

FV-PTH mpx RealFast™ Assay

REF 7-115 / 7-118 Σ 100 / 32 reactions
-30°C / -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
info@viennalab.com
www.viennalab.com

1. Intended Use

The FV-PTH mpx RealFast™ Assay is a fast and accurate multiplex real-time PCR test for the simultaneous detection of the two most important thrombophilic mutations. The point mutation 1691G>A in the human coagulation *Factor V (F5)* gene, referred to as FV Leiden, and the prothrombin (PTH) 20210G>A mutation in the *Factor II (F2)* gene are associated with hereditary thrombophilia. The kit is intended to test patients suspected of having an increased risk for thrombotic disorders. The qualitative assay discriminates the three possible genotypes for each of the mutations in human genomic DNA: normal, heterozygous or homozygous mutant.

Reference sequence: FV: NG_011806.1 g.41721G>A; dbSNP: rs6025 / PTH: NG_008953.1 g.25313G>A; dbSNP: rs1799963.

2. Introduction

FV and PTH are major players in the coagulation cascade. The FV Leiden mutation causes a single amino acid exchange at position 506 (R506Q), which alters a cleavage site and thereby prevents efficient inactivation of FV. Persisting FV activity increases the risk of clot formation in veins. The PTH 20210G>A mutation in the 3' untranslated region results in increased mRNA synthesis and higher prothrombin plasma levels, which in turn lead to elevated thrombin generation and consequently to excessive formation of fibrin clots. Heterozygous FV Leiden carriers encounter a 5 to 10 times higher risk of having venous thrombosis, whereas homozygous carriers have a 50 to 100 times higher risk compared to non-carriers. Heterozygous PTH 20210G>A carriers encounter a 3-fold, homozygous carriers up to a 20-fold increased risk compared to non-carriers. Individuals with additional risk factors, like the presence of other thrombophilic mutations, obesity, hypertension, type 2 diabetes, smoking or intake of oral contraceptives, are even more predisposed to venous thrombotic events.

3. Kit Contents

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 vial □ white cap	1000 / 320 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	1 vial ■ purple cap	550 / 550 µl
FV-PTH mpx WT-Control	1 vial ■ green cap	75 / 75 µl
FV-PTH mpx MUT-Control	1 vial ■ red cap	75 / 75 µl

The RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The FV-PTH mpx Assay Mix consists of *F5* and *F2* gene-specific primers and four allele-specific, dual-labeled hydrolysis probes. Controls representing wild type (WT-Control) and homozygous mutant (MUT-Control) genotypes are supplied with the kit.

The kit contains reagents for 100 / 32 reactions in a final volume of 20 µl each.

4. Storage and Stability

FV-PTH mpx RealFast™ Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -30 to -15°C. Alternatively, store at 2 to 8°C for short-term use within one month. The kit withstands up to 20 freeze/thaw cycles with no loss of activity. Avoid prolonged exposure to intense light. If stored correctly, the kit will retain full activity until the expiration date indicated on the label.

5. Product Description

5.1. Principle of the Test

The test is based on the fluorogenic 5' nuclease assay, also known as TaqMan® assay. Each reaction contains two gene-specific primer pairs which amplify a 142 bp fragment of the *F5* gene and a 110 bp fragment of the *F2* gene, as well as four dual-labeled, allele-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequences of the amplified fragments. The proximity of the 5'-fluorescent reporter and 3'-quencher dye on intact probes prevents the reporter from fluorescing. During the extension phase of PCR the 5' – 3' exonuclease activity of the Taq DNA polymerase cleaves the 5'-fluorescent reporter from the hybridized probe. The physical separation of the fluorophore from the quencher dye generates a fluorescent signal in real-time, which is proportional to the accumulated PCR product.

Hydrolysis probe	Fluorophore	Channel
FV mutant	FAM	520 nm
FV wild type	HEX	556 nm
PTH mutant	ROX	605 nm
PTH wild type	Cy5	670 nm

In normal samples the **wild type probes** generate a strong fluorescence signal in the HEX or Cy5 channel and no or only a baseline signal in the FAM or ROX channel. Vice versa, in homozygous mutant samples the hybridized **mutant probes** generate a strong fluorescence signal in the FAM or ROX channel and no or only a baseline signal in the HEX or Cy5 channel. In heterozygous samples, both wild type and mutant probes bind to the amplicons and generate intermediate signals in the respective channels.

5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The FV-PTH mpx RealFast™ Assay is validated for use with various common real-time PCR instruments capable of recording FAM, HEX, Cy5 and ROX fluorescence:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Note:** RealFast™ Genotyping QuickGuides for setting up and analyzing experiments on different types of instruments can be downloaded from www.viennalab.com. «

The kit is **not suitable** for use with real-time PCR instruments requiring ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments: StepOne™, 7300, 7900/7900HT) or for instruments without appropriate fluorescence detection channels.

5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 39 positive FV Leiden alleles and 37 positive PTH 20210G>A alleles, both tested with a CE-marked reference kit. The FV-PTH mpx RealFast™ Assay correctly determined all positive alleles, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 235 negative FV Leiden alleles and 247 negative PTH 20210G>A alleles, both tested with a CE-marked reference kit. The FV-PTH mpx RealFast™ Assay correctly determined all negative alleles, which equaled a true negative rate of 100%.

Limit of detection: 0.2 ng genomic DNA (per reaction). Recommended DNA concentration: 2 to 20 ng/µl genomic DNA.

6. Materials Required but not Supplied

Real-time PCR instrument with FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) and Cy5 (670nm) filters, instrument-compatible reaction vessels, disposable powder-free gloves, vortexer, mini-centrifuge for 2.0 ml tubes, tube racks, set of calibrated micropipettes (0.5 – 1000 µl), sterile tips with aerosol-barrier filter, molecular grade water, DNA extraction system, freezer, biohazard waste container.

7. Experimental Protocol

7.1. DNA Extraction

DNA extraction reagents are **not supplied** with the kit.

DNA isolated from various specimens (e.g. whole peripheral blood, dried blood spots, buccal swabs or saliva) can be used. Ensure extracted DNA is suitable for amplification in terms of concentration, purity and integrity.

For accurate genotype calling, the DNA amount per reaction should be within the range of 10 to 100 ng for all samples.

7.2. PCR Controls

Always include a **No Template Control (NTC)** in each experiment to confirm absence of potential contamination. It is advisable to run the NTC (use PCR-grade water instead of DNA) in duplicate.

Always include the FV-PTH mpx **WT-Control** and FV-PTH mpx **MUT-Control** as positive reference signals for your unknown samples. Some real-time PCR software, e.g. AB 7500 Fast, requires signals for all three possible genotypes for correct allelic discrimination. In order to obtain a heterozygous control (HET-Control), mix an aliquot of WT-Control and MUT-Control in a ratio of 1:1.

» **Note:** *WT- and MUT-Controls are potential sources of contamination. Make sure to handle them carefully.* «

7.3. Preparation of FV-PTH mpx RealFast™ Master Mix:

Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing. Set up PCR at room temperature. Prepare sufficient **Master Mix** for all your reactions (N samples + positive controls + negative controls) plus at least one additional reaction to compensate for pipetting inaccuracies:

Component	per reaction	e.g. 24+1 reactions
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Dispense **15 µl Master Mix** into each well. Add **5 µl** purified **DNA** or **Control** template to reach a final reaction volume of 20 µl.

To minimize risk of contamination, always pipette templates in the following order: first NTC, then samples, last positive controls. Immediately close reaction vessels.

» **Note:** *Avoid creating bubbles in the final reaction mix and avoid touching the optical surface of the cap or sealing film without gloves. Both may interfere with fluorescence measurements. Centrifuge briefly if needed.* «

7.4. PCR Program

Program the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions for allelic discrimination / genotyping experiments. Place the samples into the thermal cycler and run the following program:

Program			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, and other Peltier heating-block based instruments	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Cycles	Temp	Time	Steps	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation	Denaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Data acquisition on FAM, HEX, ROX and Cy5 channels	Annealing/Extension – Data acquisition on Green, Yellow, Orange and Red channels

8. Data Analysis / Interpretation of Results

The genotype of each sample is determined by calculating the ratio between signals recorded in the **HEX** or **Cy5 channel (normal)** and signals recorded in the **FAM** or **ROX channel (mutant)**. Most real-time PCR software automatically resolves data of two channels into clusters in a scatterplot. Data points plotted along the x- and y-axes correspond to normal and homozygous mutant genotypes, respectively. Data points clustered in the middle of the scatterplot represent heterozygous genotypes. The NTC appears in the lower left corner.

Controls / Samples	Amplification in channel				Genotype FV / PTH
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NO	YES	NO	YES	normal FV / normal PTH
mpx HET-Control	YES	YES	YES	YES	heterozygous FV / heterozygous PTH
mpx MUT-Control	YES	NO	YES	NO	homozygous mutant FV / homozygous mutant PTH
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Sample 1	YES	YES	NO	YES	heterozygous FV / normal PTH
Sample 2	YES	NO	NO	YES	homozygous mutant FV / normal PTH
Sample 3	NO	YES	YES	YES	normal FV / heterozygous PTH
Sample 4	NO	YES	YES	NO	normal FV / homozygous mutant PTH

Some instrument software needs manual threshold settings for accurate genotype calling.

Recommendations for Threshold Settings (C_q):

Set threshold value for the FAM and ROX channels just above the background fluorescent signal generated by the WT-Control (HEX-/Cy5-positive). Vice versa, set threshold value for the HEX and Cy5 channels just above the background fluorescent signal of the MUT-Control (FAM-/ROX-positive).

Samples crossing the threshold line beyond C_q 37 give invalid results and must be repeated.

To analyze acquired data, please follow your instrument software instructions.

9. Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostics use only.
- Always use disposable powder-free gloves and wear suitable lab coat when handling specimens and reagents.
- Perform reaction setup in an area separate from nucleic acid preparation and PCR product analysis.
- Use pipettes dedicated for PCR setup only, use aerosol-guarded pipette tips.
- Use instrument-compatible reaction vessels with optically clear caps or sealers.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use expired kits or kit components.

FV-PTH mpx RealFast™ Assay

REF 7-115 / 7-118 Σ 100 / 32 Reaktionen
-30°C / -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
info@viennalab.com
www.viennalab.com

1. Verwendungszweck

Der FV-PTH mpx RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur gleichzeitigen Detektion der zwei wichtigsten Mutationen für Thrombophilie. Die als FV Leiden bekannte Punktmutation 1691G>A im humanen *Faktor V (F5)* Gen und die Prothrombin (PTH) 20210G>A Mutation im humanen *Faktor II (F2)* Gen sind Risikofaktoren für vererbte Thrombophilie. Der Kit dient zur Testung von Patienten, die im Verdacht stehen ein erhöhtes Risiko für thrombotische Störungen zu haben. Der qualitative Test weist in humaner genomischer DNA für jede Mutation einen der drei möglichen Genotypen nach: normal, heterozygot oder homozygot mutiert. Referenzsequenz: FV: NG_011806.1 g.41721G>A; dbSNP: rs6025 / PTH: NG_008953.1 g.25313G>A; dbSNP: rs1799963.

2. Einleitung

FV und PTH sind Hauptkomponenten in der Kaskade der Blutgerinnungsfaktoren. Die FV Leiden Mutation verursacht einen Aminosäureaustausch an Position 506 (R506Q), der die Schnittstelle verändert und dadurch eine effiziente Inaktivierung des FV verhindert. Anhaltende FV Aktivität erhöht das Risiko einer Blutgerinnselbildung in Venen. Die 20210G>A Mutation in der 3' nichttranslatierten Genregion führt zu erhöhter mRNA-Synthese und zum Anstieg des Prothrombinspiegels im Plasma, der wiederum zu gesteigerter Thrombinaktivität und folglich zu verstärkter Bildung von Fibringerinnsel führt. Heterozygote FV Leiden Träger haben ein um 5- bis 10-fach erhöhtes Risiko für Venenthrombosen, und homozygote Träger ein 50- bis 100-faches Risiko im Vergleich zu Nichtträgern. Heterozygote PTH 20210G>A Träger sind einem 3-fach höheren und homozygote Träger einem bis zu 20-fach höheren Risiko ausgesetzt als Nichtträger. Personen mit beiden Mutationen oder mit weiteren Risikofaktoren, wie z.B. andere genetische Prädispositionen, Übergewicht, Bluthochdruck, Diabetes Typ 2, Rauchen oder Einnahme oraler Kontrazeptiva, weisen ein zusätzliches Risiko auf.

3. Kit Bestandteile 100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx **Probe Mix** 1 Vial weisser Deckel 1000 / 320µl
FV-PTH mpx **Assay Mix** 1 Vial violetter Deckel 550 / 550µl
FV-PTH mpx **WT-Control** 1 Vial grüner Deckel 75 / 75µl
FV-PTH mpx **MUT-Control** 1 Vial roter Deckel 75 / 75µl

Der RealFast™ 2x mpx Probe Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der FV-PTH mpx Assay Mix besteht aus F5- und F2-genspezifischen Primern und vier allelspezifischen, doppelt-markierten Hydrolysesonden. Weiters sind Kontrolltemplates für den normalen (WT-Control) und homozygot mutierten (MUT-Control) Genotyp im Kit vorhanden.

Der Kit beinhaltet Reagenzien für 100 / 32 Reaktionen mit je 20 µl Endvolumen.

4. Lagerung und Stabilität

Der FV-PTH mpx RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°C. Alternativ bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2-8°C. Die Reagenzien überdauern ohne Aktivitätsverlust bis zu 20 Einfrier-/Auftauzyklen. Vermeiden Sie längere Exposition gegenüber direktem Licht. Bei korrekter Lagerung behält der Kit seine volle Funktionsfähigkeit bis zum angegebenen Ablaufdatum.

5. Produktbeschreibung

5.1. Testprinzip

Der Test basiert auf dem fluorogenen 5'-Nuklease-Assay, bekannt auch als TaqMan®-Assay. Jede Reaktion enthält zwei genspezifische Primerpaare zur Amplifizierung eines 142 bp Fragments im F5 Gen und eines 110 bp Fragments im F2 Gen, sowie vier doppelt-markierte, allelspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz der amplifizierten Fragmente binden. Die unmittelbare Nähe von 5'-Fluoreszenzreporter und 3'-Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz der intakten Sonde. Während des Extensionsschrittes der PCR spaltet die 5' – 3' Exonuklease Aktivität der Taq DNA-Polymerase den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher verursacht in Echtzeit ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

In normalen Proben erzeugen die **Wildtyp-Sonden** ein starkes Fluoreszenzsignal im HEX- oder Cy5-Kanal und kein oder an der Basislinie liegendes Signal im FAM- oder ROX-Kanal. Im Fall von homozygot mutierten Proben erzeugen die **Mutanten-Sonden** ein starkes Signal im FAM- oder ROX-Kanal, und kein oder an der Basislinie liegendes Signal im HEX- oder Cy5-Kanal. Bei heterozygoten Proben binden beide Wildtyp- und Mutanten-Sonden an die Amplikons und verursachen ein intermediäres Signal in den entsprechenden Detektionskanälen.

Hydrolysesonde	Fluorophor	Kanal
FV Mutante	FAM	520 nm
FV Wildtyp	HEX	556 nm
PTH Mutante	ROX	605 nm
PTH Wildtyp	Cy5	670 nm

5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der FV-PTH mpx RealFast™ Assay ist für die Verwendung mit verschiedenen handelsüblichen real-time PCR Geräten, die FAM-, HEX-, Cy5- und ROX-Fluoreszenz detektieren können, validiert:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Anmerkung:** RealFast™ Genotyping QuickGuides zur Programmierung und Auswertung von Assays auf verschiedenen Geräten sind als Download verfügbar: www.viennalab.com. «

Der Kit **eignet sich nicht** für die Verwendung mit real-time PCR Geräten, die ROX zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 39 positiven FV Leiden Allelen und 37 positiven PTH 20210G>A Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der FV-PTH mpx RealFast™ Assay typisierte alle positiven Allele richtig = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 235 negativen FV Leiden Allelen und 247 negativen PTH 20210G>A Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest getestet wurden, bestimmt. Der FV-PTH mpx RealFast™ Assay typisierte alle negativen Allele richtig = 100% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 0.2 ng genomische DNA (pro Reaktion). Empfohlene DNA Konzentration: 2 bis 20 ng/µl genomische DNA.

6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM-(520 nm), HEX-(556 nm), ROX-(610 nm) and Cy5-(660nm) Filter, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionssystem, Kühl- oder Gefrierschrank, Abfallbehälter.

7. Arbeitsanleitung

7.1. DNA Extraktion

DNA Extraktionsreagenzien sind **nicht im Kit** enthalten.

Es kann DNA aus verschiedenen Proben (z.B. Vollblut, Blutkärtchen, Wangenabstriche oder Speichel) verwendet werden. Gereinigte DNA muss für die Amplifizierung in hochmolekularer Form sowie in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen.

Für eine zuverlässige Genotypisierung sollte die DNA Menge pro Reaktion für alle Proben zwischen 10 und 100 ng liegen.

7.2. PCR Kontrollen

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** eine **No Template Control (NTC)** zur Kontrolle potentieller Kontaminationen mit ein. Es ist empfehlenswert die NTC (hochreines Wasser anstelle von DNA) als Duplikat einzusetzen.

Führen Sie in jedem Lauf **immer** die FV-PTH mpx **WT-Control** und FV-PTH mpx **MUT-Control** als Referenzsignale für unbekannte Proben durch. Einige real-time PCR Programme, beispielsweise für AB 7500 Fast, erfordern zur korrekten Auswertung im "Allelic Discrimination Plot" Signale für alle drei möglichen Genotypen. Zur Herstellung einer heterozygoten Kontrolle (HET-Control) mischen Sie ein Aliquot von WT-Control und MUT-Control im Verhältnis 1:1.

» **Anmerkung:** WT- und MUT-Controls stellen potentielle Kontaminationsquellen dar und müssen daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

7.3. Vorbereitung des FV-PTH mpx RealFast™ Master Mixes

Alle Lösungen komplett auftauen, vorsichtig mischen und kurz abzentrifugieren. Das Ansetzen der PCR erfolgt bei Raumtemperatur. Bereiten Sie ausreichend **Master-Mix** für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze (N Proben + Positivkontrollen + Negativkontrollen) vor, und berechnen Sie mindestens eine zusätzliche Reaktion ein um Pipettiergenauigkeiten auszugleichen:

Komponente	pro Reaktion	z.B. 24+1 Reaktionen
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	5 µl	125 µl
Master-Mix	15 µl	375 µl

Legen Sie **15 µl Master-Mix** in jedes Gefäß vor. Pipettieren Sie **5 µl** gereinigte **DNA** oder **Control** Template dazu um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen.

Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos pipettieren Sie die Proben in dieser Reihenfolge: Zuerst NTC, danach Ihre Proben, zuletzt die Positivkontrollen. Reaktionsgefäße sofort verschließen.

» **Anmerkung:** Vermeiden Sie Luftblasen im PCR-Ansatz und Fingerabdrücke auf den optischen Oberflächen der Reaktionsgefäße. Beides kann die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen. Wenn nötig kurz zentrifugieren. «

7.4. PCR Programm

Programmieren Sie Ihr real-time PCR Gerät wie vom Hersteller angegeben für "Allelic Discrimination" oder "Genotyping" Experimente. Stellen Sie die PCR-Ansätze in den Thermocycler und starten Sie folgendes Programm.

Programm			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, und andere Peltier-Heizblock- basierende Geräte	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Zyklen	Temp	Zeit	Schritt	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung	Denaturierung
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Datenaufnahme im FAM-, HEX-, ROX- und Cy5-Kanal	Annealing/Extension – Datenaufnahme im Green-, Yellow-, Orange- und Red-Kanal

8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Der Genotyp einer Probe wird aufgrund des Signalverhältnisses zwischen den Aufnahmekanälen berechnet. Dabei wird das im **HEX-** oder **Cy5-Kanal (normal)** detektierte Signal mit dem im **FAM-** oder **ROX-Kanal (mutiert)** detektierten Signal verglichen. Die meisten real-time PCR Auswertprogramme stellen die Daten zweier Kanäle automatisch als Streudiagramm (Scatterplot) dar. Datenpunkte entlang der X- bzw. Y-Achsen entsprechen normalen bzw. homozygot mutierten Genotypen, während Datenpunkte in der Mitte des Scatterplots heterozygoten Genotypen entsprechen. Die NTC erscheint links unten.

Kontrollen / Proben	Amplifikation pro Kanal				Genotyp FV / PTH
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NEIN	JA	NEIN	JA	normal FV / normal PTH
mpx HET-Control	JA	JA	JA	JA	heterozygot FV / heterozygot PTH
mpx MUT-Control	JA	NEIN	JA	NEIN	homozygot mutiert FV / homozygot mutiert PTH
NTC	NEIN	NEIN	NEIN	NEIN	----
Probe 1	JA	JA	NEIN	JA	heterozygot FV / normal PTH
Probe 2	JA	NEIN	NEIN	JA	homozygot mutiert FV / normal PTH
Probe 3	NEIN	JA	JA	JA	normal FV / heterozygot PTH
Probe 4	NEIN	JA	JA	NEIN	normal FV / homozygot mutiert PTH

Einige Auswertprogramme benötigen manuell gesetzte Schwellenwerte (Threshold) zur korrekten Genotypisierung.

Empfehlungen zur Einstellung des Schwellenwertes (C_q):

Setzen Sie den Schwellenwert für den FAM- und ROX-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der WT-Control (HEX-/Cy5-positiv). Setzen Sie umgekehrt den Schwellenwert für den HEX- und Cy5-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der MUT-Control (FAM-/ROX- positiv). Proben, die den Schwellenwert nach C_q 37 übersteigen, gelten als ungültiges Resultat und müssen wiederholt werden.

Folgen Sie der Anleitung Ihres real-time PCR Auswertprogrammes um die gewonnenen Daten zu analysieren.

9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Kit ist ausschließlich für *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Tragen Sie beim Handieren der Proben und Reagenzien immer puderfreie Einweghandschuhe und geeignete Laborkleidung.
- Bereiche für die DNA Extraktion und den Ansatz des PCR Mastermixes sollten räumlich streng getrennt sein.
- Benützen Sie ein eigenes Pipettenset nur für den PCR-Ansatz und verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolfilter.
- Benützen Sie ausschließlich dünnwandige, gerätekompabile PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.

FV-PTH mpx RealFast™ Assay

REF 7-115 / 7-118 100 / 32 réactions
-30°C / -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

info@viennalab.com

www.viennalab.com

1. Utilisation

Le FV-PTH mpx RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter simultanément les deux plus importantes mutations pour la thrombophilie. La mutation 1691G>A dans le gène *facteur 5 (F5)*, aussi connue sous le nom de facteur V de Leiden et la mutation 20210G>A de la prothrombine (PTH) dans le gène *facteur 2 (F2)* représentent des facteurs de risque génétique pour la thrombophilie héréditaire. Ce kit permet de tester et d'identifier les patients qui présentent un risque élevé de dysfonctionnements thrombotiques. Ce test qualitatif permet de distinguer un des trois génotypes possibles dans un extrait d'ADN: normal, hétérozygote ou homozygote muté. Séquence de référence: FV: NG_011806.1 g.41721G>A; dbSNP: rs6025 / PTH: NG_008953.1 g.25313G>A; dbSNP: rs1799963.

2. Introduction

Le FV et la PTH sont les principaux composants de la cascade des facteurs de coagulation sanguine. La mutation FV de Leiden engendre un échange d'acides aminés en position 506 (R506Q), cette mutation modifie l'intersection et empêche ainsi une inactivation efficace du FV. La persistance de l'activité du FV augmente le risque de formation de caillots sanguins dans les veines. La mutation 20210G>A dans la région non traduite du gène 3' entraîne une augmentation de la synthèse de l'ARNm et une prolifération des prothrombines dans le plasma, ce qui entraîne une augmentation de l'activité thrombotique et, par conséquent, une formation accrue de caillots de fibrine. Le risque de thrombose veineuse est 5 à 10 fois plus élevé chez les porteurs hétérozygotes de FV de Leiden et 50 à 100 fois plus élevé chez les porteurs homozygotes que chez les non-porteurs. Les porteurs hétérozygotes PTH 20210G>A sont exposés à un risque 3 fois plus élevé que les non porteurs et les porteurs homozygotes encourent un risque jusqu'à 20 fois plus élevé. Les personnes présentant les deux mutations ou d'autres facteurs de risque, comme d'autres prédispositions génétiques telles l'obésité, l'hypertension, le diabète de type 2, le tabagisme ou les contraceptifs oraux, présentent un risque supplémentaire.

3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 Vial		couvercle blanc	1000 / 320 µl
FV-PTH Assay Mix	1 Vial		couvercle violet	550 / 550 µl
FV-PTH WT-Control	1 Vial		couvercle vert	75 / 75 µl
FV-PTH MUT-Control	1 Vial		couvercle rouge	75 / 75 µl

Le RealFast™ 2x mpx Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymerase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le FV-PTH mpx Assay Mix se compose de primers génospécifiques *F5*- et *F2*- tout comme de quatre sondes d'hydrolyse spécifique d'allèle. De plus vous disposez dans le kit de témoins pour le génotype normal (WT-Control) et le génotype homozygote muté (MUT-Control).

Le kit comprend des réactifs pour 100 / 32 réactions de chacune d'un volume final de 20 µl.

4. Stockage et stabilité

Le FV-PTH mpx RealFast™ Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception de -30 à -15°C. Ou bien si vous l'utilisez à court terme en l'espace d'un mois, conservez-le de 2 à 8°C. Les réactifs perdurent sans perdre leur activité jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation. Evitez les expositions prolongées à la lumière directe. Stocké de manière correcte, le kit conserve toute sa fonctionnalité jusqu'à la date de péremption indiquée.

5. Description du produit

5.1. Principe du test

Le test repose sur un test fluorogène à la nucléase 5', connu aussi sous le nom de TaqMan®-Assay. Chaque réaction contient une paire de primers génospécifiques qui amplifie un fragment 142 bp dans le gène *F5* et un fragment 110 bp du gène *F2*, tout comme quatre sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques, munies d'un marqueur double, qui s'hybride à la séquence cible des fragments amplifiés.

La proximité directe entre les indicateurs fluorescents 5' et les colorants 3' sur une sonde intacte inhibe la fluorescence. Au cours de la PCR l'activité exonucléase 5' – 3' de la polymérase ADN Taq clive l'indicateur fluorescent 5' de l'échantillon hybridisé. La séparation spatiale du fluorophore du quencher provoque un signal fluorescent en temps réel, qui est proportionnel à la quantité du produit de la PCR.

Sonde hydrolyse	Fluorophore	Canal
FV Mutante	FAM	520 nm
FV Type sauvage	HEX	556 nm
PTH Mutante	ROX	605 nm
PTH Type sauvage	Cy5	670 nm

Dans les échantillons normaux, les **sondes de type sauvage** affichent un fort signal fluorescent dans le canal HEX ou Cy5 et aucun ou un signal moins fort sur la ligne de base dans le canal FAM ou ROX. Inversement, dans des échantillons mutés homozygotes, les **sondes mutantes** affichent un signal fluorescent fort dans le canal FAM ou ROX et aucun ou un signal plus faible sur la ligne de base dans le canal HEX ou Cy5. Pour les échantillons hétérozygotes, les deux sondes se lient aux amplicons et génèrent un signal intermédiaire dans les deux canaux de détection.

5.2. Compatibilité avec les machines de la PCR temps réel

Le FV-PTH mpx RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec différents appareils standards du commerce de la PCR en temps réel capables de détecter la fluorescence FAM, HEX, Cy5 et ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Remarque:** RealFast™ Genotyping QuickGuides pour la programmation et l'exploitation des RealFast™ Assays sur différents types d'appareils peuvent être téléchargées à partir de: www.viennalab.com. «

Le kit **ne convient pas** à une utilisation sur des appareils de la PCR en temps réel, qui nécessitent ROX pour normaliser les données (par ex. appareils Applied Biosystems: StepOne, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 39 allèles et de 37 allèles, qui ont été testés positifs respectivement à la mutation FV de Leiden et à la mutation PTH 20210G>A à partir d'un test de référence certifié CE. Le FV-PTH mpx RealFast™ Assay a typé positifs tous les allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La **spécificité** a été déterminée à partir de 235 allèles, qui ont été testés négatifs à la mutation FV Leiden et de 247 allèles qui ont été testés négatifs à la mutation PTH 20210G>A. Le FV-PTH mpx RealFast™ Assay a typé négatifs tous les allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais négatifs de 100%.

Limite de détection: 0.2 ng ADN génomique (par réaction). Concentration d'ADN recommandée: 2 à 20 ng/µl ADN génomique

6. Matériel nécessaire, mais non fourni

Appareil de la PCR en temps réel avec des filtres FAM (520 nm) et HEX (556 nm), ROX (605 nm) et Cy5 (670nm), des tubes PCR optiques compatibles avec l'appareil, gants non-poudrés à usage unique, vortexer, minicentrifugeuse pour des tubes de 2.0 ml, racks pour tubes, set de micropipettes calibrées (0.5 – 1000 µl), des pointes de pipettes stériles avec des filtres aérosol, eau ultrapure, système d'extraction d'ADN, réfrigérateur et congélateur, contenant pour déchets biomédicaux.

7. Procédure

7.1. Extraction de l'ADN

Les réactifs d'extraction d'ADN ne sont **pas inclus dans le kit**.

L'ADN isolé à partir de différents échantillons (par ex. sang total, gouttes de sang séché, frottement à l'intérieur de la joue ou salive) peut être utilisé. L'extrait d'ADN doit bien sûr convenir à une amplification en terme de concentration, de pureté et d'intégrité.

Pour réaliser un génotypage fiable, la quantité d'ADN pour chaque réaction doit se situer dans une fourchette de 10 à 100 ng pour tous les échantillons.

7.2. Contrôle de la PCR

Incluez **toujours** un **No Template Control** (NTC) dans chaque test pour contrôler la présence d'éventuelles contaminations. Il est recommandé d'effectuer les NTC (utilisez une eau ultrapure à la place de l'ADN) comme duplicat.

Effectuez **toujours** le FV-PTH mpx **WT-Control** et le FV-PTH mpx **MUT-Control** pour chaque test comme signaux de référence pour des échantillons inconnus. Certains logiciels de la PCR en temps réel, comme par ex. AB 7500 Fast, nécessitent pour interpréter correctement les résultats des signaux pour l'ensemble des trois génotypes possibles dans la "Allelic Discrimination Plot". Pour réaliser un contrôle hétérozygote (HET-Control) mélangez une aliquote du WT-Control et du MUT-Control dans un rapport 1:1.

» **Remarque:** les WT- et MUT-Controls représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin. «

7.3. Préparation du FV-PTH mpx RealFast™ Master Mix:

Décongelez complètement toutes les solutions, centrifugez-les brièvement après les avoir mélangées avec précaution. La réalisation de la PCR s'effectue à température ambiante. Préparez suffisamment de **Master-Mix** pour le nombre total d'amorces PCR prévues (N échantillons + contrôles positifs + contrôles négatifs) et calculez en plus au moins une réaction supplémentaire pour compenser une imprécision de pipetage :

Composants	Par réaction	Par ex. 24+1 réactions
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Mettez **15 µl de Master Mix** dans chaque godet. Pipetez et ajoutez **5 µl d'ADN** ou de **Control Template** pour obtenir un volume final de 20 µl.

Pour minimiser les risques de contaminations, pipetez les échantillons dans cet ordre : premièrement NTC, ensuite les échantillons, et finalement les contrôles positifs. Fermez immédiatement les récipients de réaction.

» **Remarque :** évitez les bulles d'air dans les mélanges finaux de réaction et les empreintes digitales sur les surfaces optiques des récipients de réaction qui peuvent toutes les deux altérer la mesure de la fluorescence. Centrifugez si nécessaire. «

7.4. Programme de la PCR

Programmez la machine PCR en temps réel comme indiqué par le fabricant pour les expériences de discrimination allélique ou de génotypage. Mettez les échantillons PCR dans le thermocycleur et lancez le programme suivant:

Programme			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, et autres appareils reposant sur le bloc thermique Peltier	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Cycles	Temp.	Durée	Étape	Étape
1	95°C	3 min	Dénaturation initiale	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation	Dénaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension – Réception des données dans le canal FAM, HEX, ROX et Cy5	Annealing/Extension – Réception des données dans le canal respectif: Green, Yellow, Orange et Red

8. Analyse des données / interprétation des résultats

Le génotype d'un échantillon est déterminé à partir du rapport de signal entre les canaux de réception. Le signal détecté dans le **canal HEX** ou **Cy5 (normal)** est pour ce faire comparé au signal détecté dans le **canal FAM** ou **ROX (muté)**. La plupart des programmes d'évaluation PCR en temps réel représentent automatiquement les données issues des deux canaux sous forme d'un nuage de points. Les points de données se situant le long des axiales X- à savoir Y correspondent au génotype normal, à savoir homozygote muté, tandis que les points de données situés au milieu du nuage de points correspondent au génotype hétérozygote. La NTC apparait en bas à gauche.

Contrôles / Échantillons	Amplification par canal				Génotype FV / PTH
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NON	OUI	NON	OUI	normal FV / normal PTH
mpx HET-Control	OUI	OUI	OUI	OUI	hétérozygote FV / hétérozygote PTH
mpx MUT-Control	OUI	NON	OUI	NON	homozygote muté FV / homozygote muté PTH
NTC	NON	NON	NON	NON	----
Échantillon 1	OUI	OUI	NON	OUI	hétérozygote FV / normal PTH
Échantillon 2	OUI	NEIN	NON	OUI	homozygote muté FV / normal PTH
Échantillon 3	NON	OUI	OUI	OUI	normal FV / hétérozygote PTH
Échantillon 4	NON	OUI	OUI	NON	normal FV / homozygote muté PTH

Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil pour effectuer le génotypage correctement.

Recommandations pour le réglage de la valeur seuil (C_q):

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM ou ROX juste au-dessus du signal fluorescent de fond généré par le contrôle WT (HEX/Cy5 positif). Fixez à l'inverse la valeur seuil pour le canal HEX et Cy5 juste au-dessus du signal fluorescent de fond du contrôle MUT (FAM/ROX positif). Les échantillons dépassant le seuil C_q 37 sont considérés comme erronés et doivent être repris.

Suivez les instructions de votre logiciel d'évaluation de la PCR en temps réel, pour analyser les données que vous avez obtenues.

9. Mises en garde et précautions

- Le kit est à utiliser uniquement pour des diagnostics *in vitro*.
- Pour manipuler les échantillons et les réactifs, mettez toujours des gants poudrés à usage unique et des vêtements de laboratoire appropriés.
- Effectuez l'extraction de l'ADN dans un endroit strictement séparé de celui où vous réalisez la préparation de la PCR.
- Utilisez un jeu de pipettes uniquement destiné à la préparation de la PCR et utilisez des pointes de pipettes avec un filtre aérosol.
- Utilisez uniquement des récipients PCR compatibles avec la machine, aux parois fines, avec un couvercle approprié à faire des mesures optiques.
- Ne mélangez pas de réactifs avec différents numéros de lot.
- N'utilisez pas de kits et de composants de kit périmés.

FV-PTH mpx RealFast™ Assay

REF 7-115 / 7-118 100 / 32 reazioni
-30°C -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
info@viennalab.com
www.viennalab.com

1. Utilizzo

L'FV-PTH mpx RealFast™ Assay è un test multiplex in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR test per la rilevazione simultanea delle due mutazioni trombofiliche più importanti. La mutazione puntiforme 1691G>A nel gene per la coagulazione umana *Fattore V (F5)*, noto come FV Leiden, e la mutazione (PTH) 20210G>A della protrombina nel gene *Fattore II (F2)* sono associate alla trombofilia ereditaria. Il kit è progettato per testare i pazienti con maggiore predisposizione ai disturbi trombolitici. L'esame qualitativo discrimina i tre possibili genotipi per ciascuna delle mutazioni del DNA genomico umano: normale, eterozigote od omozigote mutante.

Sequenza di riferimento: FV: NG_011806.1 g.41721G>A; dbSNP: rs6025 / PTH: NG_008953.1 g.25313G>A; NCBI dbSNP: rs1799963.

2. Introduzione

L'FV e il PTH svolgono un ruolo importante nella cascata della coagulazione. La mutazione FV Leiden provoca un singolo scambio di aminoacidi alla posizione 506 (R506Q), che altera un sito di clivaggio impedendo, di conseguenza, un'efficace inattivazione del Fattore V. Una persistente attività del Fattore V aumenta il rischio di formazioni di trombi nelle vene. La mutazione PTH 20210G>A nella regione 3' non tradotta comporta una maggiore sintesi di mRNA e livelli plasmatici della protrombina più elevati, che a loro volta inducono un'alta generazione di trombina e, di conseguenza, un'eccessiva formazione di coaguli di fibrina. I portatori di FV Leiden eterozigoti corrono un rischio da 5 a 10 volte maggiore di sviluppare trombosi venosa, mentre per i portatori omozigoti il rischio è da 50 a 100 volte superiore rispetto ai non portatori. I portatori di PTH 20210G>A eterozigoti sono esposti a un rischio tre volte maggiore rispetto ai non portatori, mentre il rischio è 20 volte superiore per i portatori omozigoti. I soggetti con ulteriori fattori di rischio, come la presenza di altre mutazioni trombofiliche, obesità, ipertensione, diabete di tipo 2, il fumo o l'assunzione di anticoncezionali orali, sono ancor più predisposti all'insorgenza di eventi trombotici venosi.

3. Contenuto del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 fiala □ tappo bianco	1000 / 320 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	1 fiala ■ tappo viola	550 / 550 µl
FV-PTH mpx WT-Control	1 fiala ■ tappo verde	75 / 75 µl
FV-PTH mpx MUT-Control	1 fiala ■ tappo rosso	75 / 75 µl

Il RealFast™ 2x mpx Probe Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTPs in un sistema tampone ottimizzato. L'FV-PTH mpx Assay Mix consiste di primer specifici per i geni *F5* ed *F2* nonché quattro sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta. Insieme al kit sono forniti controlli che rappresentano i genotipi di tipo selvatico (WT-Control) e di tipo omozigote mutante (MUT-Control).

Il kit contiene reagenti per 100 / 32 reazioni in un volume finale di 20 µl ciascuno.

4. Conservazione e stabilità

L'FV-PTH mpx RealFast™ Assay viene inviato su blocchi refrigeranti. Al suo arrivo, conservare il kit da -30 a -15°C. In alternativa, il kit può essere conservato a una temperatura tra i 2 e gli 8°C per un uso a breve termine entro un mese. Il kit sopporta fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza perdita di attività. Evitare un'esposizione prolungata a luce intensa. Se conservato in modo adeguato, il kit manterrà piena attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

5. Descrizione del prodotto

5.1. Principio del Test

Il test è basato sul saggio fluorogenico della 5' nucleasi, anche denominato TaqMan® -Assay. Ciascuna reazione contiene due coppie di primer gene-specifici che amplificano un frammento di 142 bp del gene *F5* e un frammento di 110 bp del gene *F2*, e quattro sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta che ibridano con le sequenze target dei frammenti amplificati. La prossimità del reporter fluorescente in 5' e del quencher colorante in 3' sulle sonde intatte induce la soppressione della fluorescenza del reporter. Durante la fase di estensione della PCR, l'attività 5' – 3' esonucleasica della Taq DNA polimerasi cliva il reporter fluorescente in 5' dalla sonda ibridata. La separazione fisica del fluoroforo dal quencher colorante genera un segnale fluorescente in tempo reale, che è proporzionale al prodotto della PCR accumulato.

Sonda di idrolisi	Fluoroforo	Canale
FV mutante	FAM	520 nm
FV di tipo selvatico	HEX	556 nm
PTH mutante	ROX	605 nm
PTH di tipo selvatico	Cy5	670 nm

Nei campioni normali le **sonde di tipo selvatico** generano un forte segnale di fluorescenza nel canale HEX o Cy5 e nessun segnale o soltanto un segnale di base nel canale FAM o ROX. Viceversa, nei campioni mutanti omozigoti le **sonde mutanti** ibridate generano un forte segnale di fluorescenza nel canale FAM o ROX e nessun segnale o soltanto un segnale di base nel canale HEX o Cy5. Nei campioni eterozigoti le sonde sia di tipo selvatico che mutante si legano agli ampliconi, generando segnali intermedi nei rispettivi canali.

5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

L'FV-PTH mpx RealFast™ Assay è stato validato per l'uso con vari strumenti comuni Real-time PCR in grado di registrare la fluorescenza FAM, HEX, Cy5 e ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

»Nota: Le RealFast™ Genotyping QuickGuide per l'allestimento e l'analisi di esperimenti su strumenti di tipo diverso possono essere scaricate dal sito www.viennalab.com. «

Il kit **non è idoneo** all'uso con strumenti Real-time PCR che richiedano il ROX per la normalizzazione dei dati (per es. strumenti Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT) o per strumenti privi di adeguati canali di rilevazione della fluorescenza.

5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 39 alleli risultati positivi per FV Leiden e 37 alleli risultati positivi per PTH 20210G>A, entrambi testati con kit di riferimento marchiato CE. L'FV-PTH mpx RealFast™ Assay ha determinato correttamente la positività di tutti gli alleli, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 235 alleli risultati negativi per FV Leiden e 247 alleli risultati negativi per PTH 20210G>A, entrambi testati con kit di riferimento marchiato CE. L'FV-PTH mpx RealFast™ Assay ha determinato correttamente la negatività di tutti gli alleli negativi, con una percentuale di veri negativi pari al 100%.

Limite di rilevazione: 0.2 ng di DNA genomico (per reazione). Concentrazione di DNA raccomandata: da 2 a 20 ng/µl di DNA genomico.

6. Materiali richiesti ma non forniti

Strumento Real-time PCR con filtri FAM (520 nm) HEX (556 nm), ROX (605 nm) e Cy5 (670 nm), contenitori di reazione compatibili con lo strumento, guanti monouso senza polvere, vortex, minicentrifuga per provette da 2.0 ml, portaprovette, set di micropipette calibrate (0.5 – 1000 µl), punte sterili con filtro barriera antiaerosol, acqua di grado molecolare, sistema per l'estrazione del DNA, congelatore, contenitore per rifiuti biologici.

7. Protocollo sperimentale

7.1. Estrazione del DNA

I reagenti per l'estrazione del DNA **non sono forniti** con il kit.

E' possibile utilizzare DNA isolato da campioni diversi (per es. sangue periferico intero, campioni di sangue secco, tamponi orali o saliva). Accertarsi che il DNA estratto sia idoneo per l'amplificazione dal punto di vista della concentrazione, della purezza e dell'integrità. Per un'accurata determinazione dei genotipi, la quantità di DNA per reazione dev'essere compresa tra 10 e 100 ng per tutti i campioni.

7.2. Controlli della PCR

Includere **sempre** un **No Template Control (NTC)** in ciascun esperimento per confermare l'assenza di potenziali contaminazioni. E' consigliabile condurre l'NTC in duplicato (utilizzare acqua di grado PCR invece di DNA).

Includere **sempre** l'FV **WT-Control** e l'FV **MUT-Control** come segnali di riferimento positivi per i vostri campioni non noti.

Alcuni software Real-time PCR, per es. l'AB 7500 Fast, richiedono segnali per tutti e tre i possibili genotipi per una corretta discriminazione allelica. Allo scopo di ottenere un controllo eterozigote (HET-Control), miscelare un'aliquota di WT-Control e di MUT-Control in un rapporto 1:1.

» **Nota:** I WT- e MUT-Controls costituiscono potenziali fonti di contaminazione. Assicuratevi di maneggiarli con cautela. «

7.3. Preparazione dell'FV-PTH mpx RealFast™ Master Mix

Una volta scongelate, vortexare leggermente e centrifugare brevemente tutte le soluzioni. Allestire la PCR a temperatura ambiente. Preparare una quantità di **Master Mix** che sia sufficiente per tutte le reazioni (N campioni + controlli positivi + controlli negativi) nonché almeno una reazione aggiuntiva per rimediare a eventuali imprecisioni nel pipettaggio:

Componente	per reazione	per es. 24+1 reazioni
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Dispensare **15 µl** di **Master Mix** in ciascun pozzetto. Aggiungere **5 µl** di **DNA** purificato o di **Control** template per ottenere un volume di reazione finale di 20 µl.

Minimizzare il rischio di contaminazione, pipettare sempre i template nel seguente ordine: prima l'NTC, quindi i campioni e, per ultimi, i controlli positivi. Chiudere immediatamente i contenitori di reazione.

» **Nota:** Evitare la creazione di bolle nel mix di reazione finale ed evitare di toccare la superficie ottica del tappo o la pellicola sigillante senza guanti. Entrambi possono interferire con le misurazioni della fluorescenza. Centrifugare brevemente se necessario. «

7.4. Programma della PCR

Programmare lo strumento Real-time PCR secondo le istruzioni del fabbricante per gli esperimenti di discriminazione allelica / genotipizzazione. Collocare i campioni nel termociclatore e svolgere il seguente programma:

Programma			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, e altri strumenti Peltier basati su blocco di riscaldamento	MIC, Rotor-Gene® 6000 (rotore a 36 e 72 pozzetti)
Cicli	Temp	Tempo	Step	Step
1	95°C	3 min	Denaturazione iniziale	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione	Denaturazione
	60°C	1 min	Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nei canali FAM, HEX, ROX e Cy5	Annealing/Estensione – Acquisizione dei dati nei canali Green, Yellow, Orange e Red

8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

Il genotipo di ciascun campione si determina calcolando il rapporto tra i segnali registrati nel **canale HEX o Cy5 (normale)** e i segnali registrati nel **canale FAM o ROX (mutante)**. La maggior parte dei software Real-time PCR risolve automaticamente i dati di entrambi i canali in 'cluster' in un grafico a dispersione. I punti dati rappresentati sull'asse delle ascisse e sull'asse delle ordinate corrispondono, rispettivamente, a genotipi normali e omozigoti mutanti. I punti dati raggruppati in 'cluster' al centro del grafico rappresentano i genotipi eterozigoti. L'NTC compare nell'angolo sinistro in basso.

Controlli / Campioni	Amplificazione nel canale				Genotipo FV / PTH
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NO	SI	NO	SI	FV normale / PTH normale
mpx HET-Control	SI	SI	SI	SI	FV eterozigote / PTH eterozigote
mpx MUT-Control	SI	NO	SI	NO	FV omozigote mutante / PTH omozigote mutante
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Campione 1	SI	SI	NO	SI	FV eterozigote / PTH normale
Campione 2	SI	NO	NO	SI	FV omozigote mutante / PTH normale
Campione 3	NO	SI	SI	SI	FV normale / PTH eterozigote
Campione 4	NO	SI	SI	NO	FV normale / PTH omozigote mutante

Alcuni software dello strumento richiedono l'impostazione manuale dei valori soglia ai fini di un'accurata determinazione dei genotipi.

Raccomandazioni per l'impostazione dei valori soglia (C_q):

Impostare la soglia per i canali FAM e ROX immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal WT-Control (HEX-/Cy5-positivo). Viceversa, impostare la soglia per il canale HEX e Cy5 immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal MUT-Control (FAM-/ROX-positivo).

I campioni che superano la soglia C_q 37 non danno risultati validi e vanno ripetuti.

Per l'analisi dei dati acquisiti, seguire le istruzioni del software dello strumento.

9. Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Indossare sempre guanti monouso senza polvere e un camice da laboratorio appropriato quando si maneggiano campioni e reagenti.
- Allestire la reazione in un'area separata da quella della preparazione dell'acido nucleico e dell'analisi del prodotto della PCR.
- Utilizzare pipette dedicate soltanto all'allestimento della PCR, avvalersi di punte per pipette provviste di barriera antiaerosol.
- Utilizzare contenitori di reazione compatibili con lo strumento provvisti di tappi otticamente trasparenti o di pellicole sigillanti.
- Non mescolare reagenti di lotti diversi.
- Non utilizzare kit, o componenti di kit, scaduti.

FV-PTH mpx RealFast™ Assay

ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
info@viennialab.com
www.viennialab.com

REF 7-115 / 7-118 100 / 32 reacciones
-30°C -15°C CE IVD



1. Aplicación

FV-PTH mpx RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección simultánea de las dos mutaciones más importantes causantes de la trombofilia. La mutación puntual conocida como FV Leiden 1691G>A en el gen del *factor V humano (F5)* y la mutación de la protrombina (PTH) 20210G>A en el gen del *factor II humano (F2)* son factores de riesgo asociados a la trombofilia hereditaria. El kit está diseñado para evaluar a los pacientes sospechosos de tener un mayor riesgo de trastornos trombóticos. El ensayo cualitativo detecta uno de los tres genotipos posibles en el ADN genómico humano para cada mutación: normal, heterocigoto u homocigoto mutante. Secuencia de referencia: FV: NG_011806.1 g.41721G>A; dbSNP: rs6025 / PTH: NG_008953.1 g.25313G>A; dbSNP: rs1799963.

2. Introducción

FV y PTH son los principales componentes en la cascada de factores de coagulación sanguínea. La mutación de FV Leiden causa una sustitución de aminoácido en la posición 506 (R506Q), que altera la interfaz, evitando así una eficiente inactivación del FV. La actividad continuada de FV aumenta el riesgo de coágulos de sangre en las venas. La mutación 20210G>A en la región del gen 3' no traducida conduce a una síntesis de ARNm aumentada y al aumento de los niveles de protrombina en plasma, lo que a su vez conduce a una mayor actividad de trombina y en consecuencia a una mayor formación de coágulos de fibrina. Los pacientes con FV heterocigotos tienen un riesgo de 5 a 10 veces mayor de sufrir una trombosis venosa y los portadores homocigotos tienen un riesgo 50 a 100 veces mayor que en comparación con los no portadores. Los portadores heterocigotos PTH 20210G>A tienen 3 veces más probabilidades y los portadores homocigotos 20 veces más de estar en riesgo que los no portadores. Personas con ambas mutaciones o con otros factores de riesgo, como p.ej. otras predisposiciones genéticas, obesidad, hipertensión, diabetes tipo 2, fumar o tomar anticonceptivos orales tienen un riesgo adicional.

3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 vial □ tapón blanco	1000 / 320 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	1 vial ■ tapón violeta	550 / 550 µl
FV-PTH mpx WT-Control	1 vial ■ tapón verde	75 / 75 µl
FV-PTH mpx MUT-Control	1 vial ■ tapón rojo	75 / 75 µl

RealFast™ 2x mpx Probe Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer. El FV-PTH mpx Assay Mix consta de primers específicos del gen *F5* y *F2* y cuatro sondas de hidrólisis doblemente marcadas específicas de alelo. Además, hay plantillas de control para el genotipo normal (WT-Control) y homocigoto mutado (MUT-Control) en el kit.

El kit contiene reactivos para 100 / 32 reacciones con cada 20 µl de volumen final.

4. Almacenamiento y estabilidad

FV-PTH mpx RealFast™ Assay se suministra sobre bloques de enfriamiento. Conserve el kit de -30 a -15°C después de su recepción. Alternativamente para su utilización en el espacio de un mes a 2 hasta 8°C. Los reactivos sobreviven sin pérdida de actividad hasta 20 ciclos de congelación/ descongelación. Evite la exposición prolongada a la luz directa. Cuando se conserva correctamente, el kit mantiene su funcionalidad hasta la fecha de caducidad indicada.

5. Descripción del producto

5.1. Principio de la prueba

La prueba se basa en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocida como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene un par de primers (cebadores) específicos de gen para la amplificación de un fragmento 142 bp en el gen *F5* y de un fragmento 110 bp en el gen *F2*, así como cuatro sondas de hidrólisis específicas de alelo doblemente marcadas, que están unidas a la secuencia de destino de los fragmentos amplificados. La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad 5' – 3' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq escinde el reporter de la sonda hibridada. La separación espacial del fluoróforo del quencher ocasiona una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR.

Sonda de hidrólisis	Fluoróforo	Canal
FV mutante	FAM	520 nm
FV tipo silvestre	HEX	556 nm
PTH mutante	ROX	605 nm
PTH tipo silvestre	Cy5	670 nm

En muestras normales las **sondas tipo silvestre** (normal) generan una fuerte señal de fluorescencia en el canal HEX o Cy5 y ninguna o bien la señal situada en la línea de base en el canal FAM o ROX. En el caso de muestras mutantes homocigotas, las **sondas mutantes** producen una señal fuerte en el canal FAM o ROX, y ninguna o la señal situada en la línea de base en el canal HEX o Cy5. En muestras heterocigotas, las sondas de tipo silvestre y mutante se unen a los amplicones y provocan una señal intermedia en los canales de detección correspondientes.

5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

FV-PTH mpx RealFast™ Assay ha sido validado para su uso con una variedad de dispositivos de PCR en tiempo real disponibles en el mercado capaces de detectar fluorescencia FAM, HEX, Cy5 y ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** RealFast Genotyping QuickGuides para la programación y evaluación de RealFast™ Assays en diferentes aparatos están disponibles para su descarga en www.viennialab.com. «

El kit **no se puede utilizar** con aparatos de PCR en tiempo real, que requieran ROX para la normalización de los datos (por ejemplo: dispositivos de Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT).

5.3. Especificaciones de la prueba

La **sensibilidad** se determinó en base a los 39 alelos positivos de FV Leiden y 37 alelos positivos de PTH 20210G> A evaluados con una prueba de referencia de marcado CE. El ensayo FV-PTH mpx RealFast™ Assay tipificó correctamente todos los alelos positivos, lo que equivale a una tasa de verdaderos positivos del 100%.

La **especificidad** se determinó en base a los 235 alelos FV Leiden negativos y los 247 alelos PTH 20210G> A negativos evaluados con una prueba de referencia de marcado CE. El ensayo FV-PTH mpx RealFast™ Assay tipificó correctamente todos los alelos negativos, lo que equivale a una tasa de verdaderos negativos del 100%.

Límite de detección: 0,2 ng de ADN genómico (por reacción). Concentración de ADN recomendada: de 2 a 20 ng/µl de ADN genómico.

6. Materiales necesarios, pero no proporcionados

El aparato PCR en tiempo real con filtros FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) y Cy5 (670nm), recipientes PCR ópticos compatibles con los aparatos, guantes desechables sin polvo, agitador tipo vórtex, mini centrífuga para 2,0 ml tubos, bastidor de tubos, juego de micro pipetas calibradas (0,5 - 1 000 µl), puntas de pipeta estériles con filtros de aerosol, agua de gran pureza, sistema de extracción de ADN, refrigerador o congelador, contenedor de residuos.

7. Instrucciones

7.1. Extracción ADN

Reactivos de extracción de ADN **no se incluyen** en el kit. Se puede utilizar ADN de diferentes muestras (por ejemplo, sangre total, tarjetas de sangre, frotis de mejilla o la saliva). El ADN purificado debe estar disponible para la amplificación de forma altamente molecular y en cantidad y pureza suficientes. Para determinar el genotipo fiable la cantidad de ADN por reacción para todas las pruebas debe ser entre 10 y 100 ng.

7.2. Controles PCR

Incluya en cada ejecución **siempre** un **No Template Control (NTC)** para controlar la posibilidad de una contaminación potencial. Se recomienda utilizar el NTC (agua ultra pura en lugar de ADN) como duplicado.

Realice en cada ejecución **siempre** el FV-PTH mpx **WT-Control** y el FV-PTH mpx **MUT-Control** como señales de referencia para las muestras desconocidas. Algunos programas del PCR en tiempo real, tales como AB 7500 Fast, requieren para la correcta evaluación en el "Allelic Discrimination Plot" señales para los tres posibles genotipos. Para producir un control heterocigoto (HET-Control) mezcle una alícuota de WT- Control y de MUT-Control en la proporción 1:1.

» **Nota:** Los WT- y MUT-Controls pueden ser fuentes potenciales de contaminación y por lo tanto deben manejarse con mucho cuidado. «

7.3. Preparación de FV-PTH mpx RealFast™ Master Mix:

Descongele completamente todas las soluciones, mezclar suavemente y centrifugar brevemente. La preparación de la PCR debe llevarse a cabo a temperatura ambiente. Preparar suficiente **Master Mix** (mezcla maestra) para el número total del depósito de PCR planificado (pruebas N + controles positivos + controles negativos), y calcular al menos una reacción adicional para nivelar inexactitudes del pipeteando:

Componentes	por reacción	p.ej. 24+1 reacciones
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Coloque previamente **15 µl Master Mix** en cada recipiente. Pipete **5 µl de ADN** purificado o de **Control** Template en él con el fin de alcanzar el volumen final de 20 µl 5 µl de ADN.

Para minimizar el riesgo de contaminación de las muestras de la pipeta en este orden: en primer lugar NTC, a continuación sus muestras, por último los controles positivos. Cerrar inmediatamente los recipientes de reacción.

» **Nota:** Evite las burbujas de aire en la mezcla de PCR y las huellas dactilares sobre las superficies ópticas de los recipientes de reacción. Las dos cosas pueden afectar la medición de fluorescencia. «

7.4. Programa PCR

Programa su aparato PCR en tiempo real según lo especificado por el fabricante para experimentos "Allelic Discrimination" o "genotipado". Coloque los depósitos de PCR en el termociclador y ejecute el siguiente programa:

Programa			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, y otros aparatos basados en el bloque de calentamiento Peltier	MIC, Rotor-Gene® 6000 (36-well & 72-well rotor)
Ciclos	Temp	Tiempo	Paso	Paso
1	95°C	3 min	Desnaturalización inicial	Desnaturalización inicial
40	95°C	15 seg	Desnaturalización	Desnaturalización
	60°C	1 min	Annealing/extensión – registro de datos en el canal FAM, HEX, ROX y Cy5.	Annealing/extensión – registro de datos en el canal Green, Yellow, Orange y Red

8. Análisis de datos / Interpretación de los resultados

El genotipo de una muestra se calcula en base a las condiciones de la señal entre los canales de recepción. Por lo que la señal detectada en el **canal HEX o Cy5 (normal)** se compara con la señal detectada en el **canal FAM o ROX (mutado)**. La mayoría de los programas de análisis de PCR en tiempo real proporcionan los datos de ambos canales de forma automática como un diagrama de dispersión (scatterplot). Los puntos de datos a lo largo de los ejes X e Y corresponden a genotipos normales o homocigotos mutantes, mientras que los puntos de datos en el centro de los gráficos de dispersión corresponden a genotipos heterocigotos. La NTC aparece en la parte inferior izquierda.

Controles / muestras	Amplificación por canal				Genotipo FV / PTH
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NO	SI	NO	SI	normal FV / normal PTH
mpx HET-Control	SI	SI	SI	SI	heterocigoto FV / heterocigoto PTH
mpx MUT-Control	SI	NO	SI	NO	homocigoto mutado FV / homocigoto mutado PTH
NTC	NO	NO	NO	NO	----
Muestra 1	SI	SI	NO	SI	heterocigoto FV / normal PTH
Muestra 2	SI	NO	NO	SI	homocigoto mutado FV / normal PTH
Muestra 3	NO	SI	SI	SI	normal FV / heterocigoto PTH
Muestra 4	NO	SI	SI	NO	normal FV / homocigoto mutado PTH

En algunos programas de evaluación tiene que configurarse manualmente el valor límite (Threshold) para el genotipado correcto.

Recomendaciones para establecer el valor límite (C_q):

Fije el valor límite para el canal FAM y ROX ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del WT- Control (HEX/Cy5 positivo). Fije a la inversa el valor límite para el canal HEX y Cy5 ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del MUT-Control (FAM/ROX positivo).

Las muestras, que excedan el valor límite después de C_q 37 no se consideran válidas y deben repetirse.

Siga las indicaciones de su programa de evaluación PCR en tiempo real para analizar los datos obtenidos.

9. Indicaciones y medidas de seguridad

- El kit se destina únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Al manipular muestras y reactivos utilice siempre guantes desechables sin polvo y vestimenta adecuada de laboratorio.
- Entre las áreas para la extracción de ADN y del depósito PCR Master Mix debe mantenerse un espacio de separación estricto.
- Utilice solamente un set de pipetas propio sólo para el depósito de PCR y utilice puntas de pipeta con filtro de aerosol.
- Utilice únicamente recipientes de paredes finas, compatibles con el aparato PCR con cierre adecuado para medir visualmente.
- No mezclar reactivos con números de lotes diferentes.
- No utilizar kits o componentes del kit caducados.

FV-PTH mpx RealFast™ Assay

REF 7-115 / 7-118 Σ 100 / 32 reações
-30°C -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH
Gaudenzdorfer Guertel 43-45
A-1120 Vienna, Austria
Phone: (+43-1) 8120156-0
info@viennalab.com
www.viennalab.com

1. Utilização prevista

O FV-PTH mpx RealFast™ Assay é um teste de PCR múltiplo, rápido e exato para a deteção simultânea das duas mutações trombofílicas mais importantes. A mutação pontual 1691G>A no gene *Factor V (F5)*, designada por FV Leiden, e a mutação 20210G>A da protrombina (PTH) no gene *Factor II (F2)* estão associadas a trombofilia hereditária. O kit destina-se à análise de doentes com suspeita de aumento do risco de perturbações tromboticas. O ensaio qualitativo distingue os três genótipos possíveis para cada uma das mutações no ADN genómico humano: normal, heterozigótico ou mutante homozigótico.

Sequência de referência: FV: NG_011806.1 g.41721G>A; dbSNP: rs6025 / PTH: NG_008953.1 g.25313G>A; dbSNP: rs1799963.

2. Introdução

O FV e a PTH têm um papel essencial no processo de coagulação. A mutação FV Leiden causa a troca de um único aminoácido na posição 506 (R506Q), que altera um local de clivagem e que, subsequentemente, impede a inativação eficaz do FV. A persistência da atividade de FV aumenta o risco de formação de coágulos venosos. A mutação PTH 20210G na região 3' não traduzida resulta num aumento da síntese de mRNA e níveis plasmáticos de protrombina que, por sua vez, levam ao aumento da geração de trombina e, em consequência, à formação excessiva de coágulos de fibrina. Os portadores heterozigóticos para FV Leiden apresentam um risco 5 a 10 vezes maior de sofrer trombose venosa do que os não-portadores; já os portadores homozigóticos, face aos não-portadores, apresentam um risco 50 a 100 vezes maior. Em comparação com os indivíduos não portadores da mutação, os PTH 20210G>A heterozigóticos estão expostos a um risco 3 vezes maior, enquanto os portadores homozigóticos estão expostos a um risco 20 vezes superior. Indivíduos com fatores de risco adicionais, como a presença de outras mutações trombofílicas, obesidade, hipertensão, diabetes tipo 2, tabagismo ou utilização de contraceptivos orais, têm uma predisposição ainda maior para sofrer eventos tromboticos venosos.

3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x mpx Probe Mix	1 ampola <input type="checkbox"/> tampa branca	1000 / 320 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	1 ampola <input type="checkbox"/> tampa roxa	550 / 550 µl
FV-PTH mpx WT-Control	1 ampola <input type="checkbox"/> tampa verde	75 / 75 µl
FV-PTH mpx MUT-Control	1 ampola <input type="checkbox"/> tampa vermelha	75 / 75 µl

As RealFast™ 2x mpx Probe Mix incluem HotStart Taq DNA polymerase e dNTPs num sistema tampão otimizado. O FV-PTH mpx Assay Mix consiste em iniciadores específicos do gene *F5* e do gene *F2* e quatro sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo. Os controlos representativos do genótipo natural (WT-Control) e do mutante homozigótico (MUT-Control) são fornecidos com o kit.

O kit contém reagentes para 100 / 32 reações, num volume final de 20 µl cada.

4. Armazenamento e estabilidade

O FV-PTH mpx RealFast™ Assay é enviado em blocos de arrefecimento. Após a receção, armazene o kit de -30 a -15°C. Em alternativa, armazene entre 2 e 8°C para utilização a curto prazo, dentro de um mês. O kit suporta até 20 ciclos de congelamento/descongelamento sem ocorrer perda de atividade. Evitar a exposição prolongada a luz intensa. Se for armazenado corretamente, o kit permanece totalmente ativo até à data de validade indicada no rótulo.

5. Descrição do produto

5.1. Princípio do teste

O teste utiliza o ensaio fluorogénico 5' nuclease, também conhecido como ensaio TaqMan®-Assay. Cada reação contém dois pares de iniciadores específicos do gene, que amplificam um fragmento de 142 bp do gene *F5* e de 110 bp do gene *F2*, assim como quatro sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo que hibridizam a sequência alvo do fragmento amplificado. A proximidade do gene repórter fluorescente 5' e o corante supressor 3' em sondas intactas impede a fluorescência do gene repórter. Durante a fase de extensão da PCR, a atividade da exonuclease 5' – 3' da Taq DNA polimerase cliva o gene repórter fluorescente 5' da sonda hibridada. A separação física do fluoróforo do corante supressor produz um sinal fluorescente em tempo real, que é proporcional ao produto de PCR acumulado.

Sonda de hidrólise	Fluoróforo	Canal
FV mutante	FAM	520 nm
FV tipo natural	HEX	556 nm
PTH mutante	ROX	605 nm
PTH tipo natural	Cy5	670 nm

Em amostras normais, as **sondas de tipo natural** geram um sinal de fluorescência forte no canal HEX ou Cy5, e um sinal basal ou nulo no canal FAM ou ROX. Pelo contrário, em amostras de mutantes homozigóticos, as **sondas mutantes** hibridadas geram um sinal de fluorescência forte no canal FAM ou ROX, e um sinal basal ou nulo no canal HEX ou Cy5. Em amostras heterozigóticas, as sondas do tipo natural e as mutantes ligam-se aos amplicões e produzem sinais intermédios nos respetivos canais.

5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O kit FV-PTH mpx RealFast™ Assay está validado para a utilização com vários equipamentos comuns de PCR em tempo real com capacidade de registar fluorescência FAM, HEX, Cy5 e ROX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycloer (bms)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** É possível transferir os RealFast™ Genotyping QuickGuides para informações sobre a configuração e análise de experiências com diferentes tipos de instrumentos em www.viennalab.com «

O kit **não é apropriado** para a utilização com instrumentos de PCR em tempo real que exijam ROX para a normalização dos dados (por exemplo, instrumentos Applied Biosystems®: StepOne™, 7300, 7900/7900HT) ou para instrumentos sem os canais de deteção de fluorescência necessários.

5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi efetuada em 39 alelos com resultado positivo para FV Leiden e 37 alelos com resultado positivo para PTH 20210G>A, ambos testados com um kit de referência com marcação CE. O FV-PTH mpx RealFast™ Assay determinou corretamente todos os alelos como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 235 alelos com resultado negativo para FV Leiden e 247 com resultado positivo para PTH 20210G>A, ambos testados com um kit de referência com marcação CE. O FV-PTH mpx RealFast™ Assay determinou corretamente todos os alelos como negativos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros negativos de 100%.

Limite de deteção: 0.2 ng de ADN genómico (por reação). Concentração de ADN recomendada: 2 a 20 ng/µl de ADN genómico.

6. Materiais necessários, mas não fornecidos

Instrumento de PCR em tempo real com filtros FAM (520 nm), HEX (556 nm), ROX (605 nm) e Cy5 (670 nm) recipientes de reação compatíveis com o instrumento, luvas sem talco descartáveis, vórtex, minicentrífugadora para tubos de 2.0 ml, suportes para tubos, conjunto de micropipetas calibradas (0.5 – 1000 µl), pontas estéreis com filtro de barreira de aerossóis, água de grau molecular, sistema de extração de ADN, congelador, recipiente para resíduos de risco biológico.

7. Protocolo experimental

7.1. Extração do ADN

Os reagentes de extração do ADN **não são fornecidos** com o kit.

É possível utilizar ADN isolado de vários tipos de amostra (p. ex., sangue periférico total, gota seca de sangue, esfregaço bucal ou saliva). Certifique-se de que o ADN extraído é adequado para a amplificação em termos de concentração, pureza e integridade.

Para a determinação exata do genótipo, a quantidade de ADN por reação deve situar-se entre 10 e 100 ng em todas as amostras.

7.2. Controlos de PCR

Inclua **sempre** um **No Template Control** (NTC) em cada experiência para confirmar a ausência de potencial contaminação. Recomenda-se a análise do NTC (utilizando água de grau para PCR em vez de ADN) em duplicado.

Inclua **sempre** o FV-PTH mpx **WT-Control** e o FV-MTH mpx **MUT-Control** como sinais de referência positiva para as amostras desconhecidas. Algum software de PCR em tempo real, p.ex., AB 7500 Fast, necessita de receber sinais dos três genótipos possíveis para a discriminação correta dos alelos. Para obter um controlo heterozigótico (HET-Control), misture uma alíquota do WT-Control e do MUT-Control numa proporção de 1:1.

» **Nota:** Os WT- e MUT-Controls são potenciais fontes de contaminação. Manuseie com cautela. «

7.3. Preparação da FV-PTH mpx RealFast™ Master Mix

Agite lentamente no vórtex e centrifugue rapidamente todas as soluções após o descongelamento. Configure a PCR à temperatura ambiente. Prepare **Master-Mix** suficiente para todas as reações (amostras N + controlos positivos + controlos negativos) e pelo menos mais uma reação adicional para compensar erros de pipetagem:

Componente	por reação	p. ex., 24+1 reações
RealFast™ 2x mpx Probe Mix	10 µl	250 µl
FV-PTH mpx Assay Mix	5 µl	125 µl
Master Mix	15 µl	375 µl

Coloque **15 µl de Master-Mix** em cada poço. Adicione **5 µl de ADN** purificado ou modelo de **Controlo** para obter um volume de reação final de 20 µl.

Para minimizar o risco de contaminação, pipete sempre modelos pela seguinte ordem: primeiro o NTC, seguido das amostras e, por último, os controlos positivos. Feche imediatamente os recipientes de reação.

» **Nota:** Evite a formação de bolhas na mistura de reação final e evite tocar na superfície ótica da tampa ou na película de vedação sem luvas. Isto pode interferir com as medições de fluorescência. Se necessário, centrifugue brevemente. «

7.4. Programa de PCR

Programa o instrumento de PCR em tempo real de acordo com as instruções do fabricante para discriminação de alelos/experiências de genotipagem. Coloque as amostras no termociclador e execute o seguinte programa:

Programa			AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480, e outros instrumentos à base do bloco de calor de Peltier	MIC, Rotor-Gene® 6000 (rotores de 36 poços e 72 poços)
Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos	Passos
1.	95°C	3 min	Desnaturação inicial	Desnaturação inicial
40	95°C	15 s	Desnaturação	Desnaturação
	60°C	1 min	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados nos canais FAM, HEX, ROX e Cy5	Hibridação/Extensão– Aquisição de dados nos canais Green, Yellow, Orange e Red

8. Análise dos dados/interpretação dos resultados

O genótipo de cada amostra é determinado através do cálculo do quociente entre os sinais registados no **canal HEX** ou **Cy5 (normal)** e os sinais registados no **canal FAM** ou **ROX (mutante)**. A maior parte do software de PCR em tempo real resolve automaticamente os dados dos dois canais em grupos num gráfico de dispersão. Os pontos de dados representados ao longo dos eixos dos xx e dos yy correspondem a genótipos normais e mutantes homozigóticos, respetivamente. Os pontos de dados agrupados no centro do gráfico de dispersão representam genótipos heterozigóticos. O NTC aparece no canto inferior esquerdo.

Controls / Amostras	Amplificação no canal				Genótipo Mutante FV
	FAM Green	HEX Yellow	ROX Orange	Cy5 Red	
mpx WT-Control	NÃO	SIM	NÃO	SIM	FV normal / PTH normal
mpx HET-Control	SIM	SIM	SIM	SIM	FV heterozigótico / PTH heterozigótico
mpx MUT-Control	SIM	NÃO	SIM	NÃO	FV mutante homozigótico / PTH mutante homozigótico
NTC	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	---
Amostra 1	SIM	SIM	NÃO	SIM	FV heterozigótico / PTH normal
Amostra 2	SIM	NÃO	NÃO	SIM	FV mutante homozigótico / PTH normal
Amostra 3	NÃO	SIM	SIM	SIM	FV normal / PTH heterozigótico
Amostra 4	NÃO	SIM	SIM	NÃO	FV normal / PTH mutante homozigótico

O software de alguns instrumentos requer a definição manual de limiares para a determinação exata do genótipo.

Definições de limiar recomendadas (C_q):

Defina o valor do limiar para os canais FAM e ROX imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo WT-Control (HEX/Cy5 positivos). Inversamente, defina o valor do limiar para os canais HEX e Cy5 imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo MUT-Control (FAM/ROX positivos).

As amostras que ultrapassam o limiar para além de C_q 37 dão resultados inválidos e têm de ser repetidas.

Para analisar os dados obtidos, siga as instruções do software do seu instrumento.

9. Avisos e precauções

- Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Utilizar sempre luvas sem talco descartáveis e vestuário de laboratório adequado ao manusear as amostras e os reagentes.
- Preparar a reação numa área separada da preparação de ácidos nucleicos e da análise do produto de PCR.
- Utilizar pipetas dedicadas apenas à configuração da PCR e pontas de pipeta com filtro de barreira de aerossóis.
- Utilizar recipientes de reação compatíveis com o instrumento e com tampas ou vedantes transparentes.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes.
- Não utilizar kits ou componentes do kit que estejam fora do prazo de validade.