

cobas[®] **Factor II and Factor V Test**

In vitro diagnosztikai célra



cobas[®] **Factor II and Factor V Test**

96 Tests

P/N: 07948352190

TARTALOMJEGYZÉK

Rendeltetészerű használat.....	4
A teszt összegzése és ismertetése	4
Háttér	4
Az eljárás alapelvei	4
Minta-előkészítés.....	4
PCR-amplifikálás.....	5
Anyagok és reagensek	7
A készlethez tartozó anyagok és reagensek.....	7
A reagensek tárolása és kezelése	7
További szükséges anyagok	8
Szükséges, de nem biztosított eszközök és szoftverek	8
Óvintézkedések és kezelési követelmények.....	8
Figyelmeztetések és óvintézkedések.....	8
Helyes laboratóriumi gyakorlat	9
Szennyeződés	9
Felhasználhatóság.....	9
Hulladékkezelés	10
Kiömlés és tisztítás	10
Minta levétele, szállítása és tárolása.....	10
Mintavétel és -kezelés	10
Minták szállítása, tárolása és stabilitása.....	10
A feldolgozott minták tárolása és stabilitása.....	11
A teszteljárás	11
A teszt futtatása.....	11
Használati utasítás.....	12
Futtatási mennyiség	12
DNS-izolálás.....	12
Amplifikálás és kimutatás	12
A készülék előkészítése	13
A reakció előkészítése	14
Lemez előkészítése.....	15
PCR indítása.....	15

Eredmények.....	16
Eredmények értelmezése	16
Érvénytelen eredményű minták újratestelése.....	16
Minőségellenőrzés és az eredmények érvényessége	16
Eredményjelzők listája	17
Az eljárással kapcsolatos korlátozások	18
A nem klinikai teljesítmény értékelése	19
Analitikai érzékenység	19
DNS-bemenet felső határa	20
A DNS izolálásának reprodukálhatósága.....	20
Analitikai specifitás	21
Zavarást okozó anyagok	21
Gyártási tételek közötti megismételhetőség.....	22
Klinikai teljesítmény értékelése.....	23
Módszerkorreláció: Sanger-féle szekvenáláshoz történő hasonlítás	23
Reprodukálhatóság.....	24
További információk.....	26
Szimbólumok	26
Technikai segítségnyújtás.....	27
Gyártó, importőr és forgalmazó	27
Védjegyek és szabadalmak	27
Szerzői jogok	27
Hivatkozások.....	28
Dokumentumverzió.....	29

Rendeltetésszerű használat

A cobas® Factor II and Factor V Test egy *in vitro* diagnosztikai eszköz, amely valós idejű polimeráz-lánreakció (PCR) segítségével mutatja ki és genotipizálja a humán II. faktor (protrombin) G20210A mutációt és a humán V. faktor Leiden-mutációt K₂EDTA-s teljesvér-mintákból származó genomiális DNS-ből, és ezáltal segítséget nyújt a feltehetőleg trombofiliában szenvedő betegek diagnosztizálásában. A cobas® II. faktor és V. faktor tesztet és a cobas z 480 analizátort együttesen használják automatizált amplifikálásra és kimutatásra.

A teszt összegzése és ismertetése

Háttér

A trombofília olyan állapot, amelynek során a betegek szervezete a véralvadási rendszer örökölt vagy szerzett hibája miatt hajlamos rá, hogy trombózis (azaz vérrögök) alakuljanak ki. A vérrögök mind a vénás, mind az artériás érrendszerben kialakulhatnak, és mélyvénás trombózishoz (DVT) vagy tüdőembóliához (PE) vezethetnek. A DVT és PE közös neve vénás tromboembólia (VTE).¹ A VTE az akut koronáriszindróma és az agyi érkatasztrófa után a harmadik leggyakoribb szív-érrendszeri halálok.²

Az örökölt trombofiliát a leggyakrabban az V. faktor vagy II. faktor (protrombin) génmutáció okozza. Az V. faktor Leiden-mutáció a humán V. faktor gén pontmutációja (G–A csere az 1691-es vagy G1691A pozíción), amelynek eredményeként az V. faktor fehérje 506-os (R506Q) pozíciójában az arginin helyére glutamin kerül. Az V. faktor Leiden-mutáció következtében a fehérje részlegesen ellenállóképes lesz az aktivált C fehérje által történő inaktiválásra (APC). Az APC-rezisztencia a VTE-hez kapcsolódó leggyakoribb véralvadási rendellenesség.^{3,4} A genetikai vizsgálatokból kiderült, hogy az V. faktor Leiden-mutáció előfordulása viszonylag magas a népességben (pl. európaiak körében kb. 5%), és az APC-rezisztenciás esetek 85–95%-áért lehet felelős.⁴ Az V. faktor G1691A mutációján felül a II. faktor G20210A molekuláris genetikai vizsgálata (G–A csere a 20210-es pozíción) is javasolt, mivel ez a mutáció a népesség 1–3%-ában van jelen, és jól ismert a VTE-ben játszott szerepe.⁵⁻⁷ A betegek örökletes trombofiliás kockázatának II. faktor és V. faktor genotípusteszt során történő kiértékelése kritikus szerepet játszik a trombofiliás betegek diagnosztizálásában és kezelésében.

Az eljárás alapelvei

A cobas® II. faktor és V. faktor teszt K₂EDTA-s teljes vérből izolált genomiális DNS-minták valós idejű PCR-elemzése során állapítja meg a II. faktor gén genotípusát a 20210-es pozíción és/vagy az V. faktor gén genotípusát az 1691-es pozíción. A tesztet a cobas z 480 analizátoron végzik. A futtatás érvényességének ellenőrzése érdekében minden futtatás tartalmaz egy pozitív kontrollt (F2F5 PC) és egy negatív kontrollt (F2F5 NC).

Minta-előkészítés

A K₂EDTA-s teljesvér-mintákból a genomiális DNS izolálása olyan DNS-izolálási módszerekkel történhet, amelyek megfelelő koncentrációjú DNS-t eredményeznek ($\geq 0,1$ ng/ μ l).

PCR-amplifikálás

A target kiválasztása

A cobas® II. faktor és V. faktor teszt két olyan PCR primerpárt tartalmaz, amelyek a II. faktor gén 173 bázispáros régióját és az V. faktor gén 233 bázispáros régióját amplifikálják. Ezek tartalmazzák a II. faktor (protrombin), illetve az V. faktor Leiden-mutációjának helyét. A teszt mindkét gén esetében amplifikálja mind a vad típusú, mind a mutáns allélokot.

Targetamplifikálás

A II. faktor és V. faktor cél régióinak amplifikálására *Thermus* Z05 DNS-polimerázt és PCR primereket használnak. Először a genomiális DNS denaturálása és a primer targetszekvenciák felszabadítása céljából a PCR-elegyet felmelegítik. Az elegy kihűlésével az upstream és downstream primerek a II. faktor és V. faktor génekben a target DNS-szekvenciákhoz kapcsolódnak, a Z05 polimeráz pedig két vegyértékű fémkation és feleslegben levő dezoxitimidin-trifoszfátok (dNTP) jelenlétében a cél-DNS-t sablonként használva meghosszabbítja a kapcsolódott primereket. Ezzel a PCR első ciklusa véget ér, és létrejönnek a II. faktor cél régiójának és az V. faktor cél régiójának kétszálú DNS-másolatai (amplikonok). Ez a folyamat több cikluson keresztül ismétlődik, és a II. faktor és V. faktor DNS-mennyisége minden ciklus során lényegében megduplázódik.

Automatizált valós idejű genotipizálás

A cobas® II. faktor és V. faktor teszt valós idejű PCR-technológia segítségével állapítja meg a II. faktor gén genotípusát a 20210-es pozíción és az V. faktor gén genotípusát az 1691-es pozíción. A reakció négy oligonukleotid-próbát tartalmaz, kettőt a II. faktorhoz (G20210A mutáció és vad típusú szekvenciák), és kettőt az V. faktorhoz (G1691A mutáció és vad típusú szekvenciák). Minden oligonukleotid-próba egy jelzőként szolgáló fluoreszcens festékkel van jelölve, valamint egy blokkoló molekulával, amely az érintetlen próbában elnyeli (blokkolja) a jelölőfesték fluoreszcens emisszióját. Az amplifikálás minden egyes ciklusa során a próbák az amplikon-DNS komplementer régióihoz kötődnek, majd az 5'-3'-nukleázaktivitású Z05 DNS-polimeráz hasítja őket. A vad típusú és mutáns próbák hasítása csak akkor történik, amikor a megfelelő vad típusú vagy mutáns II. faktorhoz és V. faktorhoz kötődnek.

A próbamolekulák hasítása lehetővé teszi a jelölőfesték blokkolótól történő elválasztását, így a jelölőfesték fluoreszcenciáját mérni lehet, amikor a reakciót megfelelő hullámhosszú fényel világítják meg. A II. faktor és V. faktor vad típusú és mutáns próbákat különböző jelölőfestékekkel címkézik fel. Ha a valós idejű PCR során bármely jelölőfesték megnövekedett fluoreszcenciáját észlelik, ez azt jelzi, hogy a festéknek megfelelő II. faktor vagy V. faktor allél jelen van a reakcióban. A II. faktor és V. faktor genotípusok meghatározásának alapját az képezi, hogy az egyes génekhez melyik alléleket mutatják ki. Ha egy génhez mind mutáns, mind vad típusú allélokot kimutatnak, a genotípus heterozigóta. Ha csak vad típusú vagy mutáns alléleket mutatnak ki, a genotípus vad típusú, illetve homozigóta mutáns. Ha akár a II. faktor, akár az V. faktor esetében sem vad típusú, sem mutáns allélt nem mutatnak ki, az eredmény mindkét gén esetében érvénytelen.

Szelektív amplifikálás

A mintában lévő targetnukleinsav szelektív amplifikálását a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszt az AmpErase (uracil-N-glikoziláz enzim) és deoxiuridin-trifoszfát (dUTP) segítségével végzi.⁸ Az AmpErase enzim felismeri és katalizálja a deoxiuridin-tartalmú DNS-szálak lebontását, a timidint tartalmazó DNS-ét viszont nem. A deoxiuridin a természetes DNS-ben nincs jelen, ugyanakkor az amplikon-DNS-ben mindig megtalálható, miután a Master Mix reagens a nukleotid-trifoszfátok egyikeként deoxitimidin-trifoszfát helyett dUTP-t használ; tehát csak az amplikon-DNS tartalmaz deoxiuridint. A deoxiuridinnak köszönhetően a szennyező amplikont az AmpErase enzim még a target DNS amplifikálását megelőzően lebontja. A Master Mix reagensben lévő AmpErase enzim azáltal katalizálja a deoxiuridint tartalmazó DNS hasítását a deoxiuridin-maradványoknál, hogy a dezoxiribózláncot a C1 helyen felnyitja. Az első hevítési lépésben lúgos pH-n az amplikon DNS-lánc eltörik a deoxiuridin helyén, tehát a DNS nem lesz amplifikálható. Az AmpErase enzim 55 °C felett, azaz a hevítési lépések során inaktív, és így nem bontja le a targetamplikont.

Anyagok és reagensek

A készlethez tartozó anyagok és reagensek

Készlet	Reagensek és összetevők	Tesztenkénti mennyiség	Biztonsági jelzés és figyelmeztetés ^a
cobas® Factor II and Factor V Test 96 teszt (P/N: 07948352190)	F2F5 MMX (arany gombos kupak) (II. faktor és V. faktor Master Mix) Termostabil DNS polimeráz, AmpErase (uracil-N-glikoziláz), oligonukleotid PCR primerek, fluoreszcens címkézett oligonukleotid próbák, dezoxinukleozid-trifoszfátok, glicerin, dimetil-szulfoxid, nem ionizáló detergens és 0,09% nátrium-azid	4 × 0,6 ml	N/A
	F2F5 COFACTOR (kék gombos kupak) (II. faktor és V. faktor kofaktor) Mangán-acetát, magnézium-acetát, marhaszérumalbumin és 0,09% nátrium-azid	4 × 0,15 ml	N/A: Nem veszélyes anyag vagy elegy. EUH210 Kérésre biztonsági adatlap kapható.
	F2F5 PC (piros gombos kupak) (II. faktor és V. faktor pozitív kontroll) Nem fertőző nukleinsavak 0,05% nátrium-azidot tartalmazó pufferoldatban	4 × 0,05 ml	N/A
	F2F5 NC (kék gombos kupak) (II. faktor és V. faktor negatív kontroll) 0,05% nátrium-azidot tartalmazó pufferoldat	4 × 0,4 ml	N/A

^a A termék biztonsági címkéi megfelelnek az EU GHS előírásainak.

A reagensek tárolása és kezelése

Készlet	Tárolási hőmérséklet	Tárolási idő
cobas® Factor II and Factor V Test	2...8 °C	Felnyitás után a reagensek készletek 90 napon belül 2 használatig vagy a lejárat dátumig stabilak, amelyek előbb következnek.

Megjegyzés: Ne fagyassza le a reagenseket.

További szükséges anyagok

Anyagok	P/N
Fehértőszerszer	Tetszőleges gyártó
70% etanol	Tetszőleges gyártó
cobas ® 4800 rendszer mikrolemez (AD-Plate) és zárófilm	Roche 05232724001
cobas ® 4800 System zárófilm-felhelyező (a cobas ® 4800 rendszer része)	Roche 04900383001
Állítható pipetták* (5–1000 µl adagolókapacitással)	Tetszőleges gyártó
Aeroszolbarrieres vagy pozitív kiszorításos DNáz-mentes pipettahegyek	Tetszőleges gyártó
Asztali mikrocentrifuga* (20 000 × g kapacitású)	Eppendorf 5430 vagy 5430R, vagy ennek megfelelő
Mikrocentrifuga-csővek (1,5 ml RNáz/DNáz-mentes, PCR minőségű)	Life Technologies AM12400 vagy Eppendorf 022364120 vagy ezeknek megfelelő
Állvány kúpos és mikrocentrifuga-csővekhez	Tetszőleges gyártó
Vortex keverő*	Tetszőleges gyártó
Egyszer használatos, púdermentes kesztyűk	Tetszőleges gyártó

* Valamennyi felszerelés megfelelő karbantartását a gyártó utasításai szerint kell végezni.

A külön beszerezhető anyagokkal kapcsolatos további információkért forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.

Szükséges, de nem biztosított eszközök és szoftverek

Szükséges, de nem biztosított eszközök és szoftverek
cobas z 480 analízátor
cobas ® 4800 rendszer vezérlőegység 2.2-es vagy újabb verziójú rendszerszoftverrel
II. faktor és V. faktor elemzőcsomag-szoftver, 1.0-ás vagy újabb verzió
Vonalkódolvasó ext USB
Nyomtató (pl. HP P2055d)

A külön beszerezhető anyagokkal kapcsolatos további információkért forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.

Óvintézkedések és kezelési követelmények

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Mint minden teszteljárásnál, a helyes laboratóriumi gyakorlat alapvető a teszt megfelelő kivitelezéséhez.

- Csak *in vitro* diagnosztikai célra.
- A biztonsági adatlapok (SDS) igény esetén hozzáférhetőek a helyi Roche irodában.
- Minden mintát fertőzőként, megfelelő biztonságos laboratóriumi eljárásokat alkalmazva kell kezelni. Ilyeneket ír le például a Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁹ és a CLSI Document M29-A4.¹⁰
- Steril, egyszer használatos pipetták és DNázmentes pipettahegyek használata javasolt.
- Ha a vizsgálat használatakor súlyos nem várt esemény történik, tájékoztassa róla a helyi illetékes hatóságot.

Helyes laboratóriumi gyakorlat

- Ne pipettázzon szájjal.
- Ne egyen, igyon vagy dohányozzon a laboratórium munkaterületén.
- A minták és reagensek kezelése után alaposan mosson kezet.
- Viseljen szemvédőt, védőruhát és egyszer használatos védőkesztyűt minden reagens kezelése közben. Ezen anyagok bőrrel, szemmel és nyálkahártyával való érintkezése kerülendő. Ha mégis érintkezésbe kerülnek, azonnal öblítse le bő vízzel. Ellenkező esetben égés történhet. Ha reagens ömlik ki, mielőtt feltörölné, hígítsa vízzel.
- Gondosan tisztítson meg, és desztillált vagy ioncserélt vízből frissen készített 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldattal (1:10 arányban hígított háztartási fehérítőszer) fertőtlenítsen minden laboratóriumi munkafelületet. Utána törölje át a felületet 70%-os etanollal.

Megjegyzés: *A kereskedelemben kapható háztartási fehérítő rendszerint 5,25% koncentrációban tartalmaz nátrium-hipokloritot. Az 1:10 arányban hígított háztartási fehérítő 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldatnak felel meg.*

Szennyeződés

- Viseljen kesztyűt. A minták és a cobas® II. faktor és V. faktor tesztreagensek kezelése között a szennyeződés megelőzése érdekében cseréljen kesztyűt. A minták kezelése során kerülje a kesztyűk szennyezését.
- A DNS-izolációs terület elhagyása előtt vagy ha lehetséges, hogy oldatokhoz vagy mintához ért, cseréljen kesztyűt.
- Kerülje a reagens mikrobiális szennyezését.
- Az amplifikálási és kimutatási munkaterületet alaposan meg kell tisztítani az MMX munkareagens elkészítése előtt. Valamennyi művelethez tartozó felszerelést és eszközt jelölni kell, és tilos más művelethez használni vagy más területre átvinni. A DNS-izoláláshoz használt pipettákat és eszközöket például nem szabad az amplifikáláshoz vagy kimutatáshoz használt reagens elkészítéséhez használni.
- Erősen ajánlott a laboratóriumi folyamatokat egyirányúként szervezni, vagyis egy tevékenység megkezdése előtt az előzőt ajánlatos befejezni. A DNS-izolálást például be kell fejezni az amplifikálás és a kimutatás megkezdése előtt. A DNS-izolálást az amplifikálás és a kimutatás területétől elkülönített helyen kell végezni. Annak érdekében, hogy a Master Mix munkareagens ne szennyeződjön DNS-mintákkal, az amplifikálás és a kimutatás munkaterületét a Master Mix előkészítése előtt alaposan meg kell tisztítani.

Felhasználhatóság

- Ne használja a készleteket a lejáratí idó után.
- Ne öntsön össze különböző készletekből vagy gyártási tételekből származó reagenseket.
- Ne keverje a különböző készlettételekből származó reagenscsöveket.
- Ne használjon egyszer használatos anyagokat a lejáratí idó után.
- Az egyszer használatos termékeket csak egyszer szabad felhasználni. Ne használja őket újra.
- Ne használjon láthatóan sérült vagy szivárgó reagenseket és edényeket.
- Valamennyi felszerelést a gyártó utasításai szerint megfelelően karban kell tartani.

Hulladékkezelés

- Az F2F5 MMX, F2F5 COFACTOR, F2F5 PC és az F2F5 NC nátrium-azidot tartalmaznak. A nátrium-azid az ólom- és rézcsövekkel reakcióba lépve erősen robbanékony fém-azidokat képezhet. Amikor nátrium-azid tartalmú oldatot önt ki a laboratóriumi mosogatóba, nagy mennyiségű hideg vízzel öblítse a lefolyót az azidlerakódás megakadályozása érdekében.
- A fel nem használt reagensek és hulladék kezelésének összhangban kell lennie a megfelelő országos, szövetségi, állami és helyi szabályozásokkal.

Kiömlés és tisztítás

- Ha potenciálisan fertőző ágenszt tartalmazó folyadék ömlik ki, először laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel, majd 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldattal tisztítsa meg az érintett területet.
- Ha a cobas® 4800 készülékre folyadék ömlik, a **cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletének** utasításai alapján tisztítsa meg.
- Ne használjon nátrium-hipoklorit-oldatot (fehérítőszer) a **cobas z 480** analizátor tisztításához. A **cobas z 480** analizátort a megfelelő **cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében** leírt eljárások alapján tisztítsa.
- A **cobas z 480** analizátor fertőzési kockázatának csökkentésére vonatkozó további figyelmeztetéseket, óvintézkedéseket és eljárásokat a **cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében** találja.

Minta levétele, szállítása és tárolása

Megjegyzés: Valamennyi mintát fertőzések átvitelére alkalmasként kell kezelni.

Mintavétel és -kezelés

A cobas® II. faktor és V. faktor tesztet K₂EDTA-val alvadásgátolt emberi teljesvér-mintákból izolált genomiális DNS-en történő használat céljából fejlesztették ki. A teljesvér-mintákból izolált DNS-t azonnal tesztelni lehet, vagy a használt DNS-izolációs készlet ajánlásai szerint lehet tárolni.

Minták szállítása, tárolása és stabilitása

A K₂EDTA-val alvadásgátolt teljesvér-mintákat 2–30 °C hőmérsékleten, illetve fagyasztva lehet szállítani (1. táblázat). A cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredményei változatlanok maradnak, ha a teljesvér-mintákat három alkalommal lefagyasztják és felolvasztják. A teljesvér-minták szállításának meg kell felelnie az etiológiai anyagok szállítására vonatkozó országos, szövetségi, állami és helyi szabályozásoknak.¹¹

1. táblázat Teljes vér stabilitása

Teljes vér tárolási hőmérséklete	15...30 °C	2...8 °C	-15...-25 °C
Tárolási idő	Legfeljebb 3 nap	Legfeljebb 7 nap	Legfeljebb 6 hét

A feldolgozott minták tárolása és stabilitása

A K₂EDTA-val alvadásgátolt teljesvér-mintákból izolált genomiális DNS-t azonnal tesztelni lehet, vagy a használt DNS-izolációs készlet gyártói ajánlásai szerint lehet tárolni. Az izolált DNS-t az ajánlott tárolási időtartamon belül kell felhasználni, vagy annak a kereskedelmi DNS-izolációs készletnek a lejárati dátuma előtt, amellyel a DNS kivonása történt (amelyik hamarabb következik). A házon belüli tesztelés a 2. táblázatban láthatók szerint támogatja a genomiális DNS stabilitását. A tárolt genomiális DNS-minták használata előtt a mintát tartalmazó csövet érintéssel (meg-megszakítva) vortexelje. A cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredményei változatlanok maradnak, ha a genomiális DNS-mintákat három alkalommal lefagyasztják és felolvasztják.

2. táblázat Genomiális DNS stabilitása

A kivont DNS tárolási hőmérséklete	2...8 °C*	-15...-25 °C*
Tárolási idő	Legfeljebb 7 nap	Legfeljebb 6 hét

* Az adatokat három kereskedelemben kapható DNS-izolálási módszer segítségével generálták

A teszteljárás

A teszt futtatása

3. táblázat cobas® II. faktor és V. faktor teszt munkafolyamata

1	Ha a DNS-t nem teljesvér-mintákból izolálták, a DNS izolálása
2	A tárolt DNS-minták és tesztreagensek elővétele
3	A cobas® 4800 rendszer indítása
4	A készülék karbantartásának elvégzése
5	Munkamenet létrehozása és a lemezelrendezés nyomtatása
6	Az amplifikálási reagensek előkészítése
7	Az amplifikálási reagensek mikrolemmezre helyezése
8	A minták és kontrollok mikrolemmezre helyezése
9	A mikrolemmez lezárása
10	A mikrolemmez cobas z 480 analizátorra helyezése
11	A futtatás indítása
12	Az eredmények áttekintése
13	LIS esetén: az eredmények LIS-be küldése
14	Az eszközök és anyagok kivétele az analizátorból

Használati utasítás

Megjegyzés: A cobas z 480 analizátorra vonatkozó részletes használati utasításokat a cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében találja.

Futtatási mennyiség

Egyetlen futtatás 96 lyukú mikrolemezenként 1–94 mintát (plusz két kontrollt) tartalmazhat. A cobas® II. faktor és V. faktor tesztkészlet elegendő reagenst tartalmaz 96 minta tesztelésére készletenként legfeljebb nyolc tesztcsoportban.

DNS-izolálás

1. A genomiális DNS-t K₂EDTA-val alvadásgátolt emberi teljes vérből izolálja olyan DNS-izolálási módszerrel, amely átlátszó és színtelen, valamint megfelelő koncentrációjú ($\geq 0,1$ ng/ μ l) genomiális DNS-minták előállítására képes.
2. A DNS-izolálási eljárás során F2F5 NC-t használhatnak a DNS-izolálás során történt szennyeződés kontrollálására, illetve ezt közvetlenül feldolgozás nélkül is használhatja a cobas® II. faktor és V. faktor teszt során.
3. Az F2F5 PC-t DNS-izolálás nélkül használják a cobas® II. faktor és V. faktor tesztben. A F2F5 PC-n ne végezzen DNS-izolálást.
4. Az izolált genomiális DNS-t azonnal tesztelheti a cobas® II. faktor és V. faktor teszttel, vagy a DNS-izolálókészlet gyártójának ajánlásai alapján tárolhatja.

Amplifikálás és kimutatás

Megjegyzés: *Annak érdekében, hogy az MMX munkareagens DNS-mintával történő szennyeződését elkerülje, az amplifikálást és kimutatást a DNS-izolálástól elkülönített területen kell végezni. Az MMX munkareagens elkészítése előtt az amplifikálási és kimutatási munkaterületet alaposan meg kell tisztítani. A megfelelő tisztításhoz valamennyi felületet, például az állványokat és pipettákat, gondosan le kell törölni 0,5%-os nátrium-hipoklorit-oldattal, majd 70%-os etanololdattal. A kereskedelembe kapható háztartási fehérítő rendszerint 5,25% koncentrációban tartalmaz nátrium-hipokloritot. Az 1:10 arányban hígított háztartási fehérítő 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldatnak felel meg.*

Munkamenet és a lemezek elrendezése

A munkafolyamat lépéseinek részletes leírását a cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében találja.

Állítsa össze a munkamenetet és lemezelrendezést a futtatás összes mintájának és kontrolljának pozíciója alapján.

Az F2F5 PC-t a lemezen az A01 pozícióba kell helyezni, az F2F5 NC-t pedig a lemezen a B01 pozícióba. Ezt követően a genomiális DNS-mintákat a 4. táblázatban látható módon a C01–H01, C02–H02, stb. lyukakba kell betölteni.

4. táblázat Lemezek elrendezése a cobas® II. faktor és V. faktor tesztben

Sor / Oszlop	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	PC ^a	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
B	NC ^b	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
C	S1 ^c	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
D	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
E	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
F	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92
G	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S93
H	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S94

^a PC = **F2F5 PC**

^b NC = **F2F5 NC**

^c S = minta

A készülék előkészítése

1. Kapcsolja be a **cobas z** 480 analízátort. A készülék felmelegedéséhez több percre van szükség, és addig nem indítható futtatás.
2. Kapcsolja be a vezérlőegységet. A vezérlőegység automatikusan bejelentkezik a Windowsba.
3. Kattintson duplán a **cobas®** 4800 szoftver ikonjára, és a futtatás végrehajtásához jelentkezzen be a megadott laboratóriumi felhasználónévvel és jelszóval.
4. Kattintson a menü „New Run” ikonjára.
5. Megjelenik a „Select Test” előugró ablak. Válassza a „PCR Only” munkafolyamat-típust, majd az „F2F5”-öt, és kattintson az „OK” gombra.
6. Amikor megjelenik a „Work Place” képernyő, kattintson a „Microwell Plate ID” mezőre, és gépelje be vagy olvassa be a mikrolemez (MWP) vonalkódját. Szükség szerint adja meg a megjegyzéseket a „Comments” mezőben.
7. Kattintson az első készlet vonalkódsorában az „F2F5 Test Kit-ID” mezőre, majd gépelje be vagy olvassa be a **cobas®** II. faktor és V. faktor tesztkészlet azonosító vonalkódját. Ugyanennek a sornak a „Specimen” mezőjébe gépelje be a futtatás során tesztelendő minták számát.
 - a. Egyetlen készlet-gyártásitétel használata esetén legfeljebb 94 mintát adhat meg az első készlet vonalkódsorában (2 eredmény az **F2F5 PC** és **F2F5 NC** számára van fenntartva).
 - b. Ha ugyanabból a gyártási tételből több készletet használ (legfeljebb 4 készletet), adja meg a **cobas®** II. faktor és V. faktor tesztkészlet azonosító vonalkódját az „F2F5 Test Kit-ID” mezőben és az adott készlettel tesztelendő minták számát a „Specimen” mezőben. Minden készlethez egy készlet vonalkódsorát használja.
 - c. AD-lemezenként maximum 94 mintát és 2 kontrollt használhat.

8. A szoftver a „Sample ID” mezőt automatikusan kitölti a megfelelő kontrollpozíciókkal (A01 és B01). Gépelje vagy olvassa be a „Sample ID” értékét a mintaazonosítókat tartalmazó oszlop minden mintájához. Egy adott futtatáson belül mindegyik mintaazonosítónak egyedinek kell lennie. A „Kit” és „Sample Type” mezőket a rendszer automatikusan tölti ki.
9. Mindegyik mintához válassza ki a „Requested Result” értékét: „F2”, ha csak II. faktort használ, „F5”, ha csak V. faktort használ, illetve „F2F5”, ha mind II. faktort, mind pedig V. faktort használ.
10. Szükség szerint adja meg az egyes mintákhoz tartozó megjegyzéseket.
11. Amikor minden információt megadott, kattintson a képernyő jobb alsó sarkában található „Save” gombra.
12. Mentse a fájlt a szoftver által adott alapértelmezett fájlneven.
13. Nyomtassa a futtatás összes mintájának és kontrolljának a pozícióját tartalmazó lemezelrendezést: kattintson a „Print” gombra, és válassza a „Preview” ablakban a „File” -> „Print” menüpontokat. A lemezt mindig oszloponként töltsse ki, először az F2F5 PC-t az A01 pozícióban, majd az F2F5 NC-t a B01 pozícióban. Rendelje hozzá a mintákat a C01 pozíciótól lefelé a H01 pozícióig, majd folytassa az A02–H02 pozíciókkal, az A03-tól H03-ig terjedő pozíciókkal, és így tovább, amíg minden mintát pozícióhoz nem rendelt.

A reakció előkészítése

A Master Mix munkareagens előkészítése

Megjegyzés: Az F2F5 MMX és az MMX munkareagens (MMX és COFACTOR) fényérzékenyek: védeni kell őket a tartós fényhatástól. Az MMX munkareagenst tárolja sötétben 2 °C és 8 °C között.

Megjegyzés: Az izolált DNS-mintákat és kontrollokat 1 órán belül hozzá kell adni az elkészített MMX munkareagenshez. Az amplifikálást a feldolgozott minták és kontrollok MMX munkareagenshez adásától számított 1 órán belül meg kell kezdeni.

Megjegyzés: Az F2F5 MMX színe világoskék/lila lehet. Ez nem befolyásolja a reagens minőségét.

1. Az F2F5 MMX szükséges mennyiségét a következő képlettel számolja ki:

$$\text{F2F5 MMX szükséges mennyisége} = (\text{minták száma} + 2 \text{ kontroll} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Az F2F5 COFACTOR szükséges mennyiségét a következő képlettel számolja ki:

$$\text{F2F5 COFACTOR szükséges mennyisége} = (\text{minták száma} + 2 \text{ kontroll} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

A 5. táblázat segítségével a futtatásban résztvevő minták száma alapján határozhatja meg az MMX munkareagenshez szükséges F2F5 MMX és F2F5 COFACTOR mennyiségét.

5. táblázat MMX munkareagens reagensmennyiségei

		Mintaszám ^a						
		1	2	3	6	9	12	24
MMX	20 µl	80	100	120	180	240	300	540
COFACTOR	5 µl	20	25	30	45	60	75	135
MMX munkareagensök össztérfogata (µl)		100	125	150	225	300	375	675

^a Az MMX és COFACTOR mennyiségének alapját a tesztelendő minták száma + 2 kontroll + 1 plusz reakció képezi.

3. Vegye ki a hűtőből a 2 és 8 °C között tárolt megfelelő számú **F2F5 MMX** és **F2F5 COFACTOR** csövet. Használat előtt vortexelje mindegyik reagenst 5 másodpercig, és gyűjtse a cső aljára a folyadékot.
4. Lásson el jelöléssel steril mikrocentrifuga-csöveket mindegyik legfeljebb 24 mintából álló csoport MMX munkareagenséhez.
5. Mérje az **F2F5 MMX** kiszámított mennyiségét a felcímkézett csőbe.
6. Mérje az **F2F5 COFACTOR** kiszámított mennyiségét a felcímkézett csőbe.
7. A megfelelő keveredés érdekében vortexelje az MMX munkareagenst tartalmazó csövet 3–5 másodpercig.

Megjegyzés: *A mintákat és kontrollokat az MMX munkareagens elkészítésétől számított 1 órán belül a mikrolemezre (AD-lemez) kell helyezni.*

Megjegyzés: *Csak cobas® 4800 rendszerhez tartozó mikrolemezt (AD-lemez) és zárófilmet használjon.*

Lemez előkészítése

Megjegyzés: *Ha tárolt genomiális DNS-mintákat használ, kövesse a „Feldolgozott minták tárolása és stabilitása” című részben leírt utasításokat.*

1. Az előzőleg elkészített lemeztérkép alapján pipettázzon 25 µl **MMX** munkareagenst a futtatáshoz használt minden reakciólyukba a mikrolemezen (AD-lemez). Ügyeljen, hogy a pipetta hegye ne érjen a lemezhez a lyukakon kívül.
2. Pipettázzon 25 µl **F2F5 PC-t** a mikrolemez (AD-lemez) **A01** lyukába; legalább kétszeri felszívással és kiürítéssel keverje jól össze a lyukon belül a pipettával.
3. Új pipettaheggyel pipettázzon 25 µl **F2F5 NC-t** a mikrolemez (AD-lemez) **B01** lyukába; legalább kétszeri felszívással és kiürítéssel keverje jól össze a lyukon belül a pipettával.

Megjegyzés: *Minden futtatásnak tartalmaznia kell F2F5 PC-t az A01 lyukban és F2F5 NC-t a B01 lyukban, különben a futtatást a cobas z 480 analízátor érvényteleníti.*

Megjegyzés: *Szükség szerint cseréljen kesztyűt, hogy megelőzze a minta–minta átszennyeződést, valamint a PCR reakciócső külső eredetű szennyeződését.*

4. A C01 pozíciótól kezdve adjon 25 µl-t mindegyik DNS-mintából a mikrolemez (AD-lemez) megfelelő lyukához a fentiek szerint elkészített lemezelrendezés alapján. Minden mintához új pipettahegyet használjon. Keverje jól össze az összes lyukat úgy, hogy a pipettát a lyukon belül legalább kétszer felszívja és kiüríti. Ellenőrizze, hogy az összes folyadék a lyukak aljára gyűlt-e.

Megjegyzés: *Használat előtt érintéssel (meg-megszakítva) vortexelje a tárolt genomiális DNS-mintákat.*

5. Fedje le a mikrolemezt (AD-lemezt) a zárófilmmel (a lemezek mellé jár). A zárófilm-felhelyező segítségével rögzítse a filmet szilárdan a mikrolemezre (AD-lemezre).
6. A PCR indítása előtt ellenőrizze, hogy az összes folyadék az egyes lyukak aljára gyűlt.

Megjegyzés: *Az amplifikálást a feldolgozott minták és kontrollok MMX munkareagenshez adásától számított 1 órán belül meg kell kezdeni.*

PCR indítása

A munkafolyamat lépéseire vonatkozó részletes utasításokat a **cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében** találja.

Eredmények

Eredmények értelmezése

Megjegyzés: A futtatások és minták validálását a cobas® 4800 szoftver végzi.

Megjegyzés: Egy érvényes futtatás érvényes és érvénytelen mintaeredményeket is tartalmazhat.

A szoftver az érvényes futtatáshoz a minták eredményeit a 6. táblázat szerint értelmezi.

6. táblázat Eredmények értelmezése a cobas® II. faktor és V. faktor tesztben

Teszteredmény	Értelmezés
WT F2	A genomiális DNS-minta II. faktor (protrombin) mutációra vad típusú. A II. faktor gén 20210-es pozíciójában található nukleotid mindkét allélon G.
HET F2	A genomiális DNS-minta II. faktor (protrombin) mutációra heterozigóta. A II. faktor gén 20210-es pozíciójában található nukleotid az egyik allélon G, a másikon A.
MUT F2	A genomiális DNS-minta II. faktor (protrombin) mutációra homozigóta mutáns. A II. faktor gén 20210-es pozíciójában található nukleotid mindkét allélon A.
WT F5	A genomiális DNS-minta V. faktor (Leiden) mutációra vad típusú. Az V. faktor gén 1691-es pozíciójában található nukleotid mindkét allélon G.
HET F5	A genomiális DNS-minta V. faktor (Leiden) mutációra heterozigóta. Az V. faktor gén 1691-es pozíciójában található nukleotid az egyik allélon G, a másikon A.
MUT F5	A genomiális DNS-minta V. faktor (Leiden) mutációra homozigóta mutáns. Az V. faktor gén 1691-es pozíciójában található nukleotid mindkét allélon A.
Invalid	A minta eredménye érvénytelen. Az érvénytelen eredményű minták vizsgálatát ismétlje meg az alábbi „Érvénytelen eredményű minták ismételt tesztelése” című részben írtak szerint.
Failed	Hibás futtatás hardver- vagy szoftverhiba miatt. Műszaki segítségért vegye fel a kapcsolatot a Roche helyi szervizével.

Érvénytelen eredményű minták újratestelése

- Ha a futtatás érvénytelen, ismétlje meg a teljes tesztelést az összes mintára a genomiális DNS-től kezdve.
- Ha a futtatás érvényes, de az egyes mintaeredmények érvénytelenek, ismétlje meg a vizsgálatot az érvénytelen mintá(k)ra a genomiális DNS-sel kezdve. Ha az ismételt teszt még mindig érvénytelen, ismétlje meg a genomiális DNS-izolálást a teljesvér-mintá(k)ból.

Minőségellenőrzés és az eredmények érvényessége

Minden futtatáshoz tartozik egy készlet cobas® II. faktor és V. faktor kontroll (F2F5 PC és F2F5 NC). Egy futtatás akkor érvényes, ha mind az F2F5 PC, mind az F2F5 NC érvényes. Ha egy F2F5 PC vagy F2F5 NC érvénytelen, az egész futtatás érvénytelen, és meg kell ismétlni. Ha a F2F5 PC vagy F2F5 NC eredményei következetesen érvénytelenek, technikai segítségért vegye fel a kapcsolatot a Roche helyi kirendeltségével.

Eredményjelzők listája

A „Results” lapon eredményjelzőket talál. A jelzők forrását az alábbi 7. táblázatban látható módon a jelzők kódja tartalmazza. A 8. táblázat a felhasználó számára releváns minden értelmezési jelzőt tartalmaz.

7. táblázat Jelzők forrása

A jelzőkód első betűje	Jelző forrása	Példa
M*	Több vagy egyéb ok	M6
R	Az eredmény értelmezése	R20
Z*	Analizátor	Z1

* További információkat a **cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében** talál.

8. táblázat Eredményértelmezési jelzők listája

Jelzőkód	Súlyosság	Leírás	Javasolt teendő
R2900, R2904, R2908, R2912	Hiba	Érvénytelen pozitív kontroll	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a könyökmódszer algoritmusában olyan hibát talált, amely atipikus vagy zajos fluoreszcenciáminta esetén merülhet fel.
R2901, R2905, R2909, R2913	Hiba	Érvénytelen pozitív kontroll	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a pozitív kontroll legalább egy csatornájában negatív eredmény jelentkezett.
R2902, R2906, R2910, R2914	Hiba	Érvénytelen pozitív kontroll	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a pozitív kontroll egy megfigyelt Ct-értéke a meghatározott küszöbérték felett volt (azaz a könyök túl magas). Ennek lehetséges okai: 1. Master Mix munkareagens hibás elkészítése. 2. Pipettázási hiba a Master Mix munkareagensnek a mikrolemez egyik lyukába adagolásakor. 3. Pipettázási hiba a pozitív kontrollnak a mikrolemez egyik lyukába adagolásakor.
R2903, R2907, R2911, R2915	Hiba	Érvénytelen pozitív kontroll	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a pozitív kontroll egy megfigyelt Ct-értéke a meghatározott küszöbérték alatt volt (azaz a könyök túl alacsony). Ez a hiba DNS-szennyeződés esetén merülhet fel.
R2916	Hiba	Pozitív kontroll nem mutatható ki.	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ez a jelző azt jelzi, hogy a pozitív kontroll esetében minden csatornán negatív eredmény jelentkezett. Lehetséges, hogy a pozitív kontroll DNS-ét nem adták hozzá a kontroll-lyukhoz.
R2917, R2919, R2921, R2923	Hiba	Érvénytelen negatív kontroll	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a könyökmódszer algoritmusában olyan hibát talált, amely atipikus vagy zajos fluoreszcenciáminta esetén merülhet fel.
R2918, R2920, R2922, R2924	Hiba	Érvénytelen negatív kontroll	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a negatív kontroll esetében pozitív eredmény jelentkezett (azaz szennyeződési esemény történt).
R2925, R2928, R2931, R2934, R2940, R2941, R2942, R2943	Hiba	Érvénytelen eredmény	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a könyökmódszer algoritmusában olyan hibát talált, amely atipikus vagy zajos fluoreszcenciáminta esetén merülhet fel.
R2926, R2929, R2932, R2935	Hiba	Érvénytelen eredmény	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a rendszer mintával kapcsolatos atipikusan magas Ct-értéket észlelt.
R2927, R2930, R2933, R2936	Hiba	Érvénytelen eredmény	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a rendszer mintával kapcsolatos atipikusan alacsony Ct-értéket észlelt.

Jelzőkód	Súlyosság	Leírás	Javasolt teendő
R2937, R2938	Hiba	Érvénytelen eredmény	Ismételje meg a mintát. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a gének egyikének (azaz II. faktor vagy V. faktor) esetében az eredmények nem voltak érvényesek. Ha egyik gén esetében sincs érvényes eredmény, a rendszer megszünteti a gének egymásnak biztosított belső kontrollfunkcióját, és a következő lehetőségeket veti fel: 1. Rossz minőségű genomiális DNS a mintában. 2. Elégtelen mintafeldolgozás. 3. PCR-inhibitorok jelenléte a mintában. 4. Ritka mutációk a primerek és/vagy próbák által lefedett genomiális DNS régióiban. 5. Lehetséges, hogy egy vagy több lyukba nem adagoltak minta-DNS-t. 6. Egyéb tényezők.
R2939	Hiba	A célok nem mutathatók ki	Ismételje meg a futtatást. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ez a jelző azt jelzi, hogy a minta esetében minden csatornán negatív eredmény jelentkezett. Lehetséges, hogy a genomiális DNS-t nem adták hozzá a lyukhoz.
R2944, R2945	Hiba	Érvénytelen eredmény	Ismételje meg a mintát. Nézzon utána a teszthez tartozó használati utasításban. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a rendszer a mintában atipikus kapcsolatot észlelt bizonyos adatelemzési paraméterek között.

Az eljárással kapcsolatos korlátozások

1. Az érvényes eredmények a mintában levő genomiális DNS mennyiségétől függenek, és a minta integritása, az izolált DNS koncentrációja és a zavaró anyagok jelenléte is befolyásolhatják őket.
2. A DNS-izolálási módszerek eredménye átlátszó és szintelen DNS kell, hogy legyen, amelynek koncentrációja $\geq 0,1$ ng/ μ l.
3. A hemoglobin a PCR inhibitora. A teljes vérből izolált genomiális DNS átlátszó és szintelen kell, hogy legyen. Ha a minta árnyalata vagy színe piros, rózsaszín, vagy rozsdaszín, illetve ha nem átlátszó és nem szintelen, az eredmények érvénytelenek vagy hibásak lehetnek, és ezeket nem szabad tesztelni.
4. Az eredmény megbízhatósága a minták megfelelő szállításától, tárolásától és feldolgozásától függ. Kövesse a jelen használati utasításban és a **cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében** leírt eljárásokat.
5. Az AmpErase enzim **cobas®** II. faktor és V. faktor teszt Master Mixhez adása lehetővé teszi a target DNS szelektív amplifikálását, ugyanakkor a reagensek szennyeződésének elkerüléséhez a helyes laboratóriumi gyakorlat és a jelen használati utasításban meghatározott eljárások gondos betartása szükséges.
6. A terméket csak a PCR-technikák alkalmazására és a **cobas®** 4800 rendszer használatára kiképzett dolgozók használhatják.
7. Csak a **cobas z 480** analízátort validálták a termékkel való használatra. A termékkel más, valós idejű optikai kimutatással működő PCR-készüléket nem lehet használni.
8. A technológiák különbözősége miatt javasolt, hogy a technológiák váltását megelőzően a felhasználók végezzenek korrelációs laboratóriumi vizsgálatokat, hogy a technológiák közötti különbség minősíthető legyen.
9. Ritkán, de előfordulhat, hogy a **cobas®** II. faktor és V. faktor tesztben használt primerek vagy próbák által lefedett II. faktor gén és V. faktor gén genomiális DNS régióiban lévő mutációk következtében nem sikerül kimutatni a II. faktor G20210A mutációját vagy az V. faktor G1691A mutációját.
10. A PCR-inhibitorok jelenléte érvénytelen vagy helytelen eredményeket okozhat.

11. A kereskedelmi DNS-izoláló készletek a lízisreagensben gyakran olyan kaotróp sókat tartalmaznak, mint a guanidin-hidroklorid, a mosópufferben pedig etanol. A genomiális DNS-mintákban található kaotróp sók vagy etanol érvénytelen vagy helytelen eredményeket okozhatnak. A lízisreagens és mosópuffer DNS-izolálási folyamat során történő megfelelő eltávolításának biztosítása érdekében kövesse a gyártó DNS-izolálási módszerekre vonatkozó utasításait.

A nem klinikai teljesítmény értékelése

A következő adatok a cobas® II. faktor és V. faktor teszt analitikai teljesítményét mutatják.

Analitikai érzékenység

A helyes II. faktor és V. faktor genotípuseredményekhez szükséges genomiális DNS minimális bemenő mennyiségének meghatározásához a három K₂EDTA-s teljesvér-mintából (II. faktor heterozigóta, V. faktor heterozigóta, V. faktor homozigóta mutáns) és egy sejtvonalból (II. faktor homozigóta mutáns) genomiális DNS-t izoláltak. Ennek során három különböző kereskedelmi DNS-izolálási módszert alkalmaztak a teljesvér-mintákhoz, és egy módszert a sejtvonalhoz. Mindegyik genomiális DNS-mintát 10 koncentrációban tesztelték a cobas® II. faktor és V. faktor teszttel: hígítatlan (6 és 38 ng/μl között) és kilenc sorozathígítás 1,0 és 0,0001 ng/μl között. Mindegyik hígítást két készlettel 24 ismétléssel tesztelték. Ez genomiális DNS-mintaként és koncentrációként összesen 48 ismétlést eredményezett. A hígítatlan genomiális DNS-mintákat készletként hat ismétléssel tesztelték. Ez genomiális DNS-mintaként összesen 12 ismétlést eredményezett.

A helyes II. faktor és V. faktor genotípuseredmények a négy mintában, mind a három DNS-izolálási módszerben és mindkét készlettelben 98%-ot tettek ki 0,01 ng/μl-en, és 100%-ot magasabb koncentrációkon (9. táblázat).

A cobas® II. faktor és V. faktor tesztet úgy tervezték, hogy túl alacsony bemenő DNS-koncentrációk esetén érvénytelen eredményt adjon. A vizsgálatban nem voltak érvénytelen genotípus-eredmények. A kimutatási határ 0,01 ng/μl. Ez 10-szer alacsonyabb, mint a DNS legalacsonyabb ajánlott bemenő koncentrációja.

9. táblázat A cobas® II. faktor és V. faktor teszt analitikai érzékenysége

Koncentráció (ng/μl)	Szám	cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredményei		
		Helyes eredmények száma (%-a)	Helytelen eredmények száma (%-a)	Érvénytelen eredmények száma (%-a)
Hígítatlan*	120	120 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
1	480	480 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
0,3	480	480 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
0,1	480	480 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
0,03	480	480 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
0,01	480	473 (98%)	0 (0%)	7 (2%)
0,003	480	86 (18%)	0 (0%)	394 (82%)
0,001	480	0 (0%)	0 (0%)	480 (100%)
0,0003	480	0 (0%)	0 (0%)	480 (100%)
0,0001	480	0 (0%)	0 (0%)	480 (100%)
0	480	0 (0%)	0 (0%)	480 (100%)

* 6–38 ng/μl

DNS-bemenet felső határa

A bemenő DNS cobas® II. faktor és V. faktor teszttel végzett magasabb koncentrációinak értékelése céljából négy K₂EDTA-teljesvér-mintából három különböző DNS-izolálási módszerrel genomiális DNS-t izoláltak, majd sejtvonalakból koncentrált genomiális DNS hozzáadásával 300 ng/μl, 150 ng/μl és 75 ng/μl DNS-összkoncentrációkat készítettek. Ugyanazon II. faktor és V. faktor genotípusú teljesvér-mintákból vett genomiális DNS-ekhez II. faktor heterozigóta, V. faktor heterozigóta és V. faktor homozigóta mutánssejt-vonalakból származó genomiális DNS-t adtak hozzá. Fehérvérsejt-mentes teljesvér-mintából (LDWB) származó genomiális DNS-hez II. faktor homozigótás mutánssejtvonalas DNS-t adtak. A 300 ng/μl-es, 150 ng/μl-es és 75 ng/μl-es genomiális DNS-mintákat a két készlettel 24 ismétléssel tesztelték. Ez genomiális DNS-mintaként és koncentrációként összesen 48 ismétlést eredményezett. A hozzáadott sejtvonalas DNS nélküli teljes vérből származó genomiális DNS-mintákat a két készlettel hat ismétléssel tesztelték. Ez genomiális DNS-mintaként összesen 12 replikátumot eredményezett. Mindegyik 300 ng/μl-es, 150 ng/μl-es és 75 ng/μl-es minta mindegyik vizsgálatban megfelelő II. faktor és V. faktor genotípuseredményt adott (10. táblázat). A hozzáadott sejtvonalas DNS nélküli LDWB minták a várakozásoknak megfelelően érvénytelen eredményt adtak; a többi teljes vérből származó genomiális DNS-minta helyes II. faktor és V. faktor eredményt adott. A DNS legmagasabb javasolt bemenő koncentrációja 150 ng/μl, a maximális tesztelt bemenet fele.

10. táblázat Magasabb DNS-bemenet tesztelése a cobas® II. faktor és V. faktor tesztben

Koncentráció (ng/μl)	Szám	cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredményei		
		Helyes eredmények száma (%-a)	Helytelen eredmények száma (%-a)	Érvénytelen eredmények száma (%-a)
300	576	576 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
150	576	576 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
75	576	576 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Hozzáadott sejtvonalas DNS nélkül ^a	144	144 ^b (100%)	0 (0%)	0 (0%)

^a 6–38 ng/μl

^b A fehérvérsejt-mentes teljesvér-mintából származó genomiális DNS a várakozásoknak megfelelően érvénytelen eredményeket adott. Ezeknek az eredményeknek a megjelölése ebben a táblázatban „Érvénytelen” helyett „Helyes”.

A DNS izolálásának reprodukálhatósága

A genomiális DNS-t három kereskedelemben kapható DNS-izolálási módszerrel izolálták a gyártó utasításai alapján tizenöt teljesvér-mintából. Ezt a feladatot két kezelő végezte három napig. Mintaként minden egyes DNS-izolálási módszer esetében hat DNS-izolálás történt. Minden egyes izolált genomiális DNS-mintát háromszor tesztelték a cobas® II. faktor és V. faktor teszttel (11. táblázat). A cobas® II. faktor és V. faktor teszttel elért eredmények száz százaléka egyezett a II. faktor és V. faktor genotípusainak kétirányú Sanger DNS-szekvenálásával. Az „A” módszerrel izolált egyik genomiális DNS-mintát kizárták az eredmények közül. Rozsdaszínű volt, és mindhárom teszten érvénytelen eredményt adott. Az izolált DNS-mintáknak átlátszónak és szintelennek kell lenniük. Nem szabad a DNS-mintákat tesztelni, ha nem átlátszók és szintelenek, mert érvénytelen vagy helytelen eredményt adhatnak.

11. táblázat A DNS izolálásának reprodukálhatósága

DNS-izolálás módszere	Vizsgált ismétlések		Szám (%)		
	DNS-izolálás	teszt	Helyes eredmények	Helytelen eredmények	Érvénytelen eredmények
A	89 ^a	267 ^a	267 ^a (100,0%) [98,6–100] ^b	0 (0,0%)	0 (0,0%)
B	90	270	270 (100,0%) [98,6–100]	0 (0,0%)	0 (0,0%)
C	90	270	270 (100,0%) [98,6–100]	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Összesen	269	807	807 (100,0%) [99,5–100]	0 (0,0%)	0 (0,0%)

^a Az „A” módszerrel izolált 90 DNS-minta közül egyet kizártak, mert rozsdaszínű volt. Csak az átlátszó és színtelen DNS-mintákat szabad tesztelni. Nem szabad a DNS-mintákat tesztelni, ha nem átlátszók és színtelenek, mert érvénytelen vagy helytelen eredményt adhatnak.

^b 95%-os kétoldali alsó konfidenciahatár.

Analitikai specifititás

Az V. faktor Leiden-mutációhoz (G1691A) és II. faktor (protrombin) mutációhoz (G20210A) közeli egy pontos nukleotid-polimorfizmus (SNP) hatásának megállapítása céljából a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszt próbakötő régiójában nyolc ismert SNP-t (A20207C, C20209T, A20218G, C20221T, G1689A, C1690T, A1692C és A1696G) SNP-t tartalmazó plazmid DNS-t teszteltek. A II. faktor SNP-plazmidok és az V. faktor SNP-plazmidok a 20210-es és 1691-es pozíciókban voltak vad típusúak. Mindegyik SNP-plazmid-DNS-t önmagában tesztelték, ezen felül vad típusú II. faktor plazmid DNS-sel, vad típusú V. faktor plazmid DNS-sel, vad típusú II. faktor és vad típusú V. faktor plazmid DNS-ekkel, valamint vad típusú, teljes vérből származó genomiális DNS-sel kombinálva.

Az SNP-plazmidok egyike sem okozott hamis pozitív eredményeket a II. faktor (protrombin) vagy V. faktor Leiden-mutációkkal. A teszt során mind a négy II. faktor SNP-plazmid, valamint a négy V. faktor SNP-plazmid közül hármat vad típusú II. faktor vagy V. faktor DNS-ként mutattak ki. A **cobas**® II. faktor és V. faktor teszt egy V. faktor SNP-plazmidot (G1689A) nem mutatott ki. Ha ez az SNP mindkét allélon jelen van, a teszteredmény érvénytelen lesz.

Zavarást okozó anyagok

A trigliceridek (37 mM), bilirubin (nem kötött vagy kötött, 342 µM) és a koleszterin (13 mM) nem zavarták a **cobas**® II. faktor és V. faktor tesztet, amikor a CLSI által javasolt koncentrációban teljes vérhez adták.¹² A hemoglobin nem zavarta a **cobas**® II. faktor és V. faktor tesztet, amikor 20 g/l koncentrációban teljes vérhez adták. A K₂EDTA-s alvadásgátló nem okozott zavart, amikor 5,7 mg/ml koncentrációban tesztelték. Ez kb. háromszorosa a K₂EDTA teljes vérben található koncentrációjának, amikor a vérvételi cső teljesen tele van. A heparin, coumadin (Warfarin), rivaroxaban (Xarelto), és dabigatrán-etexilát (Pradaxa) nem zavarta a **cobas**® II. faktor és V. faktor tesztet.

Egy guanidin-hidrokloridot, a kereskedelmi DNS-extrahálópufferek egy gyakori összetevőjét tartalmazó kereskedelmi extrahálópuffer zavarta a **cobas**® II. faktor és V. faktor tesztet, amikor 2,5% (V/V) koncentrációban volt jelen genomiális DNS-mintákban. Az etanol, a kereskedelmi DNS-izolálási módszerek mosópufferének egy gyakori összetevője zavarta a **cobas**® II. faktor és V. faktor tesztet, amikor 5% (V/V) koncentrációban adták hozzá genomiális DNS-mintákhoz. A megfigyelt zavarás mindkét anyag esetében érvénytelen eredményt adott.

Gyártási tételek közötti megismételhetőség

A cobas® II. faktor és V. faktor teszt gyártási tételek közötti megismételhetőségének kiértékelése során hét K₂EDTA-s teljesvér-mintából izolált genomiális DNS-mintát a cobas® II. faktor és V. faktor teszt három gyártási tételével tesztelték. A vizsgálatot öt nem egymást követő napon végezte két kezelő két cobas z 480 analizátoron, készlettételenként napi egy futtatással, futtatásonként két ismétléssel, mintánként összesen 60 ismétléssel (12. táblázat). A cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredményeit a II. faktor és V. faktor genotípusainak kétirányú Sanger DNS-szekvenálásához hasonlították. A cobas® II. faktor és V. faktor teszteredmények és a nukleinsav-szekvenálás teljes megfelelési aránya 100% volt az összes mintára és reagenstételre (egyoldalú, alsó 95%-os konfidenciahatár: 99,3%).

12. táblázat Gyártási tételek közötti megismételhetőség

Minta- azonosító	II. faktor genotípus	V. faktor genotípus	Tesztek száma gyártási tételenként	Helyes genotípuseredmények száma (%-a)			
				1. tétel	2. tétel	3. tétel	Minden gyártási tétel
S1	Vad típus	Vad típus	20	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	60 (100%)
S2	Vad típus	Vad típus	20	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	60 (100%)
S3	Vad típus	Heterozigóta	20	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	60 (100%)
S4	Heterozigóta	Vad típus	20	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	60 (100%)
S5	Vad típus	Homozigóta mutáns	20	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	60 (100%)
S6	Homozigóta mutáns	Vad típus	20	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	60 (100%)
S7	Heterozigóta	Heterozigóta	20	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	60 (100%)
Összesen			140	140 (100%)	140 (100%)	140 (100%)	420 (100%)

Klinikai teljesítmény értékelése

Módszerkorreláció: Sanger-féle szekvenáláshoz történő hasonlítás

Egy helyszínen a rendeltetésszerű használat során várható mintapopulációt képviselő teljesvér- és DNS-mintákat (összes N = 300) tesztelték a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszttel. A kétirányú Sanger-féle szekvenálást másik helyszínen végezték. A DNS-t egy kereskedelembe kapható manuális teljesvérminta-preparációs módszerrel extrahálták a K₂EDTA-s teljesvérminták egy részhalmazából. Az összes minta közül 284 volt teljesvér-minta, és képviselte a II. faktor és V. faktor gyakran előforduló genotípusait. A ritka II. faktor homozigóta mutáns / V. faktor vad típusú genotípus mintáinak nagy részét genomiális DNS (gDNS) mintaként szerezték be azonosított izolációs módszertan nélkül. A genotípusokat és a mintatípusokat a 13. táblázat tartalmazza.

13. táblázat A vizsgálatba bevont II. faktor és V. faktor genotípusok és mintatípusok

II. faktor (F2)	V. faktor (F5)	Mintatípus
Vad típusú (WT F2)	Vad típusú (WT F5)	Teljes vér
Vad típusú (WT F2)	Heterozigóta (HET F5)	Teljes vér
Heterozigóta (HET F2)	Vad típusú (WT F5)	Teljes vér
Heterozigóta (HET F2)	Heterozigóta (HET F5)	Teljes vér
Vad típusú (WT F2)	Homozigóta mutáns (MUT F5)	Teljes vér
Homozigóta mutáns (MUT F2)	Vad típusú (WT F5)	Teljes vér és gDNS

Mind a 300 minta érvényes eredményt adott mind a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszttel, mind a kétirányú Sanger-féle szekvenálással. A teszteredményeket akkor tekintették helyesnek a II. faktorra vagy a V. faktorra, ha mind a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszt, mind pedig a Sanger-féle szekvenálás ugyanazt a genotípust mutatta ki. A teszteredményeket akkor tartották helytelennek a II. faktorra és V. faktorra, ha a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszt és a Sanger-féle szekvenálás más genotípust mutatott ki a II. faktorra vagy V. faktorra.

A II. faktor két tesztje között a teljes megfelelési arány (OPA) 100% volt, a 95% alapú alsó konfidenciahatár pedig 99,11%. Mind a pozitív megfelelési arány (PPA), mind pedig a negatív megfelelési arány (NPA) 100%, az alsó konfidenciahatárunk pedig 98,24% és 98,22%. A százalékos egyezés mind a heterozigóta, mind a homozigóta mutáns genotípusok esetében 100% volt.

Az V. faktor két tesztje között az OPA 100% volt, a 95% alapú alsó konfidenciahatár pedig 99,11%. Mind a PPA, mind pedig az NPA 100% volt. A PPA alsó konfidenciahatára 98,26%, az NPA alsó konfidenciahatára pedig 98,19% volt. A százalékos egyezés mind a heterozigóta, mind a homozigóta mutáns genotípusok esetében 100% volt.

A kombinált eredményeket a 14. táblázat tartalmazza.

14. táblázat A cobas® II. faktor és V. faktor teszt teljesítménye kétirányú Sanger-féle szekvenálást használva referenciaként a kombinált II. faktor és V. faktor eredményekre

Kétirányú Sanger-féle szekvenálás eredményei	cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredménye						Összesen
	HET F2 / HET F5	HET F2 / WT F5	MUT F2 / WT F5	WT F2 / HET F5	WT F2 / MUT F5	WT F2 / WT F5	
HET F2 / HET F5	25	0	0	0	0	0	25
HET F2 / WT F5	0	105	0	0	0	0	105
MUT F2 / WT F5	0	0	21	0	0	0	21
WT F2 / HET F5	0	0	0	105	0	0	105
WT F2 / MUT F5	0	0	0	0	23	0	23
WT F2 / WT F5	0	0	0	0	0	21	21
Összesen	25	105	21	105	23	21	300

Reprodukálhatóság

A cobas® II. faktor és V. faktor teszttel a II. faktor G20210A és V. faktor Leiden (G1691A) mutációk kimutatásának és genotipizálásának reprodukálhatóságát három helyszínen értékelték egy kilenctagú panel bevonásával: négy egyedi K₂EDTA-s vérminta, három mesterséges vérminta és két 0,2 ng/μl-re hígított kivont genomiális DNS- (gDNS) minta. A DNS-t mindegyik helyszínen három kereskedelemben kapható manuális mintapreparálási módszer valamelyikével extrahálták. Mindegyik helyszínen három cobas® II. faktor és V. faktor teszttel valamelyikét és egy készüléket használtak. Mindegyik helyszínen két kezelő volt, és kezelőnként napi egy futtatást végeztek 5 nem egymást követő napon keresztül.

Az eredményt akkor tekintették helyesnek, ha a cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredményei és a paneltag Sanger-féle szekvenálással meghatározott genotípusa egyezett; az eredményt akkor tekintették helytelennek, ha a cobas teszt eredménye és a paneltag Sanger-féle szekvenálással meghatározott genotípusa nem egyezett. A cobas® II. faktor és V. faktor teszt eredményeit mind a II. faktor, mind az V. faktor esetében mindegyik mintára jelentették. Ezek mindkét mutációra vagy érvényesek, vagy érvénytelenek voltak.

30 érvényes futtatás során összesen 540 tesztet végeztek: 240 eredmény K₂EDTA-s vérminták, 180 mesterséges vérminták, és 120 gDNS alapján született. Az 540 eredményből egyetlen érvénytelen eredményt találtak egy mesterséges vérmintából. Minden érvényes II. faktor és V. faktor eredménye helyes volt, ami 100% egyezést jelent minden szinten: genotípus, helyszín/DNS-izolálási módszer/reagenstétel, mintatípus, kezelők és napok. A teljes érvénytelenségi arány 0,19% volt (1/540). A vizsgálat eredményeinek összegzését a 15. táblázat és a 16. táblázat tartalmazza.

15. táblázat Reprodukálhatósági vizsgálat összegzése – II. faktor

Genotípus szekvenálás alapján ^a	Helyes eredmények/ tesztelt minták száma			Helytelen eredmények	Érvénytelen eredmények ^c	Helyes eredmények/ érvényes eredmények száma (%)	95% LCB ^d
	1. helyszín ^b / 1. gyártási tétel „A” módszer	2. helyszín ^b / 2. gyártási tétel „B” módszer	3. helyszín ^b / 3. gyártási tétel „C” módszer				
WT ^e	100/100	100/100	100/100	0	0	300/300 (100%)	99,01
HET ^e	60/60	59/60	60/60	0	1	179/179 (100%)	98,34
MUT ^f	20/20	20/20	20/20	0	0	60/60 (100%)	95,13

^a WT: vad típus; HET: heterozigóta; MUT: homozigóta mutáns

^b Mindegyik helyszínen más DNS-izolálási módszert (A, B, C) és a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszt más gyártási tételét használták.

^c Nem újratesztelt érvénytelen eredmény.

^d Egyoldalú 95%-os alsó konfidenciahatár (LCB).

^e Mindegyik helyszínen 20 eredmény származott gDNS-mintákból és 20 mesterséges vérmintákból.

^f Csak mesterséges vérmintákból.

16. táblázat Reprodukálhatósági vizsgálat összegzése – V. faktor

Genotípus szekvenálás alapján ^a	Helyes eredmények/ tesztelt minták száma			Helytelen eredmények	Érvénytelen eredmények ^c	Helyes eredmények/ érvényes eredmények száma (%)	95% LCB ^d
	1. helyszín ^b / 1. gyártási tétel „A” módszer	2. helyszín ^b / 2. gyártási tétel „B” módszer	3. helyszín ^b / 3. gyártási tétel „C” módszer				
WT ^e	100/100	100/100	100/100	0	0	300/300 (100%)	99,01
HET ^e	60/60	59/60	60/60	0	1	179/179 (100%)	98,34
MUT ^f	20/20	20/20	20/20	0	0	60/60 (100%)	95,13

^a WT: vad típus; HET: heterozigóta; MUT: homozigóta mutáns

^b Mindegyik helyszínen más DNS-izolálási módszert (A, B, C) és a **cobas**® II. faktor és V. faktor teszt más gyártási tételét használták.

^c Nem újratesztelt érvénytelen eredmény.

^d Egyoldalú 95%-os alsó konfidenciahatár (LCB).

^e Mindegyik helyszínen 20 eredmény származott gDNS-mintákból és 20 mesterséges vérmintákból.




















































^f Csak mesterséges vérmintákból.

További információk

Szimbólumok

A Roche PCR diagnosztikai termékek jelölésére a következő szimbólumokat használják.

17. táblázat A Roche PCR diagnosztikai termékek címkéjén használt szimbólumok

 Age/DOB	Kor vagy születési dátum		Nem a beteg közelében használható teszteszköz		QS-IU-k száma PCR-reakciónként; használja a QS-IU-k (nemzetközi egységek) reakciónkénti számát az eredmények számításához.
	Segédsoftver		Nem öntesztelő eszköz		Sorozatszám
	Megadott tartomány (kópia/ml)		Forgalmazó (Megjegyzés: Az alkalmazandó ország/régió a szimbólum alatt jelölhető meg.)		Hely
	Megadott tartomány (IU/ml)		Ne használja újra		Szokásos eljárás
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben		Nő Csak IVD teljesítmény értékelésre		Etilén-oxiddal sterilizálva
	Vonalkód-adatlap		Globális kereskedelmi cikkszám		Sötétben tárolandó
	Lotszám		Importőr		Hőmérsékletkorlát
	Biológiai veszély		In vitro diagnosztikai felhasználásra		Vizsgálatdefiníciós fájl
	Katalógusszám		Megadott tartomány alsó határa		Felfelé nézzen
	CE megfelelési jelzés: ez az eszköz megfelel az in vitro diagnosztikai eszközök CE jelölésére vonatkozó előírásoknak		Férfi		Ultraérzékeny eljárás
	Adatgyűjtés		Gyártó		Egyedi eszközazonosítás
	Olvassa el a használati útmutatót		Negatív kontroll		Megadott tartomány felső határa
	Tartalma <n> vizsgálathoz elegendő		Nem steril		Eddig töltendő vizelettel
	A készlet tartalma		Beteg neve		Csak az USA-ban: Az USA szövetségi törvényei értelmében az eszköz csak orvos részére vagy rendelvényére adható ki.
	Kontroll		Beteg száma		Lejárat dátuma
	Gyártás napja		Itt válassza le		
	Beteg közelében használható teszteszköz		Pozitív kontroll		
	Öntesztelő eszköz		QS-kópiák száma PCR-reakciónként; használja a QS-kópiák reakciónkénti számát az eredmények számításához.		

Technikai segítségnyújtás

Technikai segítségnyújtásért (segítségért) forduljon a helyi kirendeltséghez:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Gyártó, importőr és forgalmazó

18. táblázat Gyártó, importőr és forgalmazó



Roche Molecular Systems
 1080 US Highway 202 South
 Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com



EC Importer¹

Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Strasse 116
 68305 Mannheim, Germany

Distributed by
 Roche Diagnostics
 9115 Hague Road
 Indianapolis, IN 46250-0457 USA
 (For Technical Assistance call the
 Roche Response Center
 toll-free: 1-800-526-1247)²

¹ A szimbólum szövege csak az USA-ban kötelező.

² Csak az USA-ra vonatkozik.

Védjegyek és szabadalmak

Lásd: <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Szerzői jogok

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
 Sandhofer Str. 116
 68305 Mannheim
 Germany



Hivatkozások

1. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med.* 1998;158:585-593.
2. Goldhaber SZ, Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Lancet.* 2012; 379:1835-1846.
3. Grody WW GJ Taylor AK, Korf BR, Heit JA. American College of Medical Genetics, A consensus statement on Factor V Leiden mutation testing. *Genet Med.* 2001; 2001;3:139-148.
4. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP et al. High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). *Blood.* 1995; 85:1504-1508.
5. Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, et al. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. *Genet Med.* 2005;7:444-453.
6. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, Korf BR, Heit JA, ACMG Factor V Leiden Working Group. American College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing. . *Genet Med.* 2001;3:139-148.
7. Poort SR Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88:3698-3703.
8. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125-128.
9. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
11. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP07-A2 Appendix D: Wayne, PA; CLSI, 2005.

Dokumentumverzió

Dokumentum verzióinformációi	
Doc Rev. 2.0 12/2022	<p>Az IVDR követelményeinek megfelelő frissítések.</p> <p>Óvintézkedések és kezelési követelmények szakasz frissítve, hogy a felhasználó vegye fel a kapcsolatot a helyi illetékes hatósággal.</p> <p>Integritás rész frissítve: tanács a felhasználónak, hogy ne használjon láthatóan sérült vagy szivárgó reagenseket és edényeket.</p> <p>Biztonsági és teljesítményjelentések összegzésére mutató webes hivatkozás hozzáadása.</p> <p>Kiegészítve a Technikai segítségnyújtás résszel és az importőr címével.</p> <p>A harmonizált szimbólumok oldala frissítve.</p> <p>Forgalmazók címei eltávolítva.</p> <p>Esetleges kérdésével forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.</p>

A biztonsági és teljesítményjelentés összegzését a következő hivatkozáson találja: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>