

RIDA® GENE Factor II

REF PY1205



1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O kit RIDA®GENE Factor II kit usa um PCR em tempo real para detectar qualitativamente uma mutação pontual de G a A na posição 20210 no gene do fator II humano (protrombina) no DNA genômico que foi isolado de amostras de sangue total humano de EDTA. O kit RIDA®GENE Factor II destina-se a apoiar o diagnóstico na avaliação de pacientes com suspeita de tromboembolismo venoso.

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 II, uma glicoproteína dependente de vitamina K, que desempenha um papel essencial na coagulação do sangue, é considerado um fator de risco para distúrbios de coagulação do sangue^(1, 2). O segundo defeito genético mais comum para herdar trombozes é uma mutação do gene do fator II⁽²⁾. Este gene está localizado no cromossomo 11 e códigos para protrombina (fator de coagulação II). Devido ao aumento da taxa de expressão, uma mutação na região 3' não traduzida do gene do fator II (G20210A) resulta em um nível elevado de protrombina de 30 % em pessoas heterozigóticas e de 70% em pessoas homozigóticas, em comparação com o tipo selvagem. Esta elevação no nível da protrombina é definida como um fator de risco^(1, 3). A protrombina é então convertida em sua forma enzimaticamente ativa, a trombina (fator IIa), quando ativada pelo fator X, fator V, cálcio e fosfolipídios⁽³⁾.

O gene variante do fator II também pode ser associado a outras condições médicas como infarto do miocárdio ou interrupção da gravidez^(4, 5). A suscetibilidade a distúrbios aumenta quando múltiplos fatores de risco genético estão presentes (por exemplo, mutação do fator V de Leiden, variantes MTHFR, deficiência de proteína C ou deficiência de proteína S) ou em caso de exposição a outros fatores de risco, como fumo, gravidez, excesso de peso, contraceptivos orais ou imobilidade⁽¹⁾.

3. Princípio do teste

O kit RIDA®GENE Factor II kit usa um PCR em tempo real para detectar qualitativamente uma mutação pontual/polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de G a A na posição 20210 no gene do fator II humano (protrombina) 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 repetido até 20 vezes não afeta a propriedade 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 II:

Equipamentos
Plataforma de extração: Maxwell® RSC (Promega)
Instrumentos de PCR em tempo 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) (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
Luvas 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 a 8 °C por até 72 horas até a extração do DNA.⁶ 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. Para o preparo da amostra, adicione 30 µL de proteinase K a um tubo de ensaio de 2 mL. 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 II 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 deteção	Comentário
Roche LightCycler® 480 II	Fator II t. selv.	465/510	É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutação	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Fator II t. selv.	465/510	É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutação	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Fator II t. selv.	FAM	-
	Mutação	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Fator II t. selv.	FAM	Defina o corante de referência passiva ROX como nenhum.
	Mutação	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Fator II 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 II t. selv.</i>	<i>Mutantes</i>	Resultado
+	-	Fator II tipo selvagem (homozigótica) detectável
-	+	Fator II mutação na posição 20210 (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 quaisquer 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 II detecta a posição 20210 e qualquer polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) G20210A no gene da protrombina humana, fator II, 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 II 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 II no LightCycler® 480 II foi de 1,56 %.

Tabela 10: Resultados da precisão do kit RIDA®GENE Factor II para 20210G.

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	27,6	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/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabela 11: Resultados da precisão do kit RIDA®GENE Factor II para 20210A.










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.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
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. Histórico de versões





Número da versão	Seção e designação
2022-03-07	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. 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