Instrucciones de uso

Imegen® Factor V

Ref. IMG-217

CE IVD

Fabricado por:
HEALTH IN CODE, S.L.
Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España
+34 963 212 340 – info@healthincode.com

healthincode.com

Código: HIC-PT-KIT 03-F-03 V.02

healthincode

Health in Code S.L. le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

Nuestros productos están diseñados para uso en diagnóstico *in vitro*. Health in Code S.L. no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Health in Code S.L. respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de estos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Health in Code S.L. no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Health in Code S.L. son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit Imegen® Factor V ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

+34 963 212 340

tech.support@healthincode.com

Imegen® *es una marca registrada de Health in Code S.L. en España.*

Modificaciones de las instrucciones de uso (IUF)		
Versión 10	DIC 2023	Revisión y actualización del apartado "3. Características técnicas".
Versión 09	DIC 2022	Modificación de la temperatura de almacenamiento y envío del reactivo GENERAL MASTER MIX (Sección 5).
Versión 08	NOV 2022	Cambio de dirección del fabricante: Health in Code S.L., Calle de la Travesía s/n, 15E Base 5, Valencia 46024, España.
Versión 07	SEP 2022	Cambio de la identificación del fabricante: de Imegen a HEALTH IN CODE, S.L.
Versión 06	JUL 2019	Incorporación de medidas de seguridad en el apartado 4. Advertencias y precauciones de seguridad. Actualización de la información referente al control positivo del kit en el apartado 2. Uso previsto, apartado 3. Características técnicas y apartado 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit.
Versión 05	DIC 2018	Corrección de los volúmenes en el apartado 7. Protocolo de ensayo.

índice

01 **Información general** 4

02 **Uso previsto** 5

03 **Características técnicas** 6

04 **Advertencias y precauciones de seguridad** 7

05 **Contenido y condiciones de almacenamiento del kit** 8

06 **Equipos y materiales necesarios que no se suministran** 9

07 **Protocolo de ensayo** 10

07.1 | Preparación de las reacciones de amplificación 10

07.2 | Configuración del programa de PCR a tiempo real 10

08 **Análisis de los resultados** 12

09 **Troubleshooting** 14

10 **Limitaciones** 15

10.1 | Equipos 15

10.2 | Reactivos 15

10.3 | Estabilidad del producto 15

01 Información general

El gen *F5* (Leiden), situado en la región cromosómica 1q23, codifica el factor V de coagulación esencial en los procesos de coagulación (hemostasia). Como consecuencia de daño vascular, el factor V se activa e interacciona con el factor X activado, formando un complejo que convierte la protrombina en trombina y ésta a su vez convierte el fibrinógeno en fibrina, ambos asociados con la formación de coágulos sanguíneos. En la trombofilia por factor V de Leiden, existe una única mutación p. Arg506Gln que provoca un factor V anómalo que no puede inactivarse, por lo que el factor V continúa activado y no puede detener el proceso de coagulación.

Referencias

> *https://www.omim.org/entry/612309*

02 Uso previsto

El kit Imegen® Factor V emplea una combinación de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis fluorescentes en un ensayo de PCR a tiempo real validado para detectar el alelo patogénico que da lugar a la variante p. Arg506Gln (NM_000130.4:c.1601G>A) y el alelo normal del gen *FV* (Leiden). Además, utiliza como control positivo ADN genómico heterocigoto para la mutación objeto de análisis del kit.

Imegen® Factor V es sólo para uso diagnóstico *in vitro* y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

03 Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando muestras de ADN de referencia obtenidas a través de *Coriell Institute for Medical Research*, muestras analizadas previamente por el servicio de Genética Médica de Health in Codes S.L. y ADN sintético con una única copia de las secuencias diana (normal o mutante) de la región objeto de análisis del gen *FV*, y detecta específicamente los genotipos esperados.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 50 ng.

04 Advertencias y precauciones

- Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
- No pipetear con la boca.
- No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
- Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
- No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
- En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
- Las hojas de datos de seguridad (MSDS) de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
- Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
- Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
- Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
- El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por Health in Code S.L.
- El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por Health in Code S.L. por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit

05 Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 determinaciones.
La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- ***Factor V Master Mix:*** contiene oligonucleótidos, sondas de hidrólisis fluorescentes (FAM y VIC) y agua para la amplificación y detección de los alelos normal y/o mutante objeto de análisis.
- ***General Master Mix:*** *Master Mix* de PCR con los nucleótidos, $MgCl_2$, enzima y *buffer* necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real.
- ***Positive Control:*** ADN genómico heterocigoto para la mutación objeto de análisis, permitiendo, por tanto, la amplificación simultánea del alelo normal y el alelo mutante objeto de análisis.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Factor V Master Mix	Disco verde	2 x 180 µl	-20°C
General Master Mix	Disco blanco	600 µl	-20°C*
Positive Control	Tapa negra	100 µl	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit Imegen® Factor V

(*) ***General Master Mix***: Se recomienda mantener congelado hasta su primer uso, protegido de la luz, y almacenado entre 2- 8 °C después de su primer uso.

06 Equipos, reactivos y materiales que no se suministran

Equipos:

- Termociclador de PCR a tiempo real (canales FAM y VIC)
- Micropipetas de 10 µL, 20 µL y 200 µL
- *Vortex*
- Centrífuga

Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10 µL, 20 µL, 200 µL)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Material fungible óptico compatible con el termociclador de PCR a tiempo real
- Guantes de látex

Kits complementarios

Para el diagnóstico de neoplasias hematopoyéticas, Health in Code S.L. también ofrece los siguientes ensayos de PCR a tiempo real:

- Imegen® Cambridge II (ref IMG-199)
- Imegen® MTHFR (ref IMG-212)
- Imegen® Factor II (ref IMG-214)
- Imegen® Factor XII (ref IMG-215)
- Imegen® MTHFRII (ref IMG-216)
- Imegen® HFE (ref IMG-218)

Todos ellos, junto con el kit Imegen® Factor V, han sido validados utilizando el mismo programa de PCR a tiempo real, por lo que se pueden analizar conjuntamente.

07 Protocolo de ensayo

07.1 | Preparación de las reacciones de amplificación

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Para llevar a cabo el análisis cualitativo, se recomienda preparar una reacción de amplificación por muestra e incluir un control negativo de PCR, para descartar contaminación de los reactivos, y el control positivo.

> IMPORTANTE: Si en el análisis de resultados se quiere utilizar la herramienta "*auto-calling*" para obtener el genotipado de una muestra automáticamente con el *software* de análisis, se debe incluir un control positivo y un control negativo en el ensayo.

A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

01 Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras. Agitar cada uno de los reactivos en *vortex* y mantener en frío.

02 En un tubo de 1.5 mL preparar el *mix* de PCR añadiendo los siguientes reactivos por muestra:

Reactivos	Cantidad por reacción
Factor V Master Mix	7.5 µL
General Master Mix	12.5 µL

03 Agitar en *vortex* y dar *spin* al *mix* de PCR y dispensar 20 µL en los correspondientes pocillos del material fungible óptico.

04 Añadir 5 µL de las muestras diluidas a una concentración de 10 ng/µL y 5 µl del control positivo, o de agua libre de nucleasas (control negativo) a los pocillos correspondientes.

05 Colocar los tubos o placas en el termociclador de PCR a tiempo real y configurar el programa de amplificación tal y como se indica en el siguiente apartado.

07.2 | Configuración del programa PCR a tiempo real

- **Tipo de experimento**: Genotyping
- **Velocidad de rampa**: Standard
- **Volumen de reacción**: 25 µL

- Referencia basal ROX™: incluida
- Fluoróforos de las sondas TaqMan®:

Sonda	Emisor	Genotipado	Quencher
FV-G-P	VIC™	Normal	MGB
FV-A-P	FAM™	Mutante	MGB

Tabla 2. Información de las sondas

- Programa óptimo:

Campos	Etapa 1 Lectura Pre-PCR	Etapa 2 Activación enzimática	Etapa 3 PCR		Etapa 4 Lectura Post-PCR
No. de ciclos	1 ciclo	1 ciclo	50 ciclos		1 ciclo
			Desnaturalización	Unión de oligonucleótido/ Extensión	
Temperatura	60°C	95°C	95°C	60°C	60°C
Tiempo	1 minuto*	10 minutos	15 segundos	1 minuto*	1 minuto*

Tabla 3. Programa de PCR óptimo para el 7500 FAST o StepOne (Thermo Fisher Scientific)

(*) Detección de la fluorescencia

08 Análisis de resultados

Para un correcto análisis de los resultados se recomienda seguir las siguientes indicaciones:

- Comprobar que en el control negativo de PCR no hay amplificación, ni en el canal FAM ni en el canal VIC.
- Comprobar que en el control positivo hay señal de amplificación tanto en el canal FAM como en el canal VIC.
- Para analizar las muestras hay que emplear un *software* específico del termociclador de PCR a tiempo real utilizado.

A continuación, se muestran los posibles resultados obtenidos con el kit Imegen® Factor V:

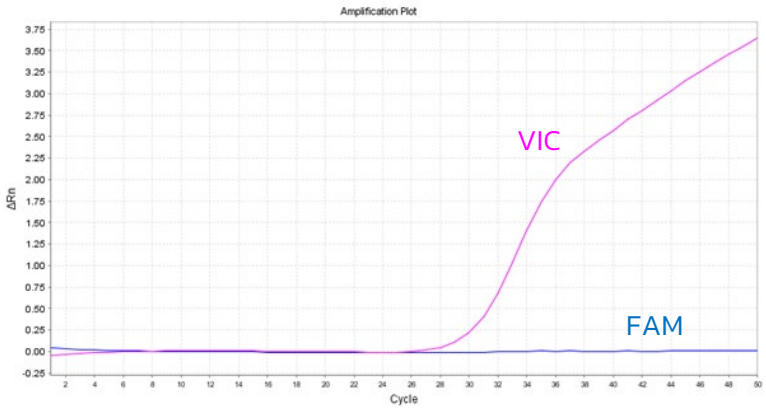

Figura 1. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota normal (G/G). Sólo se observa amplificación en el canal VIC

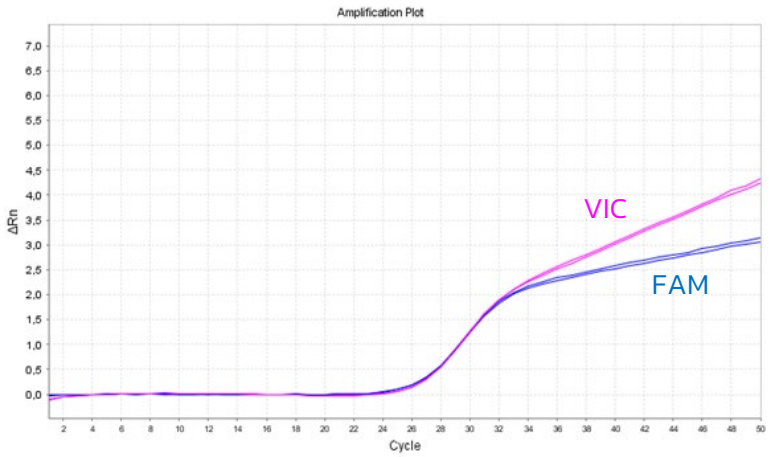

Figura 2 Resultado obtenido a partir de una muestra heterocigota (G/A). Se observa señal en ambos canales, FAM y VIC, siendo la intensidad de fluorescencia mayor en el canal VIC

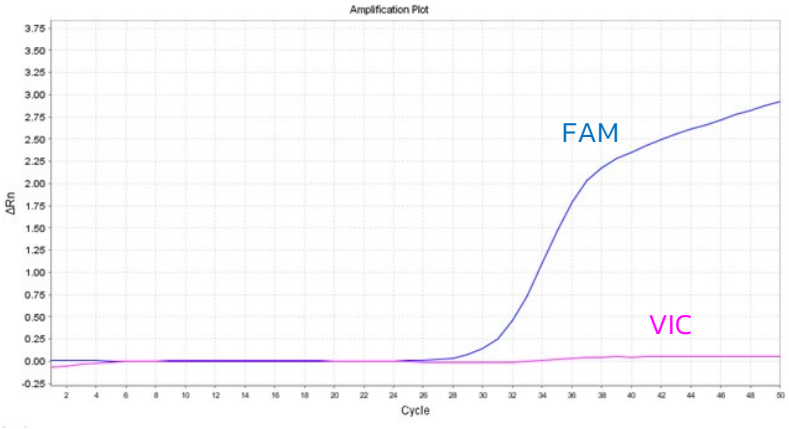

Figura 3. Resultado obtenido a partir de una muestra homocigota mutante (A/A). Solo se observa amplificación en el canal FAM

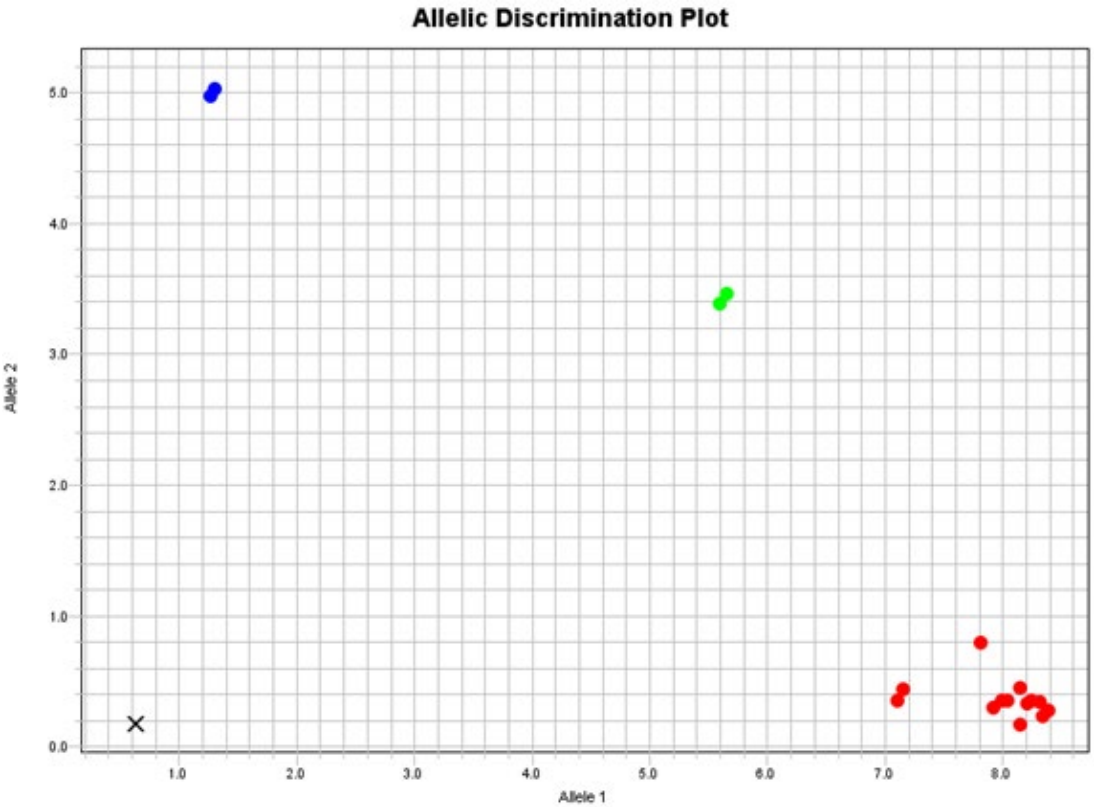

Figura 4. Gráfico de discriminación alélica con el sistema Factor V.

09 Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles y una muestra en un ensayo, así como su interpretación:

Control	Resultado		Causa
	FAM	VIC	
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	–	–	Fallo en la configuración de la PCR [1]
Muestra	+	+	Resultado esperado
	+	–	
	–	+	
	–	–	Fallo de amplificación de la muestra [2]
Control Negativo de PCR	–	–	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN humano [3]
	+	–	
	–	+	

Tabla 4. Interpretación de los posibles resultados

(1) Fallo de amplificación en la PCR: Compruebe el programa de amplificación y la configuración de captura de la fluorescencia. Un fallo en la amplificación puede deberse a un problema técnico en la configuración del programa de PC.

(2) Fallo de amplificación de la muestra: Compruebe que la cuantificación de la muestra es la recomendada, si fuese así el resultado especificado puede deberse a que la muestra se encuentre altamente degradada.

(3) Contaminación de la PCR con ADN de humano: La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Limpie minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada. En este caso se recomienda repetir el ensayo.

10 Limitaciones

10.1 | Equipos

Imegen® Factor V ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- *7500 FAST Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)
- *StepOne Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)
- *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific)

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro soporte técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.2 | Reactivos

Imegen® Factor V se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este documento (Equipos y materiales necesarios que no se suministran).

10.3 | Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.

Contacte con nuestro Departamento Técnico para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos:

tech.support@healthincode.com

+34 963 212 340

healthincode