

## 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<sup>(1)</sup>. El factor V de Leiden se considera el factor genético más común que se describe en combinación con el desarrollo de tromboembolismo venoso<sup>(2)</sup>. 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<sup>(3)</sup>. El factor V de Leiden está ampliamente distribuido, con una alta prevalencia en Europa y con prácticamente ningún caso en Asia o África<sup>(2)</sup>. 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<sup>(2)</sup>. 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<sup>(1)</sup>.

### 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	<b>Reaction Mix</b>	2 ×	1050 µL	amarillo, listo para usar
2	<b>Taq-Polymerase</b>	1 ×	80 µL	rojo, listo para usar
A	<b>Control A</b>	1 ×	200 µL	azul, listo para usar
B	<b>Control B</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: <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) 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](mailto: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<sup>(4)</sup>.

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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

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 inadecuados 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 <sub>2</sub> 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