



RIDA® GENE Factor II

REF PY1205



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania

+49 (0) 61 51 81 02-0 /  +49 (0) 61 51 81 02-20 /  www.r-biopharm.com



1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. El kit RIDA®GENE Factor II utiliza la PCR en tiempo real para detectar cualitativamente una mutación puntual de G a A en la posición 20210 en el gen del factor II humano (protrombina) en el ADN genómico que fue aislado de muestras de sangre entera humana con EDTA. El kit RIDA®GENE Factor II está destinado a apoyar el diagnóstico en la evaluación de pacientes con sospecha de tromboembolismo venoso.

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 al año⁽¹⁾. El factor II, una glicoproteína dependiente de la vitamina K, que desempeña un papel esencial en la coagulación de la sangre, se considera un factor de riesgo para los trastornos de la coagulación de la sangre^(1, 2). El segundo defecto genético más común para heredar trombosis es una mutación del gen del factor II⁽²⁾. Este gen está situado en el cromosoma 11 y codifica la protrombina (factor de coagulación II). Causada por una tasa de expresión aumentada, una mutación en la 3'UTR del gen del factor II (G20210A) da lugar a un nivel elevado de protrombina del 30 % en los heterocigotos y del 70 % en los homocigotos, en comparación con el tipo natural. Esta elevación del nivel de protrombina se define como un factor de riesgo^(1, 3). La protrombina se convierte entonces en su forma enzimáticamente activa, la trombina (factor IIa), cuando es activada por el factor X, el factor V, el calcio y los fosfolípidos⁽³⁾. La variante del gen del factor II también puede estar asociada a otras condiciones médicas, como el infarto de miocardio o la pérdida del embarazo^(4, 5). La susceptibilidad a los trastornos aumenta cuando están presentes múltiples factores de riesgo genéticos (por ejemplo, la mutación del factor V de Leiden, las variantes de la MTHFR, el déficit de proteína C o el déficit de proteína S) o, en caso de exposición a otros factores de riesgo, como el tabaquismo, el embarazo, el sobrepeso, los anticonceptivos orales o la inmovilidad⁽¹⁾.

3. Principio del ensayo

El kit RIDA®GENE Factor II utiliza la PCR en tiempo real para detectar cualitativamente una mutación puntual/polimorfismo de nucleótido único (SNP) de G a A en la posición 20210 en el gen del factor II humano (protrombina) en el ADN genómico que se aisló 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $8\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte 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 ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $8\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de almacenamiento	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	Puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa
abierto	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	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 II:

Equipo
Plataforma de extracción: Maxwell® RSC (Promega)
Equipos de PCR en tiempo real: <ul style="list-style-type: none">• 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) 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 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. Almacene las muestras a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas y a 2 °C - 8 °C durante un máximo de 72 horas hasta que se extraiga el ADN⁽⁶⁾. Debe evitarse la contaminación microbiana 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. Para la preparación de las muestras, añada 30 µL de proteinasa K a un vial de reacción de 2 mL. 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-Polimerasa) 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 la PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (consulte las 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 II 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 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 II WT	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutación	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Factor II WT	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutación	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Factor II WT	FAM	-
	Mutación	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Factor II WT	FAM	Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en "none" (ninguno).
	Mutación	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Factor II 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 ejecución de la 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 II WT</i>	<i>Mutantes</i>	Resultado
+	-	Factor II de tipo natural (homocigoto) detectable
-	+	Mutación del factor II en la posición 20210 (homocigoto) detectable
-	-	Secuencia objetivo no detectable, no válida
+	+	Fenotipo heterocigoto

* + = positivo
- = negativo

La ejecución de la PCR no puede evaluarse si los controles del sistema de detección no muestran ninguna amplificación 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 un ADN molde inadecuado (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 II detecta la posición 20210 y cualquier polimorfismo de nucleótido único (SNP) G20210A en el gen de la protrombina humana, el factor II, 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 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 dada 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 II 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 II en el LightCycler® 480 II fue del 1,56 %.

Tabla 10: Resultados de la precisión del kit RIDA®GENE Factor II para 20210G.

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	27,6	27,8	27,8	27,8.	27,8.	27,9	27,8
	CV (%)	0,55 %	0,62 %	0,86 %	1,13 %	1,20 %	1,15 %	1,16 %
2	Ct	23,4	23,6	23,4	23,6	23,6	23,6	23,6
	CV (%)	0,31 %	0,49 %	0,52 %	1,21 %	0,97 %	1,09 %	1,10 %
3	Ct	21,0	21,2	21,0	21,2	21,2	21,2	21,2
	CV (%)	0,58 %	0,65 %	0,65 %	1,36 %	1,25 %	1,25 %	1,29 %
4	Ct	20,1	20,4	20,1	20,2	20,3	20,3	20,3
	CV (%)	0,57 %	0,51 %	0,67 %	1,51 %	1,35 %	1,20 %	1,36 %
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 de la prueba RIDA®GENE Factor II para 20210A.










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.
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
2	Ct	22,7	23,1	22,8	23,4	23,4	23,5
	CV (%)	1,51 %	0,99 %	1,18 %	1,34 %	1,20 %	1,02 %
3	Ct	20,6	20,8	20,5	20,8	20,9	20,9
	CV (%)	0,59 %	0,74 %	0,79 %	1,56 %	1,36 %	1,06 %
4	Ct	19,7	19,8	19,7	19,9	20,0	20,0
	CV (%)	0,67 %	0,70 %	0,70 %	1,23 %	1,19 %	0,96 %
5	Ct	27,7	27,4	27,9	27,4	27,6	27,5
	CV (%)	0,43 %	0,38 %	0,30 %	0,79 %	0,55 %	0,67 %

14. Historial de versiones





Número de versión	Sección y designación
2022-03-07	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. 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.
3. Chinnaraj M, Planer W, Pozzi N. Structure of Coagulation Factor II: Molecular Mechanism of Thrombin Generation and Development of Next-Generation Anticoagulants. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:281.
4. Rees DC, Chapman NH, Webster MT, Guerreiro JF, Rochette J, Clegg JB. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol.* 1999;105(2):564-6.
5. Gao H, Tao FB. Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update. *Thromb Res.* 2015;135(2):339-46.
6. 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