

# FV Leiden RealFast™ Assay

REF 7-110 / 7-113  $\Sigma$  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](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Intended Use

The FV Leiden RealFast™ Assay is a fast and accurate real-time PCR test for the detection of the 1691G>A mutation in the human coagulation Factor V (*F5*) gene. The point mutation, referred to as FV Leiden, is associated with hereditary thrombophilia. The kit is designed to identify patients at risk of venous thromboembolism. The qualitative assay discriminates the three possible FV 1691G>A genotypes in a human DNA extract: GG (normal), GA (heterozygous) or AA (homozygous mutant).

Reference sequence: HGVS: NG\_011806.1 g.41721G>A; NCBI dbSNP: rs6025.

## 2. Introduction

FV is a major player in the coagulation cascade. Activated FV is cleaved and degraded by activated protein C, thereby limiting excessive blood clotting. The mutation 1691G>A causes a single amino acid exchange at position 506 (R506Q), which alters a cleavage site and subsequently prevents efficient inactivation of FV. In allele A carriers, persisting FV activity facilitates the generation of other activated coagulation factors and consequently increases the risk of clot formation in veins. Approximately 5% of Caucasians are heterozygous carriers of the FV Leiden mutation. They 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. 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 Genotyping Mix	1 vial	□ white cap	1000 / 320 µl
FV Leiden Assay Mix	1 vial	■ purple cap	550 / 550 µl
FV WT-Control	1 vial	■ green cap	75 / 75 µl
FV MUT-Control	1 vial	■ red cap	75 / 75 µl

The RealFast™ 2x Genotyping Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The FV Leiden Assay Mix consists of *F5* gene-specific primers and two 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 Leiden 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 a gene-specific primer pair which amplifies a 142 bp fragment of the *F5* gene, and two dual-labeled, allele-specific hydrolysis probes which hybridize to the target sequence of the amplified fragment. 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.

In normal samples the **HEX-labeled FV wild type probe** hybridizes to the complementary strand of the gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the HEX channel (556nm) and no or only a baseline signal in the FAM channel (520nm). Vice versa, in homozygous mutant samples the **FAM-labeled FV mutant probe** binds to the gene fragment. A strong fluorescence signal is detected in the FAM channel and no or only a baseline signal in the HEX channel. In heterozygous samples both wild type and mutant probes bind to the amplicons and generate intermediate signals in both channels.

### 5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The FV Leiden RealFast™ Assay is validated for use with the AB 7500 Fast instrument.

The kit is compatible with various common real-time PCR instruments capable of recording FAM and HEX fluorescence:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyclers (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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](http://www.viennalab.com).

When using AB StepOne™, set passive reference dye to "ROX"! «

The kit is supplied **without ROX**. For use with real-time PCR instruments requiring high ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), add ROX at a final concentration of 1 µM to the 2x Genotyping Mix.

### 5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 73 alleles testing positive for the FV Leiden mutation with a CE-marked reference kit. The FV Leiden RealFast™ Assay determined all 73 alleles as positive, which equaled a true positive rate of 100%.

Determination of **specificity** was performed on 165 alleles testing negative for the FV Leiden mutation with a CE-marked reference kit. The FV Leiden RealFast™ Assay determined all 165 alleles as negative, 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) and HEX (556 nm) 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 WT-Control** and **FV 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 Leiden 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 Genotyping Mix	10 µl	250 µl
FV Leiden Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P and other Peltier heating block-based instruments:**

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension –
			<b>Data acquisition</b> on FAM and HEX channel

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Cycles	Temp	Time	Steps
1	95°C	3 min	Initial denaturation
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C <i>*for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension –
			<b>Data acquisition</b> on Green and Yellow channel

## 8. Data Analysis / Interpretation of Results

The genotype of each sample is determined by calculating the ratio between signals recorded in the **HEX channel (normal)** and signals recorded in the **FAM channel (mutant)**. Most real-time PCR software automatically resolves data of both 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	Amplification in <b>FAM</b> channel (520 nm)	Amplification in <b>HEX</b> channel (556 nm)	Genotype
WT-Control	NO	<b>YES</b>	normal
HET-Control	<b>YES</b>	<b>YES</b>	heterozygous
MUT-Control	<b>YES</b>	NO	homozygous mutant
NTC	NO	NO	----

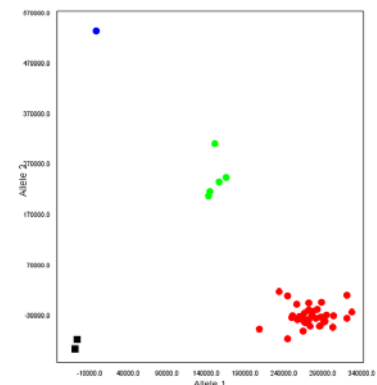
Some instrument software needs manual threshold settings for accurate genotype calling.

Recommendations for Threshold Settings ( $C_q$ ):

Set threshold value for the FAM channel just above the background fluorescent signal generated by the WT-Control (HEX-positive). Vice versa, set threshold value for the HEX channel just above the background fluorescent signal of the MUT-Control (FAM-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 Leiden RealFast™ Assay

REF 7-110 / 7-113 100 / 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](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Verwendungszweck

Der FV Leiden RealFast™ Assay ist ein schneller und präziser real-time PCR Test zur Detektion der 1691G>A Mutation im humanen *Faktor V (FV)* Gen. Die auch als FV Leiden bekannte Mutation ist der häufigste genetische Risikofaktor für Thrombophilie. Der Kit ermöglicht die Identifizierung von Patienten mit erblich bedingtem erhöhten Thromboserisiko. Der qualitative Test weist in einem humanen DNA-Extrakt einen der drei möglichen FV 1691G>A Genotypen nach: GG (normal), GA (heterozygot) oder AA (homozygot mutiert).  
Referenzsequenz: HGVS: NG\_011806.1 g.41721G>A; NCBI dbSNP: rs6025.

## 2. Einleitung

FV ist eine Hauptkomponente in der Kaskade der Blutgerinnungsfaktoren. Normalerweise wird aktivierter FV durch aktiviertes Protein C degradiert und somit eine exzessive Thrombusbildung vermieden. Die Mutation 1691G>A verursacht einen Aminosäureaustausch an Position 506 (R506Q), der eine effiziente Inaktivierung des FV verhindert und dadurch die Blutgerinnung weiter aufrecht hält.

In FV Leiden Trägern verursacht die anhaltende FV Aktivität die Aktivierung anderer Koagulationsfaktoren und erhöht folglich das Risiko einer Thrombusbildung in Blutgefäßen. Ungefähr 5 % der Kaukasier sind heterozygot für FV Leiden. Im Vergleich zu Nichtträgern ist ihr Thromboserisiko um ein 5- bis 10-faches erhöht. Die sehr selten vorkommende homozygote Ausprägung geht sogar mit einem 50- bis 100-fach höheren Risiko einher. Personen 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 Genotyping Mix	1 Vial	weisser Deckel	1000 / 320 µl
FV Leiden Assay Mix	1 Vial	violetter Deckel	550 / 550 µl
FV WT-Control	1 Vial	grüner Deckel	75 / 75 µl
FV MUT-Control	1 Vial	roter Deckel	75 / 75 µl

Der RealFast™ 2x Genotyping Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der FV Leiden Assay Mix besteht aus FV genspezifischen Primern und zwei 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 Leiden 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 ein genspezifisches Primerpaar zur Amplifizierung eines 142 bp Fragments im FV Gen und zwei doppelt-markierte, allelspezifische Hydrolysesonden, die an die Zielsequenz des amplifizierten Fragments 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 hybridisiert die **HEX-markierte FV Wildtyp-Sonde** an den komplementären Strang des amplifizierten Genfragments. Das Resultat ist ein starkes Fluoreszenzsignal im HEX-Kanal (556nm) und ein geringes, an der Basislinie liegendes Signal im FAM-Kanal (520nm). Im umgekehrten Fall von homozygot mutierten Proben hybridisiert die **FAM-markierte FV Mutanten-Sonde** an den komplementären Strang des amplifizierten Genfragments. Somit wird ein starkes Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal und ein geringes, an der Basislinie liegendes Signal im HEX-Kanal detektiert. Bei heterozygoten Proben binden beide Sonden an die Zielregion der Amplikons und verursachen ein intermediäres Signal in beiden Detektionskanälen.

### 5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der FV Leiden RealFast™ Assay ist für die Verwendung mit dem AB 7500 Fast Gerät validiert.

Der Kit ist mit verschiedenen handelsüblichen real-time PCR Geräten, die FAM- und HEX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

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

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

Bei Verwendung von AB StepOne™ muss der passive Referenzfarbstoff auf "ROX" gesetzt werden! «

Der Kit enthält **kein ROX**. Bei Verwendung von real-time PCR Geräten, die eine hohe ROX- Konzentration zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), muss ROX in einer Endkonzentration von 1 µM dem 2x Genotyping Mix zugefügt werden.

### 5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 73 Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest positiv auf die FV Leiden Mutation getestet wurden, bestimmt. Der FV Leiden RealFast™ Assay typisierte alle 73 Allele als positiv = 100% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 165 Allelen, die mit einem CE-markierten Referenztest negativ auf die FV Leiden Mutation getestet wurden, bestimmt. Der FV Leiden RealFast™ Assay typisierte alle 165 Allele als negativ = 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) und HEX-(556 nm) 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 **WT-Control** und die FV **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 Leiden 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 Pipettierungenauigkeiten auszugleichen:

Komponente	pro Reaktion	z.B. 24+1 Reaktionen
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
FV Leiden Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master-Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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. «

### 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:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P**  
und andere Peltier-Heizblock-basierende Geräte:

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	<b>60°C</b>	1 min	Annealing/Extension - <b>Datenaufnahme</b> im FAM- und HEX-Kanal

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	<b>60°C</b> <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension - <b>Datenaufnahme</b> im Green- und Yellow-Kanal

## 8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

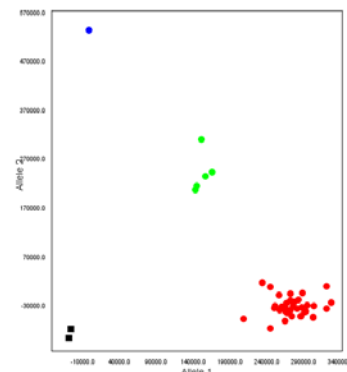
Der Genotyp einer Probe wird aufgrund des Signalverhältnisses zwischen den Aufnahmekanälen berechnet. Dabei wird das im **HEX-Kanal (normal)** detektierte Signal mit dem im **FAM-Kanal (mutiert)** detektierten Signal verglichen. Die meisten real-time PCR Auswerteprogramme stellen die Daten beider Kanäle 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	Amplifikation im <b>FAM</b> -Kanal (520 nm)	Amplifikation im <b>HEX</b> -Kanal (556 nm)	Genotyp
WT-Control	NEIN	<b>JA</b>	normal
HET-Control	<b>JA</b>	<b>JA</b>	heterozygot
MUT-Control	<b>JA</b>	NEIN	homozygot mutiert
NTC	NEIN	NEIN	---

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

Empfehlungen zur Einstellung des Schwellenwertes (C<sub>q</sub>):

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



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

## 9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Kit ist ausschließlich für *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Tragen Sie beim Hantieren 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 Leiden RealFast™ Assay

REF 7-110 / 7-113 100 / 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](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilisation

Le FV Leiden RealFast™ Assay est un test PCR rapide et précis en temps réel pour détecter la mutation 1691G>A dans le gène codant le facteur V de coagulation humaine (FV). Ce point de mutation, aussi connue sous le nom de FV Leiden, représente le facteur de risque génétique le plus fréquent pour la thrombophilie. Ce test qualitatif permet d'identifier les patients avec une prédisposition héréditaire thrombophilique. Il permet de distinguer un des trois génotypes FV 1691G>A possibles dans un extrait d'ADN humain: GG (normal), GA (hétérozygote) ou AA (homozygote muté).

Séquence de référence: HGVS: NG\_011806.1 g.41721G>A;NCBI dbSNP: rs6025

## 2. Introduction

Le FV est un des principaux composants dans la cascade des facteurs de coagulation sanguine. Normalement le FV activé est clivé et dégradé par une protéine C activée, limitant ainsi le risque d'une coagulation sanguine excessive. La mutation 1691G>A provoque un échange d'acides aminés à la position 506 (R506Q), altérant le site de clivage et entravant une inactivation efficace du FV et maintenant ainsi la coagulation.

Chez les porteurs du FV Leiden, l'activité persistante FV provoque l'activation d'autres facteurs de coagulation et accroît par conséquent les risques de formation d'un thrombus dans les vaisseaux sanguins. Environ 5 % des caucasiens sont hétérozygotes pour le FV Leiden. Comparés aux non-porteurs, leur risque de thrombose est 5 à 10 fois plus élevé. La forme homozygote très rare s'accompagne d'un risque 50 à 100 fois plus élevé. Les personnes avec d'autres facteurs de risque, comme par exemple d'autres prédispositions génétiques, surpoids, hypertension, diabète de type 2, tabagisme ou prise de contraceptifs oraux manifestent un risque supplémentaire.

## 3. Composants du kit

100 / 32 Rxn

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

Le RealFast™ 2x Genotyping Mix comprend HotStart Taq DNA polymerase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le FV Leiden Assay Mix se compose de primers génospécifiques FV et de deux sondes d'hydrolyse spécifiques d'allèle munies d'un double marqueur. De plus vous disposez dans le kit des matrices 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 Leiden 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 du gène FV et deux sondes d'hydrolyse allèles-spécifiques, munies d'un marqueur double, qui s'hybride à la séquence cible du fragment amplifié. 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.

Dans les échantillons normaux, la sonde de type sauvage FV marquée HEX s'hybride au brin complémentaire du fragment de gène amplifié. Il en résulte un fort signal fluorescent dans le canal HEX (556nm) et aucun signal ou un moins fort situé sur la ligne de base dans le canal FAM (520nm). Inversement, dans des échantillons mutés homozygotes, la sonde mutante FV marquée FAM s'hybride au brin complémentaire du fragment de gène amplifié. On peut ainsi détecter un signal fluorescent fort dans le canal FAM et aucun ou un signal plus faible situé sur la ligne de base dans le canal HEX. 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 Leiden RealFast™ Assay est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast.

Le kit est compatible avec différentes machines de la PCR en temps réel standards du commerce capables de détecter la fluorescence FAM et HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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](http://www.viennalab.com).

Si vous utilisez le AB StepOne™, il faut mettre le colorant de référence passif sur "ROX"! «

Le kit est livré sans ROX. Pour l'utilisation d'appareils PCR en temps réel nécessitant une haute concentration pour la normalisation des données (par ex. Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), il faut ajouter du ROX dans une concentration finale de 1 µM à 2x Genotyping Mix.

### 5.3. Spécifications du test

La sensibilité a été déterminée à partir de 73 allèles, qui ont été testées positives à la mutation Leiden FV à partir d'un test de référence marqué CE. Le FV Leiden RealFast™ Assay a typé positives 73 allèles, ce qui équivaut à un taux de vrais positifs de 100%.

La spécificité a été déterminée à partir de 165 allèles, qui ont été testées négatives à la mutation FV Leiden à partir d'un test de référence marqué CE. Le FV Leiden RealFast™ Assay a typé négatives l'ensemble des 165 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), 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 **WT-Control** et le FV **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 Leiden 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 Genotyping Mix	10 µl	250 µl
FV Leiden Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master-Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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:

**AB 7500 Fast, StepOne, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P** et autres machines reposant sur le bloc thermique Peltier:

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	3 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Dénaturation
	60°C	1 min	Annealing/Extension –
			<b>Réception de données</b> dans le canal FAM et HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000<sup>+</sup>:**

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	95°C	3 min	Dénaturation initiale
40	95°C	15 sec	Denaturation
	60°C <i>*)for 36-well rotor: 56°C</i>	1 min	Annealing/Extension –
			<b>Réception de données</b> dans le canal Green et Yellow

## 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 (normal)** est pour ce faire comparé au signal détecté dans le **canal FAM (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 apparaît en bas à gauche.

Contrôles	Amplification dans le canal <b>FAM</b> (520 nm)	Amplification dans le canal <b>HEX</b> (556 nm)	Génotype
WT-Control	NON	OUI	normal
HET-Control	OUI	OUI	hétérozygote
MUT-Control	OUI	NON	homozygote muté
NTC	NON	NON	----

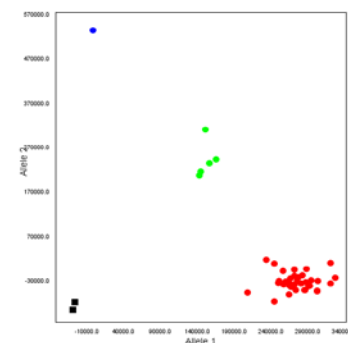
Pour certains logiciels il faut fixer manuellement des valeurs seuil (threshold) pour effectuer le génotypage correctement.

Recommandations pour le réglage de la valeur seuil (C<sub>q</sub>):

Fixez la valeur seuil pour le canal FAM juste au-dessus du signal fluorescent de fond généré par le WT-Control (HEX positif). Fixez à l'inverse la valeur seuil pour le canal HEX juste au-dessus du signal fluorescent de fond du MUT-Control (FAM positif).

Les échantillons dépassant le seuil C<sub>q</sub> 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 Leiden RealFast™ Assay

REF 7-110 / 7-113  $\Sigma$  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](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilizzo

L'FV Leiden RealFast™ Assay è un test in tempo reale, rapido e accurato, basato sulla PCR per la rilevazione della mutazione 1691G>A nel gene che codifica per il *Fattore V (FV)* della coagulazione umano. La mutazione puntiforme, denominata FV di Leiden, è associata alla trombofilia ereditaria. Il kit è progettato per identificare i pazienti a rischio di tromboembolia venosa. L'esame qualitativo discrimina i tre possibili genotipi FV 1691G>A di un estratto di DNA umano: GG (stato normale), GA (stato eterozigote) o AA (stato omozigote mutante). Sequenza di riferimento: HGVS: NG\_011806.1 g.41721G>A; NCBI dbSNP: rs6025.

## 2. Introduzione

Il Fattore V svolge un ruolo importante nella cascata della coagulazione. Il Fattore V Attivato è clivato e degradato dalla proteina C attivata, limitando così una coagulazione eccessiva del sangue. La mutazione 1691G>A 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.

Nei portatori dell'allele A, una persistente attività del Fattore V favorisce la generazione di altri fattori della coagulazione attivati, aumentando perciò il rischio di formazione di trombi nelle vene. Circa il 5% dei soggetti caucasici è portatore eterozigote della mutazione del Fattore V di Leiden. Tali soggetti 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 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 Genotyping Mix	1 fiala □ tappo bianco	1000 / 320 µl
FV Leiden Assay Mix	1 fiala ■ tappo viola	550 / 550 µl
FV WT-Control	1 fiala ■ tappo verde	75 / 75 µl
FV MUT-Control	1 fiala ■ tappo rosso	75 / 75 µl

Il RealFast™ 2x Genotyping Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTP in un sistema tampone ottimizzato. L' FV Leiden Assay Mix consiste di primer specifici per il gene *FV* e di due 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 Leiden 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 una coppia di primer gene-specifici che amplifica un frammento di 142 bp del gene *FV*, e due sonde di idrolisi allele-specifiche a doppia etichetta che ibridano con la sequenza target del frammento amplificato. 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.

Nei campioni normali la **sonda marcata con HEX di tipo selvatico** per l'FV ibrida con il filamento complementare del frammento del gene. Nel canale HEX (556nm) si rileva un forte segnale di fluorescenza, mentre il segnale è assente o soltanto di base nel canale FAM (520nm). Viceversa, nei campioni omozigoti mutanti la **sonda mutante** per l'FV **marcata con FAM** si lega al frammento del gene. Si rileva un forte segnale di fluorescenza nel canale FAM, mentre il segnale è assente o soltanto di base nel canale HEX. Nei campioni eterozigoti le sonde sia di tipo selvatico che mutante si legano agli ampliconi, generando segnali intermedi in entrambi i canali.

### 5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

L' FV Leiden RealFast™ Assay è validato per l'utilizzo con lo strumento AB 7500 Fast.

Il kit è compatibile con vari strumenti comuni Real-time PCR in grado di registrare la fluorescenza FAM e HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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](http://www.viennalab.com).

Quando si utilizza l'AB StepOne™, impostare il colorante di riferimento passivo su "ROX"! «

Poiché viene fornito **senza ROX**, per utilizzare il kit con strumenti Real-time PCR che richiedono un ROX elevato per la normalizzazione dei dati (per es. strumenti Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), aggiungere ROX in una concentrazione finale di 1 µM al 2x Genotyping Mix.

### 5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 73 alleli risultati positivi per la mutazione FV Leiden con kit di riferimento marchiato CE. L'FV Leiden RealFast™ Assay ha determinato la positività di tutti i 73 alleli, con una percentuale di veri positivi pari al 100%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 165 alleli risultati negativi per la mutazione FV Leiden con kit di riferimento marchiato CE. L'FV Leiden RealFast™ Assay ha determinato la negatività di tutti i 165 alleli, 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) e HEX (556 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 del Master Mix dell'FV Leiden RealFast™:

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:

Componenti	per reazione	Per es. 24+1 reazioni
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
FV Leiden Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P** e altri strumenti Peltier basati su blocco di riscaldamento:

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	95°C	3 min	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione
	<b>60°C</b>	1 min	Annealing/Estensione – <b>Acquisizione dei dati</b> nel canale FAM e HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	95°C	3 min	Denaturazione iniziale
40	95°C	15 sec	Denaturazione
	<b>60°C</b> *)for 36-well rotor: <b>56°C</b>	1 min	Annealing/Estensione – <b>Acquisizione dei dati</b> nel canale Green e Yellow

## 8. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

Il genotipo di ciascun campione si determina calcolando il rapporto tra i segnali registrati nel **canale HEX (normale)** e i segnali registrati nel **canale FAM (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	Amplificazione nel canale <b>FAM</b> (520 nm)	Amplificazione nel canale <b>HEX</b> (556 nm)	Genotipo
WT-Control	NO	<b>SI</b>	normale
HET-Control	<b>SI</b>	<b>SI</b>	eterozigote
MUT-Control	<b>SI</b>	NO	omozigote mutante
NTC	NO	NO	----

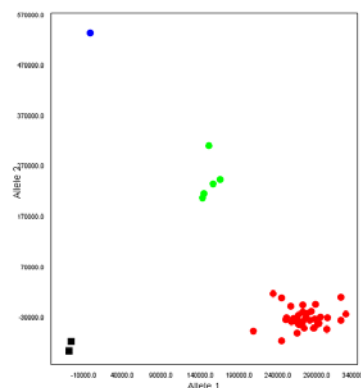
Alcuni software dello strumento richiedono l'impostazione manuale dei valori soglia (threshold) ai fini di un'accurata determinazione dei genotipi.

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

Impostare la soglia per il canale FAM immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal WT-Control (HEX-positivo). Viceversa, impostare la soglia per il canale HEX immediatamente al di sopra del segnale fluorescente di fondo generato dal MUT-Control (FAM-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 Leiden RealFast™ Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

REF 7-110 / 7-113 100 / 32 reacciones

-30°C -15°C



## 1. Aplicación

FV Leiden RealFast™ Assay es una prueba PCR en tiempo real rápida y precisa para la detección de la mutación 1691G>A del gen humano *factor V (FV)*. La mutación también conocida como FV Leiden es el factor de riesgo genético más común para la trombofilia. El kit permite la identificación de pacientes con elevado riesgo de trombosis hereditaria. La prueba cualitativa establece en un extracto humano de ADN uno de los tres posibles genotipos FV 1691G>A: el GG (normal), GA (heterocigoto) o bien el AA (homocigoto mutante).  
Secuencia de referencia: HGVS: NG\_011806.1 g.41721G>A; NCBI dbSNP: rs6025.

## 2. Introducción

FV es un componente principal en la cascada de factores de coagulación de la sangre. Normalmente el FV activo es degradado por la proteína C activada y de este modo se evita un exceso de formación de trombos. La mutación 1691G>A provoca una sustitución de aminoácido en la posición 506 (R506Q), lo que impide una inactivación eficiente de FV, y con ello se continúa manteniendo la coagulación. Para los portadores de FV Leiden la actividad sostenida de FV provoca la activación de otros factores de coagulación y por lo tanto aumenta el riesgo de formación de trombos en los vasos sanguíneos. Aproximadamente el 5% de los caucásicos son portadores heterocigotos del FV Leiden. En comparación con los no portadores, su riesgo de trombosis es de 5 a 10 veces mayor. La formación de homocigotos que rara vez ocurre puede incluso incrementar un riesgo de un 50 a 100 veces superior. Las personas con otros factores de riesgo, como por ejemplo otras predisposiciones genéticas, la obesidad, presión arterial alta, diabetes tipo 2, el tabaco o el uso de anticonceptivos orales tienen un riesgo adicional.

## 3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

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

El RealFast™ 2x Genotyping Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer. El FV Leiden Assay Mix se compone de FV primers específicos de genes y dos sondas de hidrólisis, doblemente marcadas alelo-específicas. Además en el kit se incluyen las plantillas de control para el genotipo normal (WT-control) y el homocigoto mutado (MUT-control).

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

## 4. Almacenamiento y estabilidad

El FV Leiden 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 basada en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocido como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene un par de cebadores (primers) específicos de gen para la amplificación de un fragmento de 142 pb en el gen *FV* y dos sondas de hidrólisis doblemente marcadas alelo específicas, que enlazan con la secuencia de objetivo del fragmento amplificado. 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.

En las muestras normales la **sonda wild type FV marcada-HEX** hibrida a la cadena complementaria del fragmento de gen amplificado.

El resultado es una intensa señal de fluorescencia en el canal HEX (556nm) y una baja señal situada en la línea de base en el canal FAM (520 nm). En el caso inverso de las muestras de homocigotos mutantes la **sonda-mutante FV marcada-FAM** hibrida a la cadena complementaria del fragmento de gen amplificado. De este modo se detecta una intensa señal de fluorescencia en el canal FAM, y una baja señal situada en la línea de base en el canal HEX. Para las muestras heterocigóticas las dos sondas se unen en la zona de destino de los amplicones y generan una señal intermedia en los dos canales de detección.

### 5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

El FV Leiden RealFast™ Assay su uso está autorizado con el aparato AB 7500 Fast.

El kit es compatible con diferentes aparatos usuales de PCR en tiempo real, que puedan detectar fluorescencia FAM y HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycloer (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

¡Al utilizar AB StepOne™ el colorante de referencia pasiva debe ponerse a "ROX"! «

El kit **no** contiene **ROX**. El uso de dispositivos de PCR en tiempo real, que requieren una alta concentración de ROX para normalizar los datos (por.ej.: Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), ROX tiene que ser añadido a una concentración final de 1 µM al 2x Genotyping Mix.

### 5.3. Especificaciones de la prueba

La **sensibilidad** se basa en 73 alelos, que fueron probados con una prueba de referencia positiva para la mutación FV Leiden marcado por la CE. El FV Leiden RealFast™ Assay tipificó los 73 alelos como positivo = 100% correcto-positivo-tanto por ciento.

La **especificidad** se basa en 165 alelos, que fueron probados con una prueba de referencia negativa para la mutación FV Leiden marcado por la CE. El FV Leiden RealFast™ Assay tipificó los 165 alelos como negativo = 100% correcto-negativo-tanto por ciento.

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 FAM (520 nm) y el filtro HEX (556 nm), recipientes PCR ópticos compatibles con aparatos, guantes desechables sin polvo, vórtex, mini centrífuga para 2.0 ml tubos, bastidor de tubos, juego de micro pipetas calibradas (0.5 - 1000 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 **WT-Control** y el FV **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" las señales para los tres posibles genotipos. Para producir un control heterocigoto (HET-Control) mezcle una alícuota de WT- Control y 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 Leiden 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 Genotyping Mix	10 µl	250 µl
FV Leiden Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master-Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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

Programe su aparato PCR en tiempo real según lo especificado por el fabricante para la "Allelic Discrimination" o "Experimentos de genotipo". Fije los depósitos de PCR en el termociclador y ejecute el siguiente programa:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P** y otros aparatos basados en el bloque de calentamiento Peltier:

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	95°C	3 min	Desnaturalización inicial
40	95°C	15 seg	Desnaturalización
	60°C	1 min	Annealing/Extensión – registro de datos en el canal FAM y HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	95°C	3 min	Desnaturalización inicial
40	95°C	15 seg	Desnaturalización
	60°C *for 36-well rotor: 56°C	1 min	Annealing/Extensión - registro de datos en el canal Green y Yellow

## 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 (normal)** se compara con la señal detectada en el **canal FAM (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	Amplificación en FAM-canal (520 nm)	Amplificación en HEX-canal (556 nm)	Genotipo
WT-Control	NO	SI	normal
HET-Control	SI	SI	heterocigoto
MUT-Control	SI	NO	homocigoto mutado
NTC	NO	NO	----

Algunos programas de evaluación tienen que configurar manualmente el valor límite (threshold) para el genotipo correcto.

Recomendaciones para establecer el valor límite (C<sub>q</sub>):

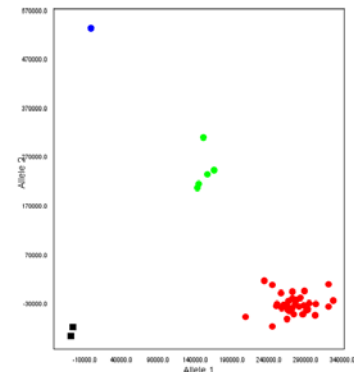
Fije el valor límite para el canal FAM ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del WT-Control (HEX positivo). Ponga a la inversa el valor límite para el HEX-canal ligeramente superior a la fluorescencia de fondo del MUT-Control (FAM positivo).

Las muestras, que excedan el valor límite después de C<sub>q</sub> 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 el depósito PCR Master Mix debe mantener 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, recipientes de PCR compatibles con los aparatos para mediciones ópticas cierre adecuado.
- No mezclar reactivos con números de lotes diferentes.
- No utilizar kits o componentes del kit caducados.



# FV Leiden RealFast™ Assay

REF 7-110 / 7-113  $\nabla$  100 / 32 reações

-30°C / -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilização prevista

O FV Leiden RealFast™ Assay é um teste de PCR em tempo real, exato e rápido, utilizado na detecção da mutação 1691G>A no gene *Factor V (FV)* associado à coagulação humana. A mutação pontual, designada por FV Leiden, está associada à trombofilia hereditária. O kit destina-se à identificação de doentes em risco de tromboembolia venosa. O ensaio qualitativo discrimina os três possíveis genótipos de FV 1691G>A num extrato de ADN humano: GG (normal), GA (heterozigótico) ou AA (mutante homozigótico).

Sequência de referência: HGVS: NG\_011806.1 g.41721G>A; NCBI dbSNP: rs6025.

## 2. Introdução

O FV tem um papel essencial no processo de coagulação. O FV ativado é clivado e degradado pela proteína C ativada, limitando assim a coagulação sanguínea excessiva. A mutação 1691G>A causa a troca de um único aminoácido na posição 506 (R506Q), que altera um local de clivagem e, subsequentemente, impede a inativação eficaz do FV.

Em portadores do alelo A, a atividade persistente do FV permite que sejam gerados outros fatores de coagulação ativados e, consequentemente, aumenta o risco de formação de coágulos venosos. Cerca de 5% dos caucasianos são portadores heterozigóticos da mutação do FV Leiden. Estes 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.

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 trombóticos venosos.

## 3. Conteúdo do kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 ampola	□ tampa branca	1000 / 320 µl
FV Leiden Assay Mix	1 ampola	■ tampa roxa	550 / 550 µl
FV WT-Control	1 ampola	■ tampa verde	75 / 75 µl
FV MUT-Control	1 ampola	■ tampa vermelha	75 / 75 µl

A RealFast™ 2x Genotyping Mix inclui HotStart Taq DNA polymerase e dNTP num sistema tampão otimizado. A FV Leiden Assay Mix consiste em primers do gene *FV* e duas sondas de hidrólise com dupla marcação e específicas do alelo. Os controlos representantes 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 Leiden 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®. Cada reação contém um par de iniciadores específicos do gene, que amplifica um fragmento de 142 bp do gene *FV*, assim como duas 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 híbrida. A separação física do fluoróforo do corante supressor produz um sinal fluorescente em tempo real, que é proporcional ao produto de PCR acumulado.

Em amostras normais, a **sonda do tipo natural de FV marcada com HEX** é híbrida com a cadeia complementar do fragmento do gene. É detetado um sinal fluorescente forte no canal HEX (556 nm), ao passo que não é detetado qualquer sinal ou é detetado apenas um sinal de base no canal FAM (520 nm). Inversamente, em amostras do mutante homozigótico, a **sonda do mutante FV marcada com FAM** liga-se ao fragmento do gene. É detetado um sinal fluorescente forte no canal FAM, ao passo que não é detetado qualquer sinal ou é detetado apenas um sinal de base no canal HEX. Em amostras heterozigóticas, as sondas do tipo natural e mutantes ligam-se aos ampliões e produzem sinais intermédios em ambos os canais.

### 5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O FV Leiden RealFast™ Assay está validado para a utilização com o instrumento AB 7500 Fast.

O kit é compatível com vários equipamentos comuns de PCR em tempo real com capacidade de registar fluorescência FAM e HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ 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](http://www.viennalab.com).

Ao utilizar o AB StepOne™, configure o supressor de referência passiva para "ROX"! «

O kit é fornecido **sem ROX**. Para a utilização com instrumentos de PCR em tempo real que exijam ROX elevado para a normalização dos dados (por exemplo, instrumentos Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), adicione ROX a uma concentração final de 1 µM à 2x Genotyping Mix.

### 5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi efetuada em 73 alelos com resultado positivo quanto à mutação do FV Leiden utilizando um kit de referência com marcação CE. O FV Leiden RealFast™ Assay determinou todos os 73 alelos como positivos, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 100%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 165 alelos com resultado negativo quanto à mutação do FV Leiden utilizando um kit de referência com marcação CE. O FV Leiden RealFast™ Assay determinou todos os 165 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) e HEX (556 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 **WT-Control** e o FV **MUT-Control** como sinais de referência positiva para as amostras desconhecidas.

Alguns softwares 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 Leiden 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** (mistura principal) 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 Genotyping Mix	10 µl	250 µl
FV Leiden Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master-Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

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:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P** e outros instrumentos de bloco de calor Peltier:

Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	95°C	3 min	Desnaturação inicial
40	95°C	15 sec	Desnaturação
	<b>60°C</b>	1 min	Hibridação/Extensão– <b>Aquisição de dados</b> no canal FAM e HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	95°C	3 min	Desnaturação inicial
40	95°C	15 sec	Desnaturação
	<b>60°C</b> *)for 36-well rotor: <b>56°C</b>	1 min	Hibridação/Extensão– <b>Aquisição de dados</b> no canal Green e Yellow

## 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 (normal)** e os sinais registados no **canal FAM (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.

Controlos	Amplificação no canal <b>FAM (520 nm)</b>	Amplificação no canal <b>HEX (556 nm)</b>	Genótipo
WT-Control	<b>NÃO</b>	<b>SIM</b>	normal
HET-Control	<b>SIM</b>	<b>SIM</b>	heterozigótico
MUT-Control	<b>SIM</b>	<b>NÃO</b>	mutante homozigótico
NTC	<b>NÃO</b>	<b>NÃO</b>	----

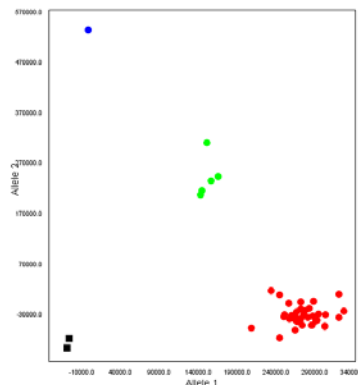
O software de alguns instrumentos requer a definição manual de limiares (threshold) para a determinação exata do genótipo.

Definições de limiar recomendadas (C<sub>q</sub>):

Defina o valor do limiar para o canal FAM imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo WT-Control (HEX positivo). Inversamente, defina o valor do limiar para o canal HEX imediatamente acima do sinal fluorescente de fundo produzido pelo MUT-Control (FAM positivo).

As amostras que ultrapassam o limiar para além de C<sub>q</sub> 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.