

RIDA® GENE Factor V

REF PY1210



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Germania

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



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il kit RIDA®GENE Factor V utilizza la PCR real-time per rivelare qualitativamente la mutazione puntiforme G1691A nel gene del fattore V umano (mutazione di Leiden del fattore V) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue intero umano trattato con EDTA.

Il kit RIDA®GENE Factor V è destinato a supportare la diagnosi nella valutazione di pazienti con sospetta trombofilia.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le trombosi sono un problema medico importante che aumenta con l'età. Circa una su 100.000 persone 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⁽¹⁾. Il fattore V Leiden è considerato il fattore genetico più comunemente descritto in associazione allo sviluppo di tromboembolia venosa⁽²⁾. Si tratta di una mutazione puntiforme nel gene del fattore V in posizione 1691 che porta alla sostituzione di un singolo nucleotide (da G ad A). Di conseguenza, il sito di legame della proteina C attivata con effetto anticoagulante non è più disponibile (resistenza APC) e il taglio del fattore V risulta inferiore rispetto al gene wild type; questo si traduce in uno stato di ipercoagulabilità⁽³⁾. Il fattore V Leiden è ampiamente distribuito con alta prevalenza in Europa e quasi totalmente assente in Asia o in Africa⁽²⁾. In presenza di mutazione genetica del fattore V di tipo eterozigote, la probabilità di sviluppare una trombosi venosa è da 3 a 8 volte superiore. Se la mutazione in posizione 1691 è omozigote, la probabilità aumenta da 10 a 80 volte. Inoltre, in questo caso aumenta anche la possibilità di sviluppare una trombosi venosa in giovane età⁽²⁾. Fattori concomitanti, come una mutazione nel gene del fattore II (G20210A), aumentano anche il rischio di trombosi ricorrenti⁽¹⁾.

3. Principio del test

Il kit RIDA®GENE Factor V utilizza la PCR real-time per rivelare qualitativamente una mutazione puntiforme/polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) da G ad A in posizione 1691 nel gene del fattore V umano (mutazione di Leiden del fattore V) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue intero umano trattati 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).
- Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento (fino a 20 volte) non influiscono 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 V occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Piattaforma di estrazione: Maxwell® RSC (Promega)
Strumenti per la PCR real-time: <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) per l'uso con gli analizzatori LightCycler® 480 II e 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 delle attrezzature per la processazione automatizzata contattare R-Biopharm AG all'indirizzo 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 ⁽⁴⁾.

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® RSC (Promega)). Attenersi alle istruzioni del fabbricante.

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

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 (Tabella 4 e Tabella 5).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale della PCR real-time

Per armonizzare i test RIDA®GENE, il kit RIDA®GENE Factor V è stato verificato nel profilo universale. Questo consente di 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

Trascrizione inversa	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 V WT	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutazione	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Fattore V WT	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	Mutazione	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Fattore V WT	FAM	-
	Mutazione	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Fattore V WT	FAM	Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su none (nessuno).
	Mutazione	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Fattore V 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 fabbricante. 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 V WT</i>	<i>Mutanti</i>	Risultato
+	-	Fattore V wild type (omozigote) rivelabile
-	+	Mutazione del fattore V in posizione 1691 (omozigote) rivelabile
-	-	Sequenza target non rivelabile, non valido
+	+	Fenotipo eterozigote

* + = 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 V rivela la posizione 1691 e qualsiasi polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) nel gene del fattore V umano (mutazione di Leiden del fattore V) in campioni di sangue intero umano 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 ₂ EDTA	1,8 mg/mL

13.1.2 Precisione

La precisione del kit Factor V è 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 V su LightCycler® 480 II è stato 1,37%.

Tabella 10: Risultati della precisione del kit RIDA®GENE Factor V per 1691G.

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	27,9	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.						
	CV (%)	non disponibile						

Tabella 11: Risultati della precisione del kit RIDA®GENE Factor V per 1691A.

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.						
	CV (%)	non disponibile						
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. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-03-08	Versione di rilascio

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Uso 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

	Reaction Mix
	Taq Polymerase
	Control A
	Control 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. 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