous thrombosis is 3 to 8 times higher with a genetic mutation in the factor V gene if this mutation is heterozygous. For a homozygous mutation at position 1691, the probability increases 10 to 80 times. In addition, the chance of developing venous thrombosis at a young age also increases in this case⁽²⁾. If other factors, such as a mutation in the factor II gene (G20210A), are present with this mutation, the risk of recurrent thromboses increases as well⁽¹⁾.

3. Test principle

The RIDA®GENE Factor V kit uses real-time PCR to qualitatively detect a point mutation/single nucleotide polymorphism (SNP) of G to A at position 1691 in the human factor V gene (Factor V Leiden mutation) in genomic DNA that was isolated from human EDTA whole blood samples.

After DNA isolation, the specific gene fragment (wild type or mutation) is amplified. The amplified target sequences are detected using hydrolysis probes that are labeled with a quencher at one end and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, **Taq-Polymerase** separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescent signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescent signal increases with the quantity of formed amplicons.

4. Reagents provided

The reagents in the kit are sufficient for 100 determinations.

Table 1: Reagents provided

Kit code	Reagent	Amount		Lid color
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	yellow, ready for use
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	red, ready for use
A	Control A	1 ×	200 µL	blue, ready for use
B	Control B	1 ×	200 µL	green, ready for use

5. Storage instructions

- Please follow the handling guidelines in Table 2 and store the kit directly after use according to the information specified.
- All reagents must be stored away from light at -20 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 °C - 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 20 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents appropriately during PCR preparation (2 °C - 8 °C).

Table 2: Storage conditions and information

	Storage temperature	Maximum storage time
unopened	-20 °C	Can be used until the printed expiration date
opened	-20 °C	20 freeze-thaw cycles

6. Reagents required but not provided

6.1 Laboratory equipment

The following equipment is needed for using the RIDA®GENE Factor V kit:

Equipment
Extraction platform: Maxwell® RSC (Promega)
Real-time PCR instruments: • LightCycler® 480 II (Roche) • Cobas z 480 Analyzer (Roche) • Mx3005P (Agilent Technologies) • ABI 7500 (Applied Biosystems) • CFX96™ (Bio-Rad)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) when using LightCycler® 480 II and cobas z 480 Analyzer
Real-time PCR consumables (plates (low profile, white wells, clear frame), reaction vials, films)
Centrifuge with rotor for plates
Vortexer
Pipettes (0.5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pipette tips with filters
Powder-free disposable gloves

For questions on the use of equipment for automated processing, please contact R-Biopharm AG at pcr@r-biopharm.de.

7. Warnings and precautions for the users

For *in vitro* diagnostic use only.

This test must be carried out only by qualified laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be followed.

Always adhere strictly to the operating manual when carrying out this test.

Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.

Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test.

Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.

Separate rooms, special clothing, and instruments for extraction, PCR preparation, and PCR must be used to prevent cross-contamination and false-positive results.

Avoid contaminating the samples and components of the kit with microbes and nucleases (DNase/RNase).

Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.

Do not exchange or mix the components (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Control A, Control B) of one kit lot with the components of another lot.

Do not use the kit after the expiration date. Users are responsible for the proper disposal of all reagents and materials after use. For disposal, please adhere to national regulations.

Further details on the Safety Data Sheet (SDS) can be found under the item number at <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

For users in the European Union: Report all serious adverse events associated with the product to R-Biopharm AG and the appropriate national authorities.

8. Collection and storage of samples

8.1 Sample storage

This test was developed for the examination of human EDTA whole blood samples.

Store the samples at room temperature for up to 24 hours and at 2 °C - 8 °C for up to 72 hours until DNA extraction⁽⁴⁾. Microbial contamination of the samples must be avoided. The use of heat-inactivated, lipemic, hemolytic, icteric, or cloudy samples can lead to false results.

8.2 Preparation of samples

8.2.1 DNA isolation from EDTA whole blood

A commercially available DNA isolation kit or DNA extraction system (e.g., Maxwell[®] RSC Instrument (Promega)) is recommended for the isolation of DNA from EDTA whole blood. The manufacturer's instructions must be observed.

When using the Maxwell[®] RSC Instrument (Promega), it is recommended to mix the blood samples for at least 5 minutes at room temperature. Add 30 µL proteinase K to a 2-mL reaction vial for sample preparation. Add 200 µL from the blood sample and 300 µL from the lysis buffer. Vortex the solution for 10 seconds and incubate at 56 °C for 20 minutes. Use 100 µL of the elution buffer for the extraction. The manufacturer's further instructions must be observed.

9. Test procedure

9.1 Preparation of the Master Mix

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. Control A and Control B must be run during every test run.

Adding an additional 10 % volume to the Master Mix is recommended in order to compensate for the pipetting loss (see Table 3). Before use, thaw the **Reaction Mix**, **Taq-Polymerase**, **Control A**, and **Control B**, vortex (except for Taq-Polymerase), and centrifuge for a short time. Reagents must always be cooled appropriately during the work steps (2 °C - 8 °C).

Table 3: Example for the calculation and production of the Master Mix for 10 reactions

Kit code	Components of the Master Mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µL	212.3 µL
2	Taq-Polymerase	0.7 µL	7.7 µL
	Total	20 µL	220 µL

Mix the Master Mix and then centrifuge for short time.

9.2 Preparation of the PCR mix

Pipette 20 µL of the Master Mix into each reaction vial (plates).

Samples: Add 5 µL eluate to each pre-pipetted Master Mix.

Controls: Add 5 µL of Control A to each pre-pipetted Master Mix.

Add 5 µL of Control B to each pre-pipetted Master Mix.

Seal the plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer to the real-time PCR instrument. Start PCR according to PCR instrument set-up (Table 4, Table 5).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 Universal real-time PCR profile

To harmonize the RIDA®GENE assays, the RIDA®GENE Factor V kit was verified in the universal profile. This makes it possible to combine DNA and RNA assays with each other. Reverse transcription therefore comes first in the universal profile.

Table 4: Universal real-time PCR profile for LightCycler® 480 II and cobas z 480 Analyzer

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/extension	15 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

Note: Annealing and extension take place in the same step.

Table 5: Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500, and CFX96™

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/extension	30 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

Note: Annealing and extension take place in the same step.

9.4 Detection channel setting

Table 6: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Comment
Roche LightCycler® 480 II	Factor V WT	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.
	Mutation	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Factor V WT	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.
	Mutation	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Factor V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Factor V WT	FAM	Set the ROX passive reference dye to none.
	Mutation	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Factor V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	

10. Quality control - indication of instability or expiration of reagents

Samples are evaluated using the analysis software of the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. **Control A** and **Control B** must show the correct results (see Table 7).

Table 7: A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	FAM	VIC	Target gene Ct
Control A	+	-	See Certificate of Analysis
Control B	-	+	See Certificate of Analysis

* + = positive
- = negative

If the two controls, **Control A** and **Control B**, do not comply with the specifications, repeat the entire PCR run. If the specified values are not met, check the following items before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the equipment being used
- Correct test procedure

If the conditions are still not fulfilled after repeating the test, please consult the manufacturer or your local R-Biopharm distributor.

11. Result interpretation

The sample results are interpreted according to Table 8.

Table 8: Result interpretation*

Detection of		
<i>Factor V WT</i>	<i>Mutants</i>	Result
+	-	Factor V wild type (homozygous) detectable
-	+	Factor V mutation in position 1691 (homozygous) detectable
-	-	Target sequence not detectable, invalid
+	+	Heterozygous phenotype

* + = positive
- = negative

The PCR run cannot be evaluated if the controls in the detection system do not show amplifications or none of the target channels show a positive result. The whole PCR run must be repeated.

The PCR run cannot be evaluated if the sample shows no amplification in the detection system. In this case, either the DNA was not added or unsuitable template DNA (quality, PCR inhibitors) was used. The extracted sample should be re-amplified or the isolation and purification of the sample should be improved.

12. Limitations of the method

1. The RIDA®GENE Factor V kit detects position 1691 and any single nucleotide polymorphism (SNP) in the human factor V gene (Factor V Leiden mutation) from human EDTA whole blood samples. A connection between the level of the determined Ct value and the occurrence of severe clinical symptoms cannot be derived from this. The results obtained must always be interpreted in combination with the complete clinical symptoms.
2. The diagnosis should not be based on the result of the molecular biological analysis alone, but should always take the patient's medical history and symptoms into account.
3. This test is only valid for EDTA whole blood samples.
4. Improper specimen extraction, transport, storage, and handling can produce false-negative results.
5. The presence of PCR inhibitors can lead to false-negative or invalid results.
6. This assay should be performed in compliance with the regulation on good laboratory practice (GLP). Users must follow exactly the manufacturer's instructions when performing the test.
7. The German Genetic Diagnostics Act (GenDG) requires a thorough explanation and written consent of the patients for all genetic analyses in accordance with the GenDG.

13. Performance characteristics

13.1 Analytical performance characteristics

13.1.1 Analytical specificity

Interfering substances

The presence of PCR inhibitors and interfering substances can lead to invalid results. Therefore, the effects of various substances that could be present in the corresponding samples due to their widespread occurrence were investigated. Substances that could potentially significantly influence the test results were examined initially at high concentrations (simulation of the worst case) in an interference screen. If a potential interference was found in this interference screen for an examined substance, a dose-effect relationship was established between the concentration of the substance in question and the interference. No interferences were found for the substances listed in Table 9.

Table 9: Potentially interfering substances

Potentially interfering substance	Concentration
Medunasal Heparin 500 IU vials (Heparin)	15 U/mL
Cholesterol	3 mg/mL
Bilirubin	0.1 mg/mL
Hemoglobin	0.2 mg/mL
K ₂ EDTA	1.8 mg/mL

13.1.2 Precision

The precision of the Factor V kit was determined for the following levels of consideration.

Intra-assay precision: Determination of 5 control samples using 20 replicates each on LightCycler® 480 II under identical conditions.

Inter-assay precision: Determination of 5 control samples in 20 runs in duplicate on 10 work days (2 runs per day) performed by two different technicians under reproducible conditions.

Testing for *intra*- and *inter*-assay precision was carried out using three different lots.

The precision data were obtained using five control samples, as well as the controls belonging to the assay.

The maximum obtained coefficient of variation of the measurements with the RIDA®GENE Factor V kit on LightCycler® 480 II was 1.37 %.

Table 10: Results of the precision of the RIDA®GENE Factor V kit for 1691G.

Ct mean value/CV		Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1-3
1	Ct	27.9	28.3	28.3	28.3	28.2	28.4	28.3
	CV (%)	0.45 %	0.37 %	0.36 %	0.95 %	1.05 %	1.04 %	1.03 %
2	Ct	23.3	23.6	23.6	23.5	23.4	23.6	23.5
	CV (%)	0.38 %	0.28 %	0.19 %	1.07 %	1.37 %	1.25 %	1.24 %
3	Ct	22.0	22.3	22.3	22.3	22.3	22.4	22.3
	CV (%)	0.49 %	0.37 %	0.43 %	1.08 %	1.13 %	1.18 %	1.14 %
4	Ct	20.8	21.0	21.0	21.0	21.0	21.1	21.1
	CV (%)	0.43 %	0.44 %	0.51 %	1.19 %	1.26 %	1.31 %	1.27 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Table 11: Results of the precision of the RIDA®GENE Factor V kit for 1691A.

Ct mean value/CV		Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	24.2	24.2	24.2	24.2	24.5	24.6	24.4
	CV (%)	0.53 %	0.65 %	0.73 %	1.01 %	0.86 %	0.73 %	1.21 %
3	Ct	23.1	23.1	23.2	23.0	23.4	23.5	23.3
	CV (%)	0.67 %	0.58 %	0.75 %	0.76 %	0.98 %	1.02 %	1.35 %
4	Ct	21.8	21.8	21.8	21.7	22.0	22.1	21.9
	CV (%)	0.73 %	0.63 %	0.65 %	0.76 %	0.77 %	0.88 %	1.21 %
5	Ct	28.8	28.9	28.8	28.7	29.1	29.1	29.0
	CV (%)	0.39 %	0.72 %	0.41 %	0.56 %	0.77 %	0.92 %	1.04 %

14. Version history

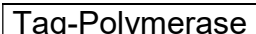
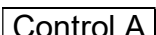
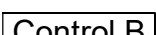
Version number	Section and designation
2022-03-08	Release version

15. Explanation of symbols

General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Observe operating manual
	Batch number
	Use before
	Storage temperature
	Item number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Test-specific symbols

	Reaction Mix
	Taq Polymerase
	Control A
	Control B

16. References

1. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(12):1489-98.
2. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. Genet Med. 2011;13(1):1-16.
3. Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Nakaji P, Feigl GC, Gharabaghi A, Samii M, et al. Thrombophilia Due to Factor V and Factor II Mutations and Formation of a Dural Arteriovenous Fistula: Case Report and Review of a Rare Entity. Skull Base. 2008;18(2):135-43.
4. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005

RIDA®GENE Factor V

REF PY1210

1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. El kit RIDA®GENE Factor V utiliza la PCR en tiempo real para detectar cualitativamente una mutación puntual de G a A en la posición 1691 en el gen del factor V humano (mutación del factor V de Leiden) en el ADN genómico que fue aislado de muestras de sangre entera humana con EDTA.

El kit RIDA®GENE Factor V está destinado a apoyar el diagnóstico en la evaluación de pacientes con sospecha de trombofilia.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las trombosis son un problema médico importante que aumenta con la edad. Aproximadamente 1 de cada 100 000 personas menores de 40 años desarrolla una trombosis venosa. Esta probabilidad aumenta en las personas mayores de 75 años hasta 1 de cada 100 personas por año⁽¹⁾. El factor V de Leiden se considera el factor genético más común que se describe en combinación con el desarrollo de tromboembolismo venoso⁽²⁾. En este caso, se trata de una mutación puntual en el gen del factor V en la posición 1691 que conduce a un intercambio de bases de G a A. Como resultado, el sitio de unión para la proteína C activada con efecto anticoagulante ya no está disponible (resistencia a la APC), y el factor V se descompone menos en comparación con el tipo natural, lo que da lugar a un estado hipercoagulable⁽³⁾. El factor V de Leiden está ampliamente distribuido, con una alta prevalencia en Europa y con prácticamente ningún caso en Asia o África⁽²⁾. La probabilidad de desarrollar una trombosis venosa es de 3 a 8 veces mayor con una mutación genética en el gen del factor V si esta mutación es heterocigota. En el caso de una mutación homocigótica en la posición 1691, la probabilidad aumenta de 10 a 80 veces. Además, en este caso también aumenta la posibilidad de desarrollar una trombosis venosa a una edad temprana⁽²⁾. Si junto a esta mutación se dan otros factores, como una mutación en el gen del factor II (G20210A), también aumenta el riesgo de trombosis recurrente⁽¹⁾.

3. Principio del ensayo

El kit RIDA®GENE Factor V utiliza la PCR en tiempo real para detectar cualitativamente una mutación puntual/polimorfismo de un nucleótido único (SNP) de G a A en la posición 1691 en el gen del factor V humano (mutación del factor V de Leiden) en el ADN genómico que fue aislado de muestras de sangre entera humana con EDTA.

Tras el aislamiento del ADN, se amplifica el fragmento génico específico (tipo natural o mutación).

Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq Polymerase** separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones.

Tabla 1: Reactivos suministrados

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	amarillo, listo para usar
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	rojo, listo para usar
A	Control A	1 ×	200 µL	azul, listo para usar
B	Control B	1 ×	200 µL	verde, listo para usar

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a -20 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 °C - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 °C - 8 °C).

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de almacenamiento	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-20 °C	Puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa
abierto	-20 °C	20 ciclos de congelación y descongelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para utilizar el kit RIDA®GENE Factor V:

Equipo
Plataforma de extracción: Maxwell® RSC (Promega)
Equipos de PCR en tiempo real: • LightCycler® 480 II (Roche) • Cobas z 480 Analyzer (Roche) • Mx3005P (Agilent Technologies) • ABI 7500 (Applied Biosystems) • CFX96™ (Bio-Rad)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) para uso con LightCycler® 480 II y cobas z 480 Analyzer
Consumibles para PCR en tiempo real (placas [perfil bajo, pocillos blancos, marco transparente], viales de reacción, cubiertas de plástico)
Centrífuga con rotor para placas
Mezclador vórtex
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Puntas de pipeta con filtros
Guantes desechables sin talco

Si tiene preguntas sobre el uso de equipos para el procesamiento automatizado, póngase en contacto con R-Biopharm AG en pcr@r-biopharm.de.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el uso diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al llevar a cabo esta prueba.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Deben utilizarse salas diferentes, ropa especial y equipos para la extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha para evitar la contaminación cruzada y los resultados falsos positivos.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni mezcle los componentes (Reaction Mix, Taq Polymerase, Control A, Control B) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

No utilice el kit después de la fecha de caducidad. Los usuarios serán los responsables de desechar de forma correcta todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Encontrará más detalles sobre la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) con el número de artículo en <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Almacenamiento de la muestra

Este ensayo fue desarrollado para el análisis de muestras de sangre entera humana con EDTA. Las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente hasta por 24 horas y a 2 °C - 8 °C hasta por 72 horas, hasta que el ADN se haya extraído⁽⁴⁾.

Debe evitarse la contaminación microbiológica de las muestras. El uso de muestras turbias, ictéricas, hemolíticas, lipémicas o termoinactivadas puede dar lugar a resultados falsos.

8.2 Preparación de las muestras

8.2.1 Aislamiento de ADN a partir de sangre entera con EDTA

Para aislar el ADN de la sangre entera con EDTA se recomienda un kit de aislamiento de ADN o sistema de extracción de ADN disponible en el mercado (como el equipo Maxwell® RSC [Promega]). Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Cuando se use el equipo Maxwell® RCS (Promega), se recomienda mezclar las muestras de sangre durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente. Añada 30 µL de proteinasa K a un vial de reacción de 2 mL para la preparación de la muestra. Añada 200 µL de la muestra de sangre y 300 µL del búfer de lisis. Agite la solución en el mezclador vórtex durante 10 segundos e incube a 56 °C durante 20 minutos. Use 100 µL del búfer de elución para la extracción. Deben seguirse las instrucciones adicionales del fabricante.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. El control A y el control B deben ejecutarse durante cada prueba.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte la tabla 3). Antes de su uso, descongele la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Control A** y el **Control B**, agite en un mezclador vórtex (excepto la Taq-Polymerase) y centrifugue durante un breve tiempo. Los reactivos deben estar siempre debidamente refrigerados durante la etapa de trabajo (2 °C - 8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para 10 reacciones

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Taq-Polymerase	0,7 µL	7,7 µL
	Total	20 µL	220 µL

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µL de mezcla maestra en cada vial de reacción (placas).

Muestras: Añada 5 µL de eluato a cada mezcla maestra prepipeteada.

Controles: Añada 5 µL del Control A a cada mezcla maestra prepipeteada.

Añada 5 µL del Control B a cada mezcla maestra prepipeteada.

Tape las placas, centrifugue brevemente a baja velocidad y colóquelas en el equipo de PCR en tiempo real. Comience el ensayo de PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (tablas 4 y 5).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®GENE, el kit RIDA®GENE Factor V se verificó en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí. Por lo tanto, la transcripción inversa es lo primero en el perfil universal.

Tabla 4: Perfil universal por PCR en tiempo real para LightCycler® 480 II y cobas z 480 Analyzer

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

Tabla 5: Perfil universal de PCR en tiempo real para Mx3005P, ABI 7500 y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 6: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
Roche LightCycler® 480 II	Factor V WT	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutación	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Factor V WT	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutación	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Factor V WT	FAM	-
	Mutación	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Factor V WT	FAM	Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en "none" (ninguno).
	Mutación	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Factor V WT	FAM	-
	Mutación	HEX	

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan con el software de análisis del equipo de PCR en tiempo real, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El **Control A** y el **Control B** deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 7).

Tabla 7: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	FAM	VIC	Ct de genes diana
Control A	+	-	Ver el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA)
Control B	-	+	Ver el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA)

* + = positivo
- = negativo

Si los dos controles, **Control A** y **Control B**, no cumplen con las especificaciones, repita toda la corrida de PCR. Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Ejecución de la prueba correcta

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Interpretación de los resultados

Los resultados de la muestra se interpretan según la tabla 8.

Tabla 8: Interpretación de los resultados*

Detección de		
<i>Factor V WT</i>	<i>Mutantes</i>	Resultado
+	-	Factor V tipo natural (homocigoto) detectable
-	+	Mutación del factor V en la posición 1691 (homocigoto) detectable
-	-	Secuencia objetivo no detectable, no válida
+	+	Fenotipo heterocigoto

* + = positivo
- = negativo

La corrida de PCR no puede evaluarse si los controles del sistema de detección no muestran amplificaciones o ninguno de los canales objetivo muestra un resultado positivo. Debe repetirse la corrida de PCR entera.

La corrida de PCR no puede evaluarse si la muestra no presenta amplificación en el sistema de detección. En este caso, o bien no se añadió el ADN o se utilizó una plantilla de ADN inadecuada (calidad, inhibidores de la PCR). La muestra extraída debe amplificarse de nuevo o se deben mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El kit RIDA®GENE Factor V detecta la posición 1691 y cualquier polimorfismo de un nucleótido único (SNP) en el gen del factor V humano (mutación del factor V de Leiden) a partir de muestras de sangre entera humana con EDTA. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Este ensayo es válido solo para muestras de sangre entera con EDTA.
4. La extracción, transporte, almacenamiento y manejo inapropiados de la muestra pueden producir resultados falso negativos.
5. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
6. Este ensayo debe realizarse de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir exactamente las instrucciones del fabricante al realizar el ensayo.
7. La Ley alemana en materia de diagnóstico genético (GenDG) exige una explicación exhaustiva y un consentimiento por escrito de los pacientes para todos los análisis genéticos, de conformidad con la GenDG.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento analíticas

13.1.1 Especificidad analítica

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de la PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados no válidos. Por lo tanto, se investigaron los efectos de diversas sustancias que podrían estar presentes en las muestras correspondientes debido a su amplia presencia.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados de las pruebas se examinaron inicialmente a altas concentraciones (simulación del peor caso) en un cribado de interferencia. Si se encontraba una interferencia potencial en este cribado de interferencia para una sustancia examinada, se establecía una relación dosis-efecto entre la concentración de la sustancia en cuestión y la interferencia.

No se identificaron interferencias para las sustancias enumeradas en la tabla 9.

Tabla 9: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Viales de Medunasal Heparin 500 IU (Heparina)	15 U/mL
Colesterol	3 mg/mL
Bilirrubina	0,1 mg/mL
Hemoglobina	0,2 mg/mL
K ₂ EDTA	1,8 mg/mL

13.1.2 Precisión

La precisión del kit del Factor V se determinó para los siguientes niveles de consideración.

Precisión intraensayo: determinación de 5 muestras de control con 20 réplicas cada una en el LightCycler® 480 II en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de 5 muestras de control en 20 ensayos por duplicado en 10 días de trabajo (2 corridas por día) realizadas por dos técnicos diferentes en condiciones reproducibles.

Las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los datos de precisión se obtuvieron utilizando cinco muestras de control, así como los controles pertenecientes al ensayo.

El máximo coeficiente de variación obtenido de las mediciones con el kit RIDA®GENE Factor V en el LightCycler® 480 II fue del 1,37 %.

Tabla 10: Resultados de la precisión del kit RIDA®GENE Factor V para 1691G.

Valor medio de Ct/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	27,9	28,3	28,3	28,3	28,2	28,4	28,3
	CV (%)	0,45 %	0,37 %	0,36 %	0,95 %	1,05 %	1,04 %	1,03 %
2	Ct	23,3	23,6	23,6	23,5	23,4	23,6	23,5
	CV (%)	0,38 %	0,28 %	0,19 %	1,07 %	1,37 %	1,25 %	1,24 %
3	Ct	22,0	22,3	22,3	22,3	22,3	22,4	22,3
	CV (%)	0,49 %	0,37 %	0,43 %	1,08 %	1,13 %	1,18 %	1,14 %
4	Ct	20,8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,1	21,1
	CV (%)	0,43 %	0,44 %	0,51 %	1,19 %	1,26 %	1,31 %	1,27 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

Tabla 11: Resultados de la precisión del kit RIDA®GENE Factor V para 1691A.

Valor medio de Ct/CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	24,2	24,2	24,2	24,2	24,5	24,6	24,4
	CV (%)	0,53 %	0,65 %	0,73 %	1,01 %	0,86 %	0,73 %	1,21 %
3	Ct	23,1	23,1	23,2	23,0	23,4	23,5	23,3
	CV (%)	0,67 %	0,58 %	0,75 %	0,76 %	0,98 %	1,02 %	1,35 %
4	Ct	21,8	21,8	21,8	21,7	22,0	22,1	21,9
	CV (%)	0,73 %	0,63 %	0,65 %	0,76 %	0,77 %	0,88 %	1,21 %
5	Ct	28,8	28,9	28,8	28,7	29,1	29,1	29,0
	CV (%)	0,39 %	0,72 %	0,41 %	0,56 %	0,77 %	0,92 %	1,04 %

14. Historial de versiones

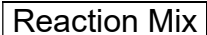
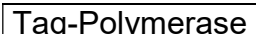
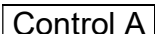
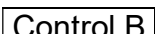
Número de versión	Sección y designación
2022-03-08	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Observe el manual de funcionamiento
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Mezcla de reacción
	Taq Polymerase
	Control A
	Control B

16. Bibliografía

1. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(12):1489-98.
2. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. Genet Med. 2011;13(1):1-16.
3. Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Nakaji P, Feigl GC, Gharabaghi A, Samii M, et al. Thrombophilia Due to Factor V and Factor II Mutations and Formation of a Dural Arteriovenous Fistula: Case Report and Review of a Rare Entity. Skull Base. 2008;18(2):135-43.
4. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005

RIDA®GENE Factor V

REF PY1210

1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le kit RIDA®GENE Factor V utilise la PCR en temps réel pour détecter qualitativement une mutation ponctuelle de G à A en position 1691 dans le gène du facteur V humain (mutation du facteur V Leiden) dans l'ADN génomique qui a été isolé à partir d'échantillons de sang total EDTA humain.

Le kit RIDA®GENE Factor V est destiné à soutenir le diagnostic dans l'évaluation des patients suspectés de thrombophilie.

2. Résumé et explication du test

Les thromboses sont un problème médical majeur qui augmente avec l'âge. Environ 1 personne de moins de 40 ans sur 100 000 développe une thrombose veineuse. Cette probabilité augmente chez les personnes de plus de 75 ans pour atteindre 1 personne sur 100 par an⁽¹⁾. Le facteur V Leiden est considéré comme le facteur génétique le plus fréquent associé au développement de la maladie thromboembolique veineuse⁽²⁾. Dans ce cas, il s'agit d'une mutation ponctuelle dans le gène du facteur V en position 1691 qui entraîne un échange de bases de G à A. En conséquence, le site de liaison de la protéine C activée ayant un effet anticoagulant n'est plus disponible (résistance à l'APC), et le facteur V est moins dégradé par rapport au type sauvage, ce qui entraîne un état d'hypercoagulabilité⁽³⁾. Le facteur V Leiden est largement répandu, avec une forte prévalence en Europe et pratiquement aucun cas en Asie ou en Afrique⁽²⁾. La probabilité de développer une thrombose veineuse est 3 à 8 fois plus élevée avec une mutation génétique du gène du facteur V si cette mutation est hétérozygote. Pour une mutation homozygote en position 1691, la probabilité augmente de 10 à 80 fois. En outre, le risque de développer une thrombose veineuse à un jeune âge augmente également dans ce cas⁽²⁾. Si d'autres facteurs, comme une mutation du gène du facteur II (G20210A), sont présents avec cette mutation, le risque de thromboses récurrentes augmente également⁽¹⁾.

3. Principe du test

Le kit RIDA®GENE Factor V utilise la PCR en temps réel pour détecter qualitativement une mutation ponctuelle/polymorphisme nucléotidique simple (SNP) de G à A à la position 1691 dans le gène du facteur V humain (mutation du facteur V Leiden) dans l'ADN génomique qui a été isolé à partir d'échantillons de sang total EDTA humain.

Après isolement de l'ADN, le fragment de gène spécifique (type sauvage ou mutation) est amplifié.

Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-Polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés.

4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans le kit permettent de faire 100 déterminations.

Tableau 1 : Contenu du paquet

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du bouchon
1	Reaction Mix	2 ×	1 050 µL	jaune, prêt à l'emploi
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	rouge, prêt à l'emploi
A	Control A	1 ×	200 µL	bleu, prêt à l'emploi
B	Control B	1 ×	200 µL	vert, prêt à l'emploi

5. Instructions de conservation des réactifs

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 20 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 °C à 8 °C).

Tableau 2 : Informations et conditions de conservation

	Température de conservation	Durée maximale de conservation
non ouvert	-20 °C	Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette
ouvert	-20 °C	20 cycles de congélation-décongélation

6. Réactifs requis, mais non fournis

6.1 Matériel de laboratoire

L'équipement suivant est nécessaire pour utiliser le kit RIDA®GENE Factor V :

Matériel
Plateforme d'extraction : Maxwell® RSC (Promega)
Instruments de PCR en temps réel : • LightCycler® 480 II (Roche) • Cobas z 480 Analyzer (Roche) • Mx3005P (Agilent Technologies) • ABI 7500 (Applied Biosystems) • CFX96™ (Bio-Rad)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) pour une utilisation avec LightCycler® 480II et cobas z 480 Analyzer
Consommables de PCR en temps réel (plaques [profil bas, puits blancs, support transparent], flacons de réaction, films)
Centrifugeuse avec rotor pour plaques
Agitateur-mélangeur vortex
Pipettes (0,5-20 µL, 20-200 µL, 100-1 000 µL)
Pointes de pipettes dotées de filtres
Gants jetables non poudrés

Pour toute question concernant l'utilisation d'équipements pour le traitement automatisé, veuillez contacter R-Biopharm AG à l'adresse pcr@r-biopharm.de.

7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce test doit être réalisé uniquement par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.

Toujours respecter strictement le manuel d'utilisation lors de la réalisation du test.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec des plaies et des membranes muqueuses.

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.

Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons.

Des pièces séparées, des vêtements spéciaux et des instruments pour l'extraction, la préparation de la PCR et la PCR doivent être utilisés pour éviter la contamination croisée et les résultats faux positifs.

Éviter de contaminer les échantillons et les composants du kit avec des microbes et des nucléases (DNase/RNase).

Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.

Ne pas échanger ou mélanger les composants (Reaction Mix, Taq Polymerase, Control A, Control B) d'un lot d'un kit avec les composants d'un autre lot.

Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption. Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de l'élimination correcte de tous les réactifs et matériaux. Pour l'élimination, respecter les règlements nationaux.

De plus amples informations sur la Safety Data Sheet (SDS) sont disponibles sous le numéro d'article à l'adresse suivante <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Pour les utilisateurs de l'Union européenne : signaler tout événement indésirable grave associé au produit à R-Biopharm AG et aux autorités nationales compétentes.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Conservation des échantillons

Ce test a été développé dans le but d'examiner des échantillons de sang total humain EDTA. Conserver les échantillons à température ambiante pendant 24 heures maximum et à 2 °C - 8 °C pendant 72 heures maximum jusqu'à l'extraction de l'ADN⁽⁴⁾. La contamination microbienne des échantillons doit être évitée. L'utilisation d'échantillons inactivés par la chaleur, lipémiques, hémolytiques, ictériques ou troubles risque de donner lieu à des résultats erronés.

8.2 Préparation des échantillons

8.2.1 Isolation de l'ADN à partir du sang total EDTA

Pour l'isolation de l'ADN du sang total EDTA, il est recommandé d'utiliser un kit d'isolation d'ADN ou un système d'extraction d'ADN du commerce (p. ex., Maxwell® RSC Instrument [Promega]). Il convient de respecter les instructions du fabricant. Lors de l'utilisation de Maxwell® RSC Instrument (Promega), il est recommandé de mélanger les échantillons de sang pendant au moins 5 minutes à température ambiante. Ajouter 30 µL de protéinase K dans un flacon de réaction de 2 mL pour la préparation de l'échantillon. Ajouter 200 µL de l'échantillon de sang et 300 µL de tampon de lyse. Agiter la solution au Vortex pendant 10 secondes et incubé à 56 °C pendant 20 minutes. Utiliser 100 µL de tampon d'élution pour l'extraction. Il convient de respecter les autres instructions du fabricant.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Il est nécessaire de calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Le contrôle A et le contrôle B doivent être exécutés lors de chaque analyse.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume en plus au mélange maître afin de compenser la perte au pipetage (voir le tableau 3). Avant l'utilisation, décongelez le [Reaction Mix], [Taq-Polymerase], [Control A] et [Control B], mélangez-les (sauf pour la Taq polymérase) et centrifugez-les pendant un court instant. Les réactifs doivent toujours être refroidis de manière appropriée pendant les étapes de travail (2 - 8 °C).

Tableau 3 : Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	[Reaction Mix]	19,3 µL	212,3 µL
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µL	7,7 µL
	Total	20 µL	220 µL

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µL du mélange maître dans chaque flacon de réaction (plaques).

Échantillons : Ajouter 5 µL d'éluat à chaque mélange maître pré-pipeté.

Contrôles : Ajouter 5 µL de Control A à chaque mélange maître pipeté au préalable.

Ajouter 5 µL de Control B à chaque mélange maître pipeté au préalable.

Fermer hermétiquement les plaques, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon la configuration de l'instrument de PCR (voir les tableaux 4 et 5).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de PCR en temps réel

Pour harmoniser les tests RIDA®GENE, le kit RIDA®GENE Factor V a été vérifié par rapport au profil universel. Il est ainsi possible de combiner les tests ADN et ARN entre eux. La transcription inverse arrive donc en premier dans le profil universel.

Tableau 4 : Profil universel de PCR en temps réel pour LightCycler® 480 II et cobas z 480 Analyzer

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Maximum

Remarque : L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI 7500 et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Maximum

Remarque : L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 6 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
Roche LightCycler® 480 II	Facteur V WT	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	Mutation	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Facteur V WT	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	Mutation	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Facteur V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Facteur V WT	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	Mutation	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Facteur V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	

10. Contrôle qualité - signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel, conformément aux instructions du fabricant. **Control A** et **Control B** doivent présenter des résultats corrects (voir tableau 7).

Tableau 7 : Pour être valide, une analyse de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	FAM	VIC	Ct gène cible
Control A	+	-	Voir le Certificate of Analysis (CoA)
Control B	-	+	Voir le Certificate of Analysis (CoA)

* + = positif
- = négatif

Si les deux contrôles, **Control A** et **Control B**, ne sont pas conformes aux spécifications, répétez toute la série de PCR. Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Procédure de test correcte

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir renouvelé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Interprétation des résultats

Les résultats de l'échantillon sont interprétés selon le tableau 8.

Tableau 8 : Interprétation des résultats*

Détection de		
<i>Facteur V WT</i>	<i>Mutants</i>	Résultat
+	-	Facteur V de type sauvage (homozygote) détectable
-	+	Mutation du facteur V en position 1691 (homozygote) détectable
-	-	Séquence cible non détectable, non valide
+	+	Phénotype hétérozygote

* + = positif
- = négatif

L'exécution de la PCR ne peut pas être évaluée si les contrôles du système de détection ne présentent pas d'amplifications ou si aucun des canaux cibles ne présente un résultat positif. Il faut recommencer la PCR dans son ensemble.

L'analyse de la PCR ne peut pas être évaluée si l'échantillon ne présente aucune amplification dans le système de détection. Dans ce cas, soit l'ADN n'a pas été ajouté, soit un ADN matrice inadapté (qualité, inhibiteurs de PCR) a été utilisé. Il faut renouveler l'amplification de l'échantillon extrait ou améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le kit RIDA®GENE Factor V détecte la position 1691 et tout polymorphisme nucléotidique simple (SNP) dans le gène du facteur V humain (mutation du facteur V Leiden) à partir d'échantillons de sang total EDTA humain. Ce test ne permet pas d'établir de rapport entre la valeur de Ct mesurée et la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
2. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
3. Ce test est seulement valide pour des échantillons de sang total EDTA.
4. Si l'extraction, le transport, la conservation et la manipulation sont incorrects, il est possible d'obtenir des résultats faux négatifs.
5. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
6. Ce test doit être réalisé conformément aux BPL (Bonnes pratiques de laboratoire). Les utilisateurs doivent suivre scrupuleusement les instructions du fabricant lors de la réalisation du test.
7. La loi allemande sur le diagnostic génétique (GenDG) exige une explication approfondie et un consentement écrit des patients conforme à GenDG pour toutes les analyses génétiques.

13. Performances

13.1 Performances analytiques

13.1.1 Spécificités analytiques

Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la PCR et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats non valides. Par conséquent, les effets de diverses substances qui pourraient être présentes dans les échantillons correspondants en raison de leur présence répandue ont été étudiés.

Les substances susceptibles d'influencer de manière significative les résultats des tests ont été examinées dans un premier temps à des concentrations élevées (simulation du pire cas) dans un test d'interférence. Si une interférence potentielle était trouvée lors de ce test de réactivité pour une substance examinée, une relation dose-effet était établie entre la concentration de la substance en question et l'interférence.

Aucune interférence n'a été identifiée pour les substances figurant dans le tableau 9.

Tableau 9 : Substances potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration
Medunasal Heparin 500 UI en flacons (Héparine)	15 U/mL
Cholestérol	3 mg/mL
Bilirubine	0,1 mg/mL
Hémoglobine	0,2 mg/mL
K ₂ EDTA	1,8 mg/mL

13.1.2 Précision

La précision du kit Factor V a été déterminée pour les niveaux de considération suivants.

Précision *intra*-essai : déterminée sur 5 échantillons de contrôle, à raison de 20 réplicats par échantillon, sur le LightCycler® 480 II dans des conditions identiques.

Précision *inter*-essais : déterminée sur 5 échantillons de contrôle testés en double au cours de 20 analyses réalisées sur 10 jours (2 analyses par jour) par deux opérateurs dans des conditions reproductibles.

Les tests de précision *intra*-essai et *inter*-essais ont été réalisés à l'aide de trois lots différents.

Les données relatives à la précision ont été obtenues en utilisant cinq échantillons de contrôle, ainsi que les contrôles du test.

Le coefficient de variation maximal obtenu pour chaque mesure avec le kit RIDA®GENE Factor V sur LightCycler® 480 II était de 1,37 %.

Tableau 10 : Résultats relatifs à la précision du kit RIDA®GENE Factor V pour 1691G.

Valeur Ct/CV moyenne		<i>Intra</i> -essai			<i>Inter</i> -essais			<i>Inter</i> -lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3
1	Ct	27,9	28,3	28,3	28,3	28,2	28,4	28,3
	CV (%)	0,45 %	0,37 %	0,36 %	0,95 %	1,05 %	1,04 %	1,03 %
2	Ct	23,3	23,6	23,6	23,5	23,4	23,6	23,5
	CV (%)	0,38 %	0,28 %	0,19 %	1,07 %	1,37 %	1,25 %	1,24 %
3	Ct	22,0	22,3	22,3	22,3	22,3	22,4	22,3
	CV (%)	0,49 %	0,37 %	0,43 %	1,08 %	1,13 %	1,18 %	1,14 %
4	Ct	20,8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,1	21,1
	CV (%)	0,43 %	0,44 %	0,51 %	1,19 %	1,26 %	1,31 %	1,27 %
5	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o

Tableau 11 : Résultats relatifs à la précision du kit RIDA®GENE Factor V pour 1691A.

Valeur Ct/CV moyenne		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3
1	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	24,2	24,2	24,2	24,2	24,5	24,6	24,4
	CV (%)	0,53 %	0,65 %	0,73 %	1,01 %	0,86 %	0,73 %	1,21 %
3	Ct	23,1	23,1	23,2	23,0	23,4	23,5	23,3
	CV (%)	0,67 %	0,58 %	0,75 %	0,76 %	0,98 %	1,02 %	1,35 %
4	Ct	21,8	21,8	21,8	21,7	22,0	22,1	21,9
	CV (%)	0,73 %	0,63 %	0,65 %	0,76 %	0,77 %	0,88 %	1,21 %
5	Ct	28,8	28,9	28,8	28,7	29,1	29,1	29,0
	CV (%)	0,39 %	0,72 %	0,41 %	0,56 %	0,77 %	0,92 %	1,04 %

14. Historique des versions

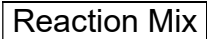
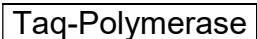
Numéro de version	Section et désignation
2022-03-08	Version de la publication

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Respecter le manuel d'utilisation
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de conservation
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques aux tests

	Mélange réactionnel
	Taq Polymerase
	Control A
	Control B

16. Références

1. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(12):1489-98.
2. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. Genet Med. 2011;13(1):1-16.
3. Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Nakaji P, Feigl GC, Gharabaghi A, Samii M, et al. Thrombophilia Due to Factor V and Factor II Mutations and Formation of a Dural Arteriovenous Fistula: Case Report and Review of a Rare Entity. Skull Base. 2008;18(2):135-43.
4. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005

RIDA®GENE Factor V

REF

PY1210

1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il kit RIDA®GENE Factor V utilizza la PCR real-time per rivelare qualitativamente la mutazione puntiforme G1691A nel gene del fattore V umano (mutazione di Leiden del fattore V) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue intero umano trattato con EDTA.

Il kit RIDA®GENE Factor V è destinato a supportare la diagnosi nella valutazione di pazienti con sospetta trombofilia.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le trombosi sono un problema medico importante che aumenta con l'età. Circa una su 100.000 persone sotto i 40 anni sviluppa una trombosi venosa. Nei soggetti di età superiore ai 75 anni questa probabilità aumenta fino a un caso ogni 100 persone all'anno⁽¹⁾. Il fattore V Leiden è considerato il fattore genetico più comunemente descritto in associazione allo sviluppo di tromboembolia venosa⁽²⁾. Si tratta di una mutazione puntiforme nel gene del fattore V in posizione 1691 che porta alla sostituzione di un singolo nucleotide (da G ad A). Di conseguenza, il sito di legame della proteina C attivata con effetto anticoagulante non è più disponibile (resistenza APC) e il taglio del fattore V risulta inferiore rispetto al gene wild type; questo si traduce in uno stato di ipercoagulabilità⁽³⁾. Il fattore V Leiden è ampiamente distribuito con alta prevalenza in Europa e quasi totalmente assente in Asia o in Africa⁽²⁾. In presenza di mutazione genetica del fattore V di tipo eterozigote, la probabilità di sviluppare una trombosi venosa è da 3 a 8 volte superiore. Se la mutazione in posizione 1691 è omozigote, la probabilità aumenta da 10 a 80 volte. Inoltre, in questo caso aumenta anche la possibilità di sviluppare una trombosi venosa in giovane età⁽²⁾. Fattori concomitanti, come una mutazione nel gene del fattore II (G20210A), aumentano anche il rischio di trombosi ricorrenti⁽¹⁾.

3. Principio del test

Il kit RIDA®GENE Factor V utilizza la PCR real-time per rivelare qualitativamente una mutazione puntiforme/polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) da G ad A in posizione 1691 nel gene del fattore V umano (mutazione di Leiden del fattore V) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue intero umano trattati con EDTA. Dopo l'isolamento del DNA, il frammento di gene specifico (gene wild type o mutato) viene amplificato.

Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target, le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-Polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale fluorescente aumenta con la quantità di ampliconi formati.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni.

Tabella 1: Contenuto della confezione

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del tappo
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	giallo, pronto per l'uso
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	rosso, pronto per l'uso
A	Control A	1 ×	200 µL	blu, pronto per l'uso
B	Control B	1 ×	200 µL	verde, pronto per l'uso

5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C, e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 °C-8 °C).
- Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento (fino a 20 volte) non influiscono sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (2 °C-8 °C).

Tabella 2: Condizioni di conservazione e informazioni

	Temperatura di conservazione	Tempo massimo di conservazione
prima dell'apertura	-20 °C	Utilizzabile fino alla data di scadenza stampata
dopo l'apertura	-20 °C	20 cicli di congelamento e scongelamento

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1 Attrezzatura di laboratorio

Per utilizzare il kit RIDA®GENE Factor V occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Piattaforma di estrazione: Maxwell® RSC (Promega)
Strumenti per la PCR real-time: • LightCycler® 480 II (Roche) • Cobas z 480 Analyzer (Roche) • Mx3005P (Agilent Technologies) • ABI 7500 (Applied Biosystems) • CFX96™ (Bio-Rad)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) per l'uso con gli analizzatori LightCycler® 480 II e cobas z 480 Analyzer
Materiali di consumo per PCR real-time (piastre [profilo basso, pozzetti bianchi, telaio trasparente], cuvette di reazione, pellicole)
Centrifuga con rotore per piastre
Agitatore a vortice
Pipette (0,5-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
Puntali per pipette con filtri
Guanti monouso senza talco

Per domande sull'uso delle attrezzature per la processazione automatizzata contattare R-Biopharm AG all'indirizzo pcr@r-biopharm.de.

7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.

Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Per prevenire la contaminazione crociata e risultati falsi positivi è necessario utilizzare locali separati e indumenti e strumenti dedicati per l'estrazione, la preparazione e l'esecuzione della PCR.

Evitare di contaminare i campioni e i componenti del kit con microbi e nucleasi (DNase/RNase).

I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

Non scambiare o mescolare i componenti (Reaction Mix, Taq Polymerase, Control A, Control B) di un lotto di un kit con i componenti di un altro lotto.

Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Gli operatori sono tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Per utenti nell'Unione europea: segnalare tutti gli eventi avversi gravi associati al prodotto a R-Biopharm AG e alle autorità nazionali competenti.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Conservazione del campione

Questo test è stato sviluppato per l'esame di campioni di sangue intero umano trattato con EDTA. Conservare i campioni a temperatura ambiente per un massimo di 24 ore e a 2 °C-8 °C per un massimo di 72 ore fino all'estrazione del DNA ⁽⁴⁾.

Evitare la contaminazione microbica dei campioni. L'uso di campioni inattivati dal calore, lipemici, emolitici, itterici o torbidi può dare risultati errati.

8.2 Preparazione dei campioni

8.2.1 Isolamento del DNA dal sangue intero trattato con EDTA

Per l'isolamento del DNA da sangue intero trattato con EDTA si raccomanda un kit di isolamento del DNA o un sistema di estrazione del DNA disponibile in commercio (ad esempio lo strumento Maxwell® RSC (Promega)). Attenersi alle istruzioni del fabbricante.

Quando si utilizza lo strumento Maxwell® RSC (Promega), si raccomanda di miscelare i campioni di sangue per almeno 5 minuti a temperatura ambiente. Aggiungere 30 µL di proteinasi K in una cuvetta di reazione da 2 mL per la preparazione del campione. Aggiungere 200 µL di campione di sangue e 300 µL di tampone di lisi. Vorticare la soluzione per 10 secondi e incubare a 56 °C per 20 minuti. Per l'estrazione utilizzare 100 µL del tampone di eluizione. Attenersi alle ulteriori istruzioni del fabbricante.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della master mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). I controlli A e B devono essere eseguiti durante ogni ciclo di test.

Si consiglia di aggiungere un ulteriore 10% di volume alla master mix per compensare eventuali perdite durante il pipettaggio (vedere Tabella 3). Prima dell'uso, scongelare la **Reaction Mix** la **Taq-Polymerase**, il **Control A** e il **Control B**, vorticare (tranne la Taq-Polymerase) e centrifugare brevemente. I reagenti devono essere sempre adeguatamente raffreddati durante le fasi di lavoro (2 °C-8 °C).

Tabella 3: Esempio per il calcolo e la produzione di master mix per 10 reazioni

Codice del kit	Componenti della master mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Taq-Polymerase	0,7 µL	7,7 µL
	Totale	20 µL	220 µL

Mescolare la master mix e quindi centrifugare per breve tempo.

9.2 Preparazione della PCR mix

Pipettare 20 µL della master mix in ogni cuvetta di reazione (piastre).

Campioni: Aggiungere 5 µL di eluato a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

Controlli: Aggiungere 5 µL di **Control A** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

Aggiungere 5 µL di **Control B** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

Chiudere le piastre, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire allo strumento di PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento (Tabella 4 e Tabella 5).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale della PCR real-time

Per armonizzare i test RIDA®GENE, il kit RIDA®GENE Factor V è stato verificato nel profilo universale. Questo consente di combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA. Pertanto la trascrizione inversa è il primo passaggio del profilo universale.

Tabella 4: Profilo universale della PCR real-time per gli analizzatori LightCycler® 480 II e cobas z 480 Analyzer

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/ velocità di rampa	Durata di conservazione

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 5: Profilo universale della PCR real-time per Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/ velocità di rampa	Durata di conservazione

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 6: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
Roche LightCycler® 480 II	Fattore V WT	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutazione	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Fattore V WT	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutazione	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Fattore V WT	FAM	-
	Mutazione	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Fattore V WT	FAM	Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su none (nessuno).
	Mutazione	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Fattore V WT	FAM	-
	Mutazione	HEX	

10. Controllo qualità – indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi dello strumento di PCR real-time in base alle istruzioni del fabbricante. Il **Control A** e il **Control B** devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 7).

Tabella 7: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	FAM	VIC	Ct gene target
Control A	+	-	Vedere il Certificate of Analysis
Control B	-	+	Vedere il Certificate of Analysis

* + = positivo
- = negativo

Se i due controlli **Control A** e **Control B** non sono conformi alle specifiche, ripetere l'intero ciclo di PCR. Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo aver ripetuto il test, rivolgersi al fabbricante o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Interpretazione del risultato

I risultati del campione sono interpretati secondo la Tabella 8.

Tabella 8: Interpretazione del risultato*

Rivelazione di		
<i>Fattore V WT</i>	<i>Mutanti</i>	Risultato
+	-	Fattore V wild type (omozigote) rivelabile
-	+	Mutazione del fattore V in posizione 1691 (omozigote) rivelabile
-	-	Sequenza target non rivelabile, non valido
+	+	Fenotipo eterozigote

* + = positivo
- = negativo

Il ciclo di PCR non può essere valutato se i controlli nel sistema di rivelazione non mostrano amplificazioni o se nessuno dei canali target mostra un risultato positivo. L'intero ciclo di PCR deve essere ripetuto.

Il ciclo di PCR non può essere valutato se il campione non mostra amplificazione nel sistema di rivelazione. In questo caso, o il DNA non è stato aggiunto o è stato usato un DNA stampo non adatto (qualità, inibitori della PCR). Il campione estratto deve essere nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il kit RIDA®GENE Factor V rivela la posizione 1691 e qualsiasi polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel gene del fattore V umano (mutazione di Leiden del fattore V) in campioni di sangue intero umano trattato con EDTA. Pertanto non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è valido solo per campioni di sangue intero trattato con EDTA.
4. Procedure inadatte di estrazione, trasporto, conservazione e manipolazione dei campioni possono produrre risultati falsi negativi.
5. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
6. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del fabbricante.
7. La legge tedesca sulla diagnostica genetica (GenDG) richiede una spiegazione dettagliata e un consenso scritto dei pazienti per tutte le analisi genetiche ai sensi della GenDG.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni e caratteristiche analitiche

13.1.1 Specificità analitica

Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della PCR e di sostanze interferenti può inficiare la validità dei risultati. Pertanto sono stati studiati gli effetti di varie sostanze che potrebbero essere presenti nei campioni in ragione della loro ampia diffusione.

Le sostanze che potrebbero influire in modo significativo sui risultati del test sono state esaminate inizialmente ad alte concentrazioni (simulazione del caso peggiore) in un'analisi di interferenza. Se dall'analisi di interferenza risultava una potenziale interferenza con una delle sostanze esaminate, è stata stabilita una relazione dose-effetto tra la concentrazione della sostanza in questione e l'interferenza.

Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 9.

Tabella 9: Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Medunasal Heparin, fiale da 500 IU (eparina)	15 U/mL
Colesterolo	3 mg/mL
Bilirubina	0,1 mg/mL
Emoglobina	0,2 mg/mL
K ₂ EDTA	1,8 mg/mL

13.1.2 Precisione

La precisione del kit Factor V è stata determinata per i seguenti livelli di considerazione.

Precisione *intra*-test: determinazione di 5 campioni di controllo utilizzando 20 replicati ciascuno su LightCycler® 480 II in condizioni identiche.

Precisione *inter*-test: determinazione di 5 campioni di controllo in 20 cicli in duplicato in 10 giorni di lavoro (2 cicli al giorno), eseguiti da due tecnici diversi in condizioni riproducibili.

i test di precisione *intra*-test e *inter*-test sono stati condotti utilizzando tre diversi lotti.

I dati di precisione sono stati ottenuti utilizzando cinque campioni di controllo, nonché i controlli del test.

Il massimo coefficiente di variazione ottenuto dalle misurazioni con il kit RIDA®GENE Factor V su LightCycler® 480 II è stato 1,37%.

Tabella 10: Risultati della precisione del kit RIDA®GENE Factor V per 1691G.

Valore medio/ CV Ct		Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	27,9	28,3	28,3	28,3	28,2	28,4	28,3
	CV (%)	0,45%	0,37%	0,36%	0,95%	1,05%	1,04%	1,03%
2	Ct	23,3	23,6	23,6	23,5	23,4	23,6	23,5
	CV (%)	0,38%	0,28%	0,19%	1,07%	1,37%	1,25%	1,24%
3	Ct	22,0	22,3	22,3	22,3	22,3	22,4	22,3
	CV (%)	0,49%	0,37%	0,43%	1,08%	1,13%	1,18%	1,14%
4	Ct	20,8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,1	21,1
	CV (%)	0,43%	0,44%	0,51%	1,19%	1,26%	1,31%	1,27%
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile

Tabella 11: Risultati della precisione del kit RIDA®GENE Factor V per 1691A.

Valore medio/ CV Ct		Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	24,2	24,2	24,2	24,2	24,5	24,6	24,4
	CV (%)	0,53%	0,65%	0,73%	1,01%	0,86%	0,73%	1,21%
3	Ct	23,1	23,1	23,2	23,0	23,4	23,5	23,3
	CV (%)	0,67%	0,58%	0,75%	0,76%	0,98%	1,02%	1,35%
4	Ct	21,8	21,8	21,8	21,7	22,0	22,1	21,9
	CV (%)	0,73%	0,63%	0,65%	0,76%	0,77%	0,88%	1,21%
5	Ct	28,8	28,9	28,8	28,7	29,1	29,1	29,0
	CV (%)	0,39%	0,72%	0,41%	0,56%	0,77%	0,92%	1,04%

14. Cronologia delle versioni

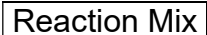
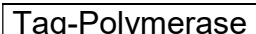
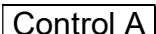
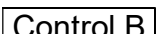
Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-03-08	Versione di rilascio

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Uso per la diagnostica in vitro
	Attenersi al manuale operativo
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

Simboli specifici del test

	Reaction Mix
	Taq Polymerase
	Control A
	Control B

16. Bibliografia

1. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(12):1489-98.
2. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. Genet Med. 2011;13(1):1-16.
3. Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Nakaji P, Feigl GC, Gharabaghi A, Samii M, et al. Thrombophilia Due to Factor V and Factor II Mutations and Formation of a Dural Arteriovenous Fistula: Case Report and Review of a Rare Entity. Skull Base. 2008;18(2):135-43.
4. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005

RIDA®GENE Factor V

REF PY1210

1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O kit RIDA®GENE Factor V usa um PCR em tempo real para detectar qualitativamente uma mutação pontual de G a A na posição 1691 no gene do fator V humano (mutação do fator V de Leiden) no DNA genômico que foi isolado de amostras de sangue total humano de EDTA.

O kit RIDA®GENE Factor V destina-se a apoiar o diagnóstico na avaliação de pacientes com suspeita de trombofilia.

2. Sumário e explicação do teste

As trombozes são um grande problema médico que aumenta com a idade. Cerca de 1 em cada 100.000 pessoas com menos de 40 anos desenvolvem trombose venosa. Esta probabilidade aumenta em pessoas com mais de 75 anos para 1 em cada 100 pessoas por ano⁽¹⁾. O fator V de Leiden é considerado o fator genético mais comum que é descrito em combinação com o desenvolvimento do tromboembolismo venoso⁽²⁾. Neste caso, é uma mutação pontual no gene do fator V na posição 1691 que leva a uma troca de base de G para A. Como resultado, o local de ligação da proteína C ativada com efeito anticoagulante não está mais disponível (resistência APC), e o fator V é menos dividido em comparação com o tipo selvagem, o que resulta em um estado hipercoagulável⁽³⁾. O fator V Leiden é amplamente distribuído com alta prevalência na Europa e praticamente sem casos na Ásia ou na África⁽²⁾. A probabilidade de desenvolver trombose venosa é 3 a 8 vezes maior com uma mutação genética no gene do fator V se essa mutação for heterozigota. Para uma mutação homozigótica na posição 1691, a probabilidade aumenta de 10 a 80 vezes. Além disso, a chance de desenvolver trombose venosa em uma idade jovem também aumenta neste caso⁽²⁾. Se outros fatores, como uma mutação no gene do fator II (G20210A), estiverem presentes com essa mutação, o risco de trombozes recorrentes também aumenta⁽¹⁾.

3. Princípio do teste

O kit RIDA®GENE Factor V usa um PCR em tempo real para detectar qualitativamente uma mutação pontual/polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de G a A na posição 1691 no gene do fator V humano (mutação do fator V de Leiden) no DNA genômico que foi isolado de amostras de sangue total humano de EDTA. Após o isolamento do DNA, o fragmento de gene específico (tipo selvagem ou mutação) é amplificado.

As sequências-alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a **Taq-Polymerase** separa o repórter do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes no kit são suficientes para 100 determinações.

Tabela 1: Reagentes fornecidos

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	amarelo, pronto para uso
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µL	vermelho, pronto para uso
A	Control A	1 ×	200 µL	azul, pronto para uso
B	Control B	1 ×	200 µL	verde, pronto a usar

5. Instruções de armazenamento

- Siga as diretrizes de manuseamento da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término da data de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 - 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 20 vezes não afeta as propriedades do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação do PCR (2 - 8 °C).

Tabela 2: Condições de armazenamento e informação

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-20 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-20 °C	20 ciclos de congelamento-descongelamento

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

6.1 Equipamento laboratorial

Os seguintes equipamentos são necessários para usar o kit RIDA®GENE Factor V:

Equipamentos
Plataforma de extração: Maxwell® RSC (Promega)
Instrumentos de PCR em tempo real: • LightCycler® 480 II (Roche) • Cobas z 480 Analyzer (Roche) • Mx3005P (Agilent Technologies) • ABI 7500 (Applied Biosystems) • CFX96™ (Bio-Rad)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) ao usar o LightCycler® 480 II e cobas z 480 Analyzer
Consumíveis PCR em tempo real (placas (baixo perfil, poços brancos, armação transparente), tubos de ensaio, filmes)
Centrífuga com rotor para placas
Vortexer
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pontas da pipeta com filtros
Luvras descartáveis sem pó

Para perguntas sobre o uso de equipamentos para processamento automatizado, entre em contato com a R-Biopharm AG em pcr@r-biopharm.de.

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para uso em Diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.

Salas separadas, vestuário especial e instrumentos para extração, preparação de PCR, o PCR deve ser usado para evitar a contaminação cruzada e resultados falso-positivos.

Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não troque ou misture os componentes (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Control A, Control B) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

Não use o kit após o prazo de validade. Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização.

Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Mais detalhes sobre as Folhas de Dados de Segurança (Safety Data Sheets, SDS) podem ser encontrados sob o número do item em

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

8. Coleta e armazenamento de amostras

8.1 Armazenamento de amostras

Este teste foi desenvolvido para o exame de amostras de sangue total humano de EDTA. Armazene as amostras em temperatura ambiente por até 24 horas e entre 2 - 8 °C por até 72 horas até a extração do DNA⁽⁴⁾. Deve ser evitada a contaminação microbiana das amostras. A utilização de amostras inativadas pelo calor, lipêmicas, hemolíticas, icteríticas ou opacas podem levar a resultados falsos.

8.2 Preparo das amostras

8.2.1 Isolamento do DNA do sangue total de EDTA

Um kit de isolamento de DNA disponível comercialmente ou sistema de extração de DNA (por exemplo, Maxwell® RSC Instrument (Promega)) é recomendado para o isolamento de DNA de sangue total de EDTA. As instruções do fabricante devem ser observadas.

Ao usar o Maxwell® RSC Instrument (Promega), é recomendável misturar as amostras de sangue por pelo menos 5 minutos em temperatura ambiente. Adicione 30 µL de proteinase K a um tubo de ensaio de 2 mL para o preparo da amostra. Adicione 200 µL da amostra de sangue e 300 µL do tampão de lise. Misture no vórtice a solução por 10 segundos e incube a 56 °C por 20 minutos. Use 100 µL do tampão de eluição para a extração. Maiores instruções do fabricante devem ser observadas.

9. Realização do teste

9.1 Preparação da Mistura Principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. O Controle A e o Controle B devem ser executados durante cada execução de teste.

Recomenda-se acrescentar um volume adicional de 10 % à Mistura Principal a fim de compensar a perda da pipetagem (consulte a Tabela 3). Antes de usar, descongele a **Reaction Mix**, a **Taq-Polymerase**, o **Control A**, e o **Control B**, misture com vórtice (exceto a Taq-Polymerase) e centrifugue brevemente. Os reagentes devem ser sempre resfriados adequadamente durante as etapas de trabalho (2 - 8 °C).

Tabela 3: Exemplo para o cálculo e produção da Mistura Principal para 10 reações

Código do kit	Componentes da Mistura Principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Taq-Polymerase	0,7 µL	7,7 µL
	Total	20 µL	220 µL

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µL da mistura principal em cada tubo de ensaio (placas).

Amostras: Adicione 5 µL de eluato a cada mistura principal pré-pipetada.

Controles: Adicione 5 µL de Control A a cada mistura principal pré-pipetada.

Adicione 5 µL de Control B a cada mistura principal pré-pipetada.

Selar as placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o instrumento de PCR em tempo real. Inicie o PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (consulte a Tabela 4, Tabela 5).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®GENE, o kit RIDA®GENE Factor V foi verificado no perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro. A transcrição inversa, portanto, vem em primeiro lugar no perfil universal.

Tabela 4: Perfil de PCR em tempo real universal para LightCycler® 480 II e cobas z 480 Analyzer

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ Índice de subida	Tempo máximo

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Tabela 5: Perfil de PCR em tempo real universal para Mx3005P, ABI 7500, e CFX96™

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

9.4 Configuração do canal de detecção

Tabela 6: Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Deteção	Canal de detecção	Comentário
Roche LightCycler® 480 II	Fator V t. selv.	465/510	É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutação	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Fator V t. selv.	465/510	É necessário o RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutação	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Fator V t. selv.	FAM	-
	Mutação	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Fator V t. selv.	FAM	Defina o corante de referência passiva ROX como nenhum.
	Mutação	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Fator V t. selv.	FAM	-
	Mutação	HEX	

10. Controle de qualidade – indicação de instabilidade ou expiração de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software de análise do instrumento de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. **Control A** e **Control B** devem mostrar os resultados corretos (consulte Tabela 7).

Tabela 7: Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	FAM	VIC	Gene-alvo Ct
Control A	+	-	Ver Certificado de Análise
Control B	-	+	Ver Certificado de Análise

* + = positivo
- = negativo

Se os dois controles, **Control A** e **Control B**, não estiverem de acordo com as especificações, repita toda a execução do PCR. Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

11. Interpretação dos resultados

Os resultados da amostra são interpretados de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Interpretação dos resultados*

Detecção de		
<i>Fator V t. selv.</i>	<i>Mutantes</i>	Resultado
+	-	Fator V tipo selvagem (homozigótica) detectável
-	+	Fator V mutação na posição 1691 (homozigótica) detectável
-	-	Sequência alvo não detectável, inválida
+	+	Fenótipo heterozigótico

* + = positivo
- = negativo

A execução do PCR não pode ser avaliada se os controles no sistema de detecção não apresentarem amplificações ou se nenhum dos canais alvo apresentar um resultado positivo. Toda a execução do PCR deve ser repetida.

A execução do PCR não pode ser avaliada se a amostra não exibir amplificação no sistema de detecção. Neste caso, o DNA não foi adicionado ou foi usado um DNA modelo inadequado (qualidade, inibidores de PCR). A amostra extraída deve ser reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

12. Limitações do método

1. O kit RIDA®GENE Factor V detecta a posição 1691 e qualquer polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene do fator V humano (mutação do fator V de Leiden) de amostras de sangue total humano de EDTA. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta a história médica e os sintomas do paciente.
3. Este teste é válido apenas para amostras de sangue total com EDTA.
4. A extração, o transporte, o armazenamento e o manuseio inadequados de amostras podem produzir resultados falso-negativos.
5. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos.
6. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir exatamente as instruções do fabricante ao realizar o teste.
7. A Lei de Diagnóstico Genético (GenDG) alemã exige uma explicação completa e consentimento por escrito dos pacientes para todas as análises genéticas de acordo com a GenDG.

13. Características de desempenho

13.1 Características de desempenho clínico

13.1.1 Especificidade analítica

Substâncias interferentes

A presença de inibidores de PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados inválidos. Portanto, foram examinados os efeitos de várias substâncias que poderiam estar presentes nas amostras correspondentes devido à ocorrência generalizada.

As substâncias que poderiam potencialmente influenciar significativamente os resultados do teste foram examinadas inicialmente em altas concentrações (simulação do pior caso) em uma tela de interferência. Se uma potencial interferência foi encontrada nesta tela de interferência para uma substância examinada, foi estabelecida uma relação dose-efeito entre a concentração da substância em questão e a interferência.

Não foram encontradas nenhuma interferências para as substâncias listadas na Tabela 9.

Tabela 9: Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Frascos de 500 UI de Medunasal Heparin (Heparina)	15 U/mL
Colesterol	3 mg/mL
Bilirrubina	0,1 mg/mL
Hemoglobina	0,2 mg/mL
K ₂ EDTA	1,8 mg/mL

13.1.2 Precisão

A precisão do kit Factor V foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão *Intraensaio*: Determinação de cinco amostras de controle usando 20 réplicas, cada uma no LightCycler® 480 II sob condições idênticas.

Precisão *Interensaio*: Determinação de 5 amostras de controle em 20 execuções em duplicado em 10 dias de trabalho (2 execuções por dia) realizadas por dois técnicos diferentes em condições reprodutíveis.

Os testes de precisão *intra* e *interensaio* foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os dados de precisão foram obtidos utilizando cinco amostras de controle, bem como os controles pertencentes ao ensaio.

O coeficiente de variação máximo obtido das medições com o kit RIDA®GENE Factor V no LightCycler® 480 II foi de 1,37 %.

Tabela 10: Resultados da precisão do kit RIDA®GENE Factor V para 1691G.

Valor médio Ct/CV		Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
1	Ct	27,9	28,3	28,3	28,3	28,2	28,4	28,3
	CV (%)	0,45 %	0,37 %	0,36 %	0,95 %	1,05 %	1,04 %	1,03 %
2	Ct	23,3	23,6	23,6	23,5	23,4	23,6	23,5
	CV (%)	0,38 %	0,28 %	0,19 %	1,07 %	1,37 %	1,25 %	1,24 %
3	Ct	22,0	22,3	22,3	22,3	22,3	22,4	22,3
	CV (%)	0,49 %	0,37 %	0,43 %	1,08 %	1,13 %	1,18 %	1,14 %
4	Ct	20,8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,1	21,1
	CV (%)	0,43 %	0,44 %	0,51 %	1,19 %	1,26 %	1,31 %	1,27 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabela 11: Resultados da precisão do kit RIDA®GENE Factor V para 1691A.

Valor médio Ct/CV		Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	24,2	24,2	24,2	24,2	24,5	24,6	24,4
	CV (%)	0,53 %	0,65 %	0,73 %	1,01 %	0,86 %	0,73 %	1,21 %
3	Ct	23,1	23,1	23,2	23,0	23,4	23,5	23,3
	CV (%)	0,67 %	0,58 %	0,75 %	0,76 %	0,98 %	1,02 %	1,35 %
4	Ct	21,8	21,8	21,8	21,7	22,0	22,1	21,9
	CV (%)	0,73 %	0,63 %	0,65 %	0,76 %	0,77 %	0,88 %	1,21 %
5	Ct	28,8	28,9	28,8	28,7	29,1	29,1	29,0
	CV (%)	0,39 %	0,72 %	0,41 %	0,56 %	0,77 %	0,92 %	1,04 %

14. Histórico de versões

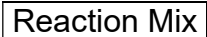
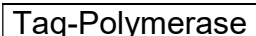
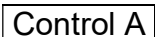
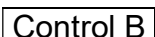
Número da versão	Seção e designação
2022-03-08	Versão da edição

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte o manual de operação
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

	Reaction Mix
	Taq Polymerase
	Control A
	Control B

16. Referências

1. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(12):1489-98.
2. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. Genet Med. 2011;13(1):1-16.
3. Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Nakaji P, Feigl GC, Gharabaghi A, Samii M, et al. Thrombophilia Due to Factor V and Factor II Mutations and Formation of a Dural Arteriovenous Fistula: Case Report and Review of a Rare Entity. Skull Base. 2008;18(2):135-43.
4. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005