

RIDA® GENE Factor II

REF PY1205



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

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



1. Application

Pour usage diagnostique in vitro. Le kit RIDA®GENE Factor II utilise la PCR en temps réel pour détecter qualitativement une mutation ponctuelle de G à A en position 20210 dans le gène du facteur II humain (prothrombine) dans l'ADN génomique qui a été isolé à partir d'échantillons de sang total EDTA humain. Le kit RIDA®GENE Factor II est destiné à soutenir le diagnostic dans l'évaluation des patients présentant une suspicion de maladie thromboembolique veineuse.

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 II, une glycoprotéine dépendante de la vitamine K, qui joue un rôle essentiel dans la coagulation du sang, est considéré comme un facteur de risque de troubles de la coagulation sanguine^(1, 2). Le deuxième défaut génétique le plus courant pour hériter de thromboses est une mutation du gène du facteur II⁽²⁾. Ce gène est situé sur le chromosome 11 et code pour la prothrombine (facteur de coagulation II). Causée par un taux d'expression accru, une mutation dans le 3'UTR du gène du facteur II (G20210A) entraîne une élévation du taux de prothrombine de 30 % chez les hétérozygotes et de 70 % chez les homozygotes, par rapport au type sauvage. Cette élévation du taux de prothrombine est définie comme un facteur de risque^(1, 3). La prothrombine est ensuite convertie en sa forme enzymatiquement active, la thrombine (facteur IIa), lorsqu'elle est activée par le facteur X, le facteur V, le calcium et les phospholipides⁽³⁾. La variante du gène du facteur II peut également être associée à d'autres problèmes médicaux tels que l'infarctus du myocarde ou la fausse couche^(4, 5). La sensibilité aux troubles augmente lorsque plusieurs facteurs de risque génétiques sont présents (par exemple, la mutation du facteur V Leiden, les variantes du MTHFR, le déficit en protéine C ou le déficit en protéine S) ou en cas d'exposition à d'autres facteurs de risque, comme le tabagisme, la grossesse, le surpoids, les contraceptifs oraux ou l'immobilité⁽¹⁾.

3. Principe du test

Le kit RIDA®GENE Factor II utilise la PCR en temps réel pour détecter qualitativement une mutation ponctuelle/polymorphisme nucléotidique simple (SNP) de G à A à la position 20210 dans le gène du facteur II humain (prothrombine) 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 II :

Matériel
Plateforme d'extraction : Maxwell® RSC (Promega)
Instruments de PCR en temps réel : <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) (Biopharm) pour une utilisation avec LightCycler® 480 II 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 entre 2 et 8 °C pendant 72 heures maximum avant l'extraction de l'ADN⁽⁶⁾. Il faut éviter toute contamination microbienne des échantillons. 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® RCS Instrument (Promega), il est recommandé de mélanger les échantillons de sang pendant au moins 5 minutes à température ambiante. Pour la préparation de l'échantillon, ajouter 30 µL de protéinase K à un flacon de réaction de 2 mL. 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 Master Mix 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 au Vortex (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 °C - 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 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 II 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 le 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 II WT	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	Mutation	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Facteur II WT	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	Mutation	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Facteur II WT	FAM	-
	Mutation	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Facteur II WT	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	Mutation	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Facteur II 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, vérifiez 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, consultez 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		Résultat
<i>Facteur II WT</i>	<i>Mutants</i>	
+	-	Facteur II de type sauvage (homozygote) détectable
-	+	Mutation du facteur II en position 20210 (homozygote) détectable
-	-	Séquence cible non détectable, non valide
+	+	Phénotype hétérozygote

* + = positif
- = négatif

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

L'analyse 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 une matrice ADN inappropriée (qualité, inhibiteurs de PCR) a été utilisée. 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 II détecte la position 20210 et tout polymorphisme nucléotidique simple (SNP) G20210A dans le gène de la prothrombine humaine, le facteur II, 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, compte tenu 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 Facto II 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 à l'aide du kit RIDA®GENE Factor II sur le LightCycler® 480 II était de 1,56 %.

Tableau 10 : Résultats relatifs à la précision du test kit RIDA®GENE Factor II pour le 20210G.

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	Lot des kits 1 à 3	
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	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 II pour le 20210A.

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	22,7	23,1	22,8	23,4	23,4	23,5	23,4
	CV (%)	1,51 %	0,99 %	1,18 %	1,34 %	1,20 %	1,02 %	1,19 %
3	Ct	20,6	20,8	20,5	20,8	20,9	20,9	20,9
	CV (%)	0,59 %	0,74 %	0,79 %	1,56 %	1,36 %	1,06 %	1,35 %
4	Ct	19,7	19,8	19,7	19,9	20,0	20,0	19,9
	CV (%)	0,67 %	0,70 %	0,70 %	1,23 %	1,19 %	0,96 %	1,14 %
5	Ct	27,7	27,4	27,9	27,4	27,6	27,5	27,5
	CV (%)	0,43 %	0,38 %	0,30 %	0,79 %	0,55 %	0,67 %	0,75 %

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2022-03-07	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. 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