

## RIDA® GENE Factor II

**REF** PY1205



## 1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il kit RIDA®GENE Factor II utilizza la PCR real-time per rivelare qualitativamente la mutazione puntiforme G20210A nel gene del fattore umano II (protrombina) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue umano intero trattato con EDTA. Il kit RIDA®GENE Factor II destinato a supportare la diagnosi nella valutazione di pazienti con sospetta tromboembolia venosa.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Le trombosi sono un problema clinico importante che aumenta con l'età. Circa una persona su 100.000 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<sup>(1)</sup>. Il fattore II, una glicoproteina dipendente dalla vitamina K che svolge un ruolo essenziale nella coagulazione del sangue, è considerato un fattore di rischio per i disturbi della coagulazione del sangue<sup>(1, 2)</sup>. Il secondo difetto genetico più comune per l'ereditarietà della trombosi è una mutazione a carico del gene del fattore II<sup>(2)</sup>. Questo gene si trova sul cromosoma 11 e codifica per la protrombina (fattore II della coagulazione). Una mutazione nella 3' UTR del gene del fattore II (G20210A), provocata da un aumento del tasso di espressione, causa un aumento dei livelli di protrombina del 30% nei soggetti eterozigoti e del 70% nei soggetti omozigoti rispetto al gene wild type. L'aumento dei livelli di protrombina è considerato un fattore di rischio<sup>(1, 3)</sup>. Quando viene attivata dal fattore X, dal fattore V, dal calcio e dai fosfolipidi, la protrombina viene convertita nella sua forma enzimaticamente attiva, la trombina (fattore IIa)<sup>(3)</sup>.

La mutazione del gene del fattore II può anche essere associata ad altre condizioni cliniche come l'infarto del miocardio o l'aborto spontaneo<sup>(4, 5)</sup>. La sensibilità ai disturbi aumenta in presenza di più fattori di rischio genetico (per esempio, mutazione del fattore V Leiden, varianti MTHFR, deficit di proteina C o di proteina S) o in caso di esposizione ad altri fattori di rischio come il fumo, la gravidanza, il sovrappeso, i contraccettivi orali o l'immobilità<sup>(1)</sup>.

### 3. Principio del test

Il kit RIDA®GENE Factor II utilizza la PCR real-time per rivelare qualitativamente la mutazione puntiforme/il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) da G ad A in posizione 20210 nel gene del fattore umano II (protrombina) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue umano intero trattato 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).
- Il congelamento/scongelamento ripetuto fino a 20 volte non influisce 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 II occorre la seguente attrezzatura:

<b>Attrezzatura</b>
Piattaforma di estrazione: Maxwell® RSC (Promega)
Strumenti per la PCR real-time: <ul style="list-style-type: none"><li>• LightCycler® 480 II (Roche)</li><li>• Cobas z 480 Analyzer (Roche)</li><li>• Mx3005P (Agilent Technologies)</li><li>• ABI 7500 (Applied Biosystems)</li><li>• CFX96™ (Bio-Rad)</li></ul>
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) per l'uso con gli analizzatori LightCycler® 480 II et 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 di attrezzature per la lavorazione automatizzata, contattare R-Biopharm AG su [pcr@r-biopharm.de](mailto: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 <sup>(6)</sup>.

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<sup>®</sup> RSC (Promega)). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Quando si utilizza lo strumento Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega), si raccomanda di miscelare i campioni di sangue per almeno 5 minuti a temperatura ambiente. Per la preparazione del campione, aggiungere 30 µL di proteinasi K in una cuvetta di reazione da 2 mL. 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
	<b>Totale</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

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 (vedere Tabella 4 e Tabella 5).

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo PCR real-time universale

Per armonizzare i test RIDA®GENE, il kit RIDA®GENE Factor II stato verificato nel profilo universale. Questo rende possibile 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 II WT	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutazione	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Fattore II WT	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutazione	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Fattore II WT	FAM	-
	Mutazione	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Fattore II WT	FAM	Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su none (nessuno).
	Mutazione	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Fattore II 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 produttore. 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 II WT</i>	<i>Mutanti</i>	Risultato
+	-	<b>Fattore II wild type (omozigote) rivelabile</b>
-	+	<b>Mutazione del fattore II in posizione 20210 (omozigote) rivelabile</b>
-	-	<b>Sequenza target non rivelabile, non valido</b>
+	+	<b>Fenotipo eterozigote</b>

\* + = 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 II rivela la posizione 20210 e qualsiasi polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) G20210A nel gene del fattore umano II (protrombina), in campioni di sangue umano intero 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 <sub>2</sub> EDTA	1,8 mg/mL

### 13.1.2 Precisione

La precisione del kit Factor II 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 II su LightCycler® 480 II è stato 1,56%.

**Tabella 10:** Risultati della precisione del kit RIDA®GENE Factor II per 20210G.

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	27,6	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 (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile

**Tabella 11:** Risultati della precisione del kit RIDA®GENE Factor II per 20210A.










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	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. Cronologia delle versioni





Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-03-07	Versione di rilascio

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Usò 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

	Miscela di reazione
	Taq polimerasi
	Controllo A
	Controllo 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. 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