



MOLBIOL

***Kit para diagnóstico in vitro LightMix[®]
Factor V (Leiden)***

**N.º de cat.: 40-0594-64
Roche SAP N.º: 06896529001**

Detección de la variación G1691A en el ADN
del Factor V

para su uso con los

instrumentos LightCycler[®] de Roche Diagnostics

Formato SimpleProbe[®]

Reactivos para 64 determinaciones

A la recepción:

Guarde los reactivos premezclados y los controles de PCR secos protegidos de la luz solar a temperatura ambiente o refrigerados (no congelar)



Índice

1. INFORMACIÓN DEL PRODUCTO	3
1.1. Contenido: LightMix® Kit Factor V Leiden	3
1.2. Uso previsto	3
1.3. Especificaciones	4
1.3.1. Muestras clínicas	4
1.3.2. Instrumentos, software y productividad	5
1.4. Conservación y estabilidad	5
2. DISPOSITIVOS Y REACTIVOS ADICIONALES	7
2.1. LightCycler® Instruments	7
2.2. Instrumentos	7
2.3. Preparación de la muestra	7
2.4. Reactivos	7
3. INFORMACIÓN CONTEXTUAL	8
3.1. Contexto médico	8
3.2. Metodología y principio del ensayo	9
3.3. Características de rendimiento	9
4. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	9
5. PROGRAMACIÓN	12
5.1. Compensación del color	12
5.2. Instrumentos LightCycler® que utilizan capilares	12
5.3. LightCycler® 480 Instruments	13
5.4. LightCycler® 96 Instruments	14
5.5. LightCycler® PRO Instruments	15
6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	16
6.1. Preparación de la muestra	16
6.2. Preparación de los reactivos	16
6.2.1. Preparation of the LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	16
6.2.2. Preparación de reactivos específicos de parámetros	16
6.2.3. Preparación del control positivo	17
6.2.4. Preparación de los controles de genotipado	17
6.3. Preparación de la mezcla de reacción	18
6.3.1. Preparation de 64 LightCycler® Reaction Mix	18
6.3.2. Preparación de Single LightCycler® Reaction Mix	18
6.3.3. Procedimiento de carga de capilares/pocillos	19
6.4. Almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos	19
6.5. Carga de controles y patrones de genotipado	20
6.5.1. Instrumentos que utilizan capilares	20
6.5.2. LightCycler® 480 Instruments	21
6.5.3. LightCycler® 96 Instruments	21
6.5.4. LightCycler® PRO Instruments	21
7. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS	22
7.1. Límites e interferencias	22
7.2. Calibración	22
7.3. Control de calidad: criterios de aceptación	22
7.3.1. Control negativo	22
7.3.2. ADN de control positivo	22
7.3.3. Patrones de genotipado de ADN	23
7.3.4. muestras	23
7.3.5. Curvas de fusión anormales	23
7.4. Almacenamiento de patrones de genotipado externos	23
7.4.1. Instrumentos que utilizan capilares	24
7.4.2. LightCycler® 480 Instruments	24
7.4.3. LightCycler® PRO Instruments	24
7.5. Lectura de los resultados	24
7.5.1. Análisis de fusión: Instrumentos que utilizan capilares	24
7.5.2. Análisis de fusión: LightCycler® 480 Instruments	25
7.5.3. Análisis de fusión: LightCycler® 96 Instruments	25
7.5.4. Análisis de genotipado: LightCycler® PRO Instruments	25
7.6. Temperatura de fusión esperada	26
7.7. Interpretación de los resultados	26
7.8. Información adicional	27
7.8.1. Datos típicos de la amplificación	27
7.8.2. Variantes poco frecuentes	27
8. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	28
9. REFERENCIAS	29

1. Información del producto

1.1. Contenido: LightMix® Kit Factor V Leiden

Reactivos de PCR premezclados secos:



Conservar entre 4 y 25 °C protegidos de la luz

	Color del tapón	Etiqueta	Descripción del contenido	Total Determinaciones
1 x	Rojo	PSR	Reactivos específicos de parámetros (PSR) que contienen cebadores y sondas premezclados y secos para 64 determinaciones. ≤81 % de oligonucleótidos sintéticos ≥19 % de tampón	64 gránulo azul verdoso seco

Patrones secos (ADN de control)



Conservar entre 4 y 25 °C protegidos de la luz

	Color del tapón	Etiqueta	Descripción del contenido	Total Determinaciones
1 x	Amarillo	HT	Control positivo de heterocigoto aproximadamente 4E5 equivalentes genómicos	40 gránulo azul seco
1 x	Amarillo	WT	Genotipado estándar sin modificación genética aproximadamente 4E5 equivalentes genómicos	40 gránulo azul seco
1 x	Amarillo	MT	Patrón de genotipado mutante aproximadamente 4E5 equivalentes genómicos	40 gránulo azul seco

1.2. Uso previsto

Este kit de diagnóstico para PCR permite detectar la mutación «Factor V Leiden», la transición 1691G-A (NCBI dbSNP: rs6025) en el exón 10 del gen del Factor de coagulación V (OMIM: 612309), que da como resultado una sustitución de la arginina en la posición 506 por glutamina (R506Q o HGVS: NP_000121.2:p.Arg534Gln), para su uso con ADN genómico humano procedente de un extracto de ácido nucleico obtenido a partir de sangre periférica.

El Factor de coagulación V codifica una glicoproteína plasmática de 330 kD con poca o ninguna actividad. Este precursor se activa mediante escisión producida por la trombina (Factor II). El Factor Va activado es una proteína esencial en la ruta de la coagulación, y actúa como un cofactor del factor X en la conversión de protrombina en trombina. El propio Factor Va activado se inactiva mediante la Proteína C activada.

La mutación génica G1691A del Factor V codifica una enzima variante no funcional que es resistente a la Proteína C activada. Se inactiva aproximadamente diez veces más lentamente que el Factor V normal y, por tanto, persiste durante más tiempo en la circulación.

Los portadores homocigóticos del la variante del gen 1691 A/A y, en menor medida, también las personas heterocigotas con la combinación de alelos G1691A, presentan una actividad prolongada del Factor V activado, dando como resultado un mayor riesgo de desarrollar trombosis venosa profunda (Bertina *et al.*, 1994)¹.

Puesto que el riesgo de trombosis aumenta en aquellas personas que tienen mutaciones del Factor V Leiden y del Factor II, los pacientes con propensión a trombosis deberían también someterse a un análisis de la mutación II G20210A del Factor II, por ejemplo, usando el LightMix® Kit 40-0593-64 (Roche SAP n.º: 06896502001).

Este kit no está destinado a ser la única base de una decisión terapéutica. El estado de mutación del paciente debe considerarse junto con otros factores de la enfermedad.

Nota: Las prestaciones del ensayo solamente se pueden garantizar con instrumentos LightCycler® (consulte el apartado 1.3.2 para obtener más información).

1.3. Especificaciones

El kit *LightMix® Kit Factor V Leiden* es una prueba diagnóstica *in vitro* que permite la detección del polimorfismo de nucleótido único (PNU) G1691A del Factor V demostrado con muestras de referencia.

1.3.1. Muestras clínicas

La prueba requiere 2 µl de ADN genómico purificado en solución acuosa extraído a partir de una muestra clínica que contenga de 5 a 100 ng/µl de ADN genómico (cantidad total 10-200 ng), según determinación por espectrofotometría UV (1 OD = 50 µg ADN/ml).

1.3.2. Instrumentos, software y productividad

Un kit contiene reactivos para 64 determinaciones realizadas en un volumen de reacción de 10 µl.

Cada ciclo de análisis debe contener al menos un patrón y un control negativo.

En el caso de LightCycler® PRO, se deben utilizar los tres patrones y un control negativo para cada ciclo de análisis.

La tabla siguiente muestra algunas características del kit:

Instrumento de Códigos específicos	Versión del software (o superior)	Tiempo de ejecución (aprox.)	Muestras máx. por análisis (2)	Máxima productividad del kit (3)	Mínima productividad del kit (4)
LC 1.2	4.10 (1)	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC 1.5	4.10 (1)	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC 2.0	4.05	60 min	30 + 2 ctrl.	58	20
LC480 (96 pocillos)	1.5	100 min	94 + 2 ctrl.	60	20
LC480 (384 pocillos)	1.5	100 min	382 ⁽⁵⁾ + 2 ctrl.	60	20
Z 480 (canal abierto)	1.5	100 min	94 ⁽⁵⁾ + 2 ctrl.	60	20
LC96	1.6	100 min	94 ⁽⁵⁾ + 2 ctrl.	60	20
LC PRO	1.X.X	70 min	32 ⁽⁶⁾ + 4 ctrl.	60	12

1 La realización de la prueba con instrumentos LightCycler® 1.2 o 1.5 que tienen integrada la versión de software 3.5 proporciona resultados comparables. Las instrucciones para programar, analizar los datos e interpretar los resultados no se describen en este manual. Actualice a la versión 4.10 o superior cuando sea posible. El software LightCycler® 3.5.3 no incluye el módulo de genotipado automático. Se pueden obtener resultados equivalentes con personal cualificado que analice manualmente cada muestra.

2 Cada ciclo de análisis debe incluir un control heterocigoto y un control no dirigido (NTC) para un total de 2 determinaciones de control.

3 El primer uso del kit exige la inclusión de 4 controles para mostrar el módulo de genotipado (no LightCycler® LC96). El número máximo de muestras que se pueden procesar se reduce en consecuencia.

Dependiendo de la normativa local, es posible que deban incluirse los 4 controles de genotipado en cada ciclo de análisis, reduciendo el número total de muestras de pacientes que se pueden analizar.

4 En el cálculo se ha considerado una única muestra clínica analizada en cada ciclo de análisis.

5 Se requiere usar más de un kit.

6 Cada ciclo de análisis debe incluir un control heterocigoto (HT), los dos patrones de genotipado (WT y MT) y un control no dirigido (NTC).

1.4. Conservación y estabilidad

Reactivos y controles

Guarde los reactivos secos (PSR y patrones) protegidos de la luz y a temperatura ambiente o refrigerados (de 4 °C a -25 °C).

No congele los reactivos secos. La fecha de caducidad está impresa en la etiqueta del kit.

Envío

Los productos se envían a temperatura ambiente. La estabilidad de los reactivos durante el transporte se ha sometido a pruebas en las condiciones de envío.

2. Dispositivos y reactivos adicionales

2.1. LightCycler® Instruments

LightCycler® 2.0 Instruments

LightCycler® 2.0 Instrument
LightCycler® versión del software 4.05 o
LightCycler® versión del software 4.10 o superior
Capilares LightCycler® (20 µl)

LightCycler® 480 Instruments

LightCycler® 480 Instrument (modelo I)
LightCycler® 480 II Instrument
Analizador cobas® z 480 (canal abierto)
LightCycler® Software versión 1.5 o superior
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 blanco o
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 blanco

LightCycler® 96 Instruments

LightCycler® 96 Instrument
LightCycler® Software versión 1.0 o superior
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 blanco
Tiras para tubo LightCycler® 8 (blanco)

LightCycler® 1.x Instruments

LightCycler® 1.2 y 1.5 Instruments
LightCycler® Software versión 4.10
Capilares LightCycler® (20 µl)

LightCycler® PRO Instruments

LightCycler® PRO Instrument
LightCycler® Versión del software 1.X.X
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 blanco o
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 blanco

Opcional:

2.2. Instrumentos

LC Carousel Centrifuge 2.0 (230 V)
Herramienta de taponado

2.3. Preparación de la muestra

Preparación manual de la muestra:

Kit de preparación High Pure PCR Template
Agua de calidad PCR exenta de nucleasa
Etanol p.a.
Isopropanol p.a.

Preparación automática de la muestra:

MagNA Pure Instrument
Kit de aislamiento de ADN MagNA Pure LC

MagNA Pure 2.0 Instrument
Kit de aislamiento de ADN MagNA Pure LC

MagNA Pure Compact Instrument
Kit de aislamiento de ácido nucleico MagNA Pure Compact I

MagNA Pure 96 Instrument
Kit para pequeño volumen MagNA Pure 96 DNA and Viral NA

MagNA Pure 24 Instrument
MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit

2.4. Reactivos

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe

Roche Diagnostics

retirado
retirado
N.º de cat. 04 779 584 001
retirado

Roche Diagnostics

retirado
N.º de cat. 05 015 278 001
N.º de cat. 05 200 881 001
N.º de cat. 04 994 884 001
N.º de cat. 04 729 692 001
N.º de cat. 04 729 749 001

Roche Diagnostics

N.º de cat. 05 815 916 001
Integrado en el Instrumento
N.º de cat. 04 729 692 001
N.º de cat. 06 612 601 001

Roche Diagnostics

retirado
N.º de cat. 04 898 915 001
retirado

Roche Diagnostics

N.º de cat. 09 541 713 001
Integrado en el Instrumento
N.º de cat. 04 729 692 001
N.º de cat. 04 729 749 001

Roche Diagnostics

N.º de cat. 03 709 582 001
N.º de cat. 03 357 317 001

Roche Diagnostics

N.º de cat. 11 796 828 001
cualquier proveedor
cualquier proveedor
cualquier proveedor

Roche Diagnostics

retirado
N.º de cat. 03 003 990 001

retirado
N.º de cat. 03 003 990 001

retirado
N.º de cat. 03 730 964 001

N.º de cat. 06 541 089 001
N.º de cat. 06 543 588 001

N.º de cat. 07 290 519 001
N.º de cat. 07 658 036 001

Roche Diagnostics

N.º de cat. 12 239 272 001

3. Información contextual

3.1. Contexto médico

La variante del gen G1691A del Factor V, habitualmente denominada «Factor V Leiden», es el trastorno hipercoagulable hereditario más frecuente entre las personas euroasiáticas (Ridker *et al.* 1997)². El cambio de aminoácido R506Q resultante altera la escisión que realiza la Proteína C activada (resistencia APC), produciendo un aumento en los niveles de trombina que conduce a un exceso de generación de fibrina y a una coagulación excesiva, especialmente en las venas. Puesto que también hay Factor V resistente a APC producido aunque solamente haya un alelo mutado, también se ven afectados los portadores heterocigotos.

Trombosis venosa profunda

La mutación en el gen del Factor V Leiden se caracteriza por una baja respuesta anticoagulante a la APC y por un mayor riesgo de tromboembolismo venoso (TEV). La trombosis venosa profunda (DVT) es la TEV más frecuente, siendo las piernas el sitio más habitual, aunque también se puede producir en otras partes del cuerpo, incluidos el cerebro, los ojos, el hígado y los riñones.

Los portadores heterocigotos de 1691G/A del Factor V tienen un riesgo algo mayor de

trombosis venosa, mientras que los portadores homocigotos 1691A/A del Factor V tienen un riesgo trombótico mucho mayor. (Grody *et al.*, 2001; Pres *et al.*, 2002)^{3,4}.

Embarazo y anticonceptivos orales (OPC)

Las mujeres con el Factor V Leiden tienen un riesgo sustancialmente mayor de coagulación durante el embarazo, así como si están en tratamiento con píldoras anticonceptivas que contienen estrógenos o terapia de sustitución hormonal en la forma de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar. También pueden tener un riesgo algo mayor de preeclampsia, o de bajo peso del bebé al nacer, de aborto espontáneo y muerte fetal debido a coagulación que se produce en la placenta o en el cordón umbilical, o en el feto (la coagulación en el feto puede depender de si el bebé ha heredado el gen, Rodger *et al.*, 2008)⁵ o la influencia que pueda tener el sistema de coagulación sobre el desarrollo de la placenta. (Lindqvist *et al.*, 1998)⁶.

Factor II/Factor V Genética	OPC	Riesgo relativo de trombosis
Normal		1
Normal	X	4
Heterocigoto FV		5
Heterocigoto FV	X	30
Homocigoto FV		80
Homocigoto FV	X	> 100
Heterocigoto FII		3
Heterocigoto FII	X	16

Factores de riesgo tomados de la publicación de la Universidad de Illinois

3.2. Metodología y principio del ensayo

Usando metodología PCR, un fragmento de 110 pb del gen del Factor V se amplifica con cebadores específicos. El fragmento de PCR se analiza usando un oligómero SimpleProbe[®] marcado internamente que se une a la región abarcando el sitio de la mutación.

Durante el análisis de la curva de fusión, la temperatura aumenta lentamente. La sonda sale a una temperatura específica (T_m), produciendo una disminución en la fluorescencia. Cualquier emparejamiento incorrecto cubierto por la sonda desestabiliza el híbrido y disminuye la T_m .

En este producto, la sonda imita la secuencia del genotipo no modificado, y la presencia de una mutación producirá una T_m reducida.

La lectura de los resultados del genotipo se basa en las temperaturas de fusión comparadas con los patrones suministrados. Si lo permite el software del instrumento, la lectura de los resultados de genotipado se puede obtener con el módulo de genotipado automatizado (depende del instrumento: módulo de software Melt Curve Genotyping) o con el LightCycler[®] Analysis Package (LCAP) específico del kit para el LightCycler[®] PRO Instrument.

Los resultados del genotipado automatizado deben revisarse manualmente para detectar desviaciones en las curvas y las temperaturas de los puntos de fusión intermedios. Si el tipado automatizado no consigue notificar resultados de genotipado coherentes, el genotipo se debe deducir a partir de las temperaturas de fusión siguiendo los criterios descritos en el capítulo 7.

3.3. Características de rendimiento

Especificidad analítica

La especificidad del gen diana y la idoneidad de la amplificación por PCR utilizada en esta prueba se demostraron mediante la secuenciación del amplicón.

Sensibilidad analítica

La detección de diluciones seriadas de varios ADN genómicos heterocigóticos humanos reveló que el límite de detección de este kit es de 250 copias (1.5 ng).

Especificidad y sensibilidad del diagnóstico

Se analizaron con este kit un total de 151 muestras de ADN genómico diferentes de personas de origen caucásico y se compararon con la secuenciación de ADN ABI 3730xl realizada por LGC Genomics GmbH, Berlín.

Resultados del estudio: Los resultados de ambos métodos analíticos mostraron una concordancia del 100 %. En particular, 142 muestras fueron del tipo homocigótico sin modificar (94 %), 8 muestras fueron heterocigóticas (5.3 %) y 1 muestra fue homocigótica mutante.

4. Precauciones y advertencias

Requisitos de manipulación

Este producto es un dispositivo de diagnóstico *in vitro*, por lo que solo debe usarlo personal cualificado.

Se requieren precauciones generales para manipular materiales generales de laboratorio.

El flujo de trabajo del laboratorio debe seguir las prácticas normativas. Debido al riesgo de contaminación, la preparación y la amplificación de PCR se deben llevar a cabo en zonas separadas físicamente.

No mezcle reactivos de distintos lotes.

No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.

Utilice la versión del manual suministrada con el kit (consulte la etiqueta del kit).

Procedimientos de laboratorio

Todos los materiales de origen humano y los residuos asociados deben considerarse potencialmente infecciosos. Limpie en profundidad y trate todas las superficies de trabajo con productos desinfectantes aprobados por las autoridades locales.

No coma, beba ni fume en la zona de trabajo del laboratorio.

No pipetee con la boca.

Lleve guantes protectores desechables, batas de laboratorio y una protección ocular adecuada durante la manipulación de muestras y la configuración de los componentes.

Evite la contaminación microbiana o por nucleasas de los reactivos mientras realiza la aspiración de las alícuotas. El uso de puntas desechables estériles con filtro es fundamental.

Lávese bien las manos después de manipular las muestras y configurar los componentes.

Preparación de la muestra

En lo que respecta a manipular y desechar de forma correcta, consulte las instrucciones de seguridad incluidas en el prospecto del producto utilizado (consulte el capítulo 2.3).

Amplificación y detección

Antes de utilizar este producto, lea el manual del operador del LightCycler®.

Guarde un archivo de muestra que identifique cada posición para permitir una correcta identificación de la muestra.

Compruebe la configuración del LightCycler® Instrument y asegúrese de que coincide con lo indicado en el apartado «Protocolo de la PCR» específico de su instrumento.

No toque la superficie capilar ni la cubierta de la placa sin guantes.

Consulte todas las instrucciones de funcionamiento y de seguridad del LightCycler® Instrument.

Consulte siempre la última versión del LCAP. Acceda a navifyportal.roche.com para descargarla.

Gestión de materiales residuales

Deseche los reactivos sin usar y los materiales residuales de acuerdo con la legislación vigente.

5. Programación

5.1. Compensación del color

Este kit no requiere compensación de color. La lectura de datos con «Compensación de color» activada no cambiará la lectura de los resultados.

5.2. Instrumentos LightCycler® que utilizan capilares

Consulte el manual del operador del instrumento para obtener más información.

Programación

El protocolo consta de cuatro etapas programadas:

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Ciclado** Amplificación por PCR del ADN diana
3. **Fusión** Identificación de la secuencia de ADN amplificado por PCR
4. **Enfriamiento** del instrumento

Etapas:	1	2			3			4
Parámetro:								
Modo de análisis	Ninguno	Modo de cuantificación			Modo de curvas de fusión			Ninguno
Ciclos	1	45			1			1
°C objetivo	95	95	60	72	95	43	75	40
Mantener hh:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Velocidad de rampa °C/s	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Sec Diana °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Tamaño de la etapa °C	0	0	0	0	0	0	0	0
Retraso de la etapa Ciclos	0	0	0	0	0	0	0	0
Adquisición Modo	Ninguno	Ninguno	Único	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Cont.	Ninguno

Tab. 1. Programación de los instrumentos que utilizan capilares

Nota:

Durante la programación, mantenga los valores predeterminados del software: canal = 530, muestras máx. = 32, temperatura de búsqueda = 30 °C y tamaño del capilar = 20 µl. No cambie el valor del tamaño del capilar a 100 µl.

Guarde el programa y los valores predeterminados como «**RUN Template**» [Plantilla del ejecución], que se puede cargar antes de un ciclo de análisis.

Justo antes de iniciar el ciclo de análisis, modifique las muestras máx. (predeterminado = 32) al número de muestras y controles incluidos en la ejecución para evitar que el instrumento se detenga debido a la falta de capilares.

Los instrumentos LightCycler 1.x que utilizan el software versión 3.5.3 leen «Temperature Transition Rate» [Velocidad de transición de temperatura] en lugar de «Ramp Rate» {Velocidad de rampa}.

5.3. LightCycler® 480 Instruments

Consulte el manual del operador del instrumento para obtener más información

Formato de detección: SimpleProbe

Nota: Este kit se puede analizar junto con el LightMix® Kit HFE H63D S65C C282Y CE (n.º de cat. 40-0340-xx) siguiendo las instrucciones para el Formato de detección y la programación descritos en el manual del kit HFE.

Volumen de reacción: 10 µl

Programación

El protocolo consta de cuatro etapas programadas:

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Ciclado** Amplificación por PCR del ADN diana
3. **Fusión** Identificación de la secuencia de ADN amplificado por PCR
4. **Enfriamiento** del instrumento

Etapas:	1	2			3			4
<u>Parámetro:</u>								
Modo de análisis	Ninguno	Modo de cuantificación			Modo de curvas de fusión			Ninguno
Ciclos	1	45			1			1
°C objetivo	95	95	60	72	95	43	75	40
Adquisición Modo	Ninguno	Ninguno	Único	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Cont.	Ninguno
Mantener hh:mm:ss	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Velocidad de rampa C°/s 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.29	1.5
Velocidad de rampa [C°/ s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	0.29	2.0
Adquisiciones por °C	-	-	-	-	-	-	2	-
Sec Diana -°C	0	0	0	0	-	-	-	-
Tamaño de la etapa °C	0	0	0	0	-	-	-	-
Retraso de la etapa Ciclos	0	0	0	0	-	-	-	-

Tab. 2. Programación de la familia de instrumentos LightCycler® 480

Nota:

Guarde el programa y los valores predeterminados como «**RUN Template**» [Plantilla de ejecución], que se puede cargar antes de cada ciclo de análisis del Factor V en LightCycler®.

Asegúrese de programar **2 adquisiciones por segundo** en lugar del valor predeterminado 5; más adquisiciones reducen la pendiente de la curva de fusión, aumentan el tiempo de experimentación y producen un funcionamiento incorrecto del kit.

5.4. LightCycler® 96 Instruments

Consulte el manual del operador del instrumento para obtener más información

Medición

Formato de detección: 470/514 FAM			General
Factor de cuant.	Factor de fusión	Tiempo de integración (s)	Volúmenes (µl)
10,00	1,20	Dinámico	10

Programación

El protocolo consta de cuatro etapas programadas:

1. **Desnaturalización** de la muestra y activación de la enzima
2. **Ciclado** Amplificación por PCR del ADN diana
3. **Fusión** Identificación de la secuencia de ADN amplificado por PCR
4. **Enfriamiento** del instrumento

Etapa:	1	2			3			4
Parámetro:								
Ciclos	1	45			1			1
Rampa °C/s	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	0.20	1.5
Duración s	600	5	10	15	30	120	1	30
°C objetivo	95	95	60	72	95	43	75	40
Modo		Patrón	Patrón	Patrón				
Adquisición Modo	Ninguno	Ninguno	Único	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Cont.	Ninguno
Lecturas /°C							5	

Tab. 3. Programación de LightCycler® 96 Instruments

Nota:

Guarde el programa y los valores predeterminados como «**Experiment file**» [Archivo del experimento], que se puede cargar antes de un ciclo de análisis en LightCycler®.

5.5. LightCycler® PRO Instruments

Utilice la versión del software 1.X.X. Consulte la Asistencia al usuario del sistema LightCycler® PRO para obtener más información.

Para descargar un archivo de LightCycler® Analysis Package (LCAP) correspondiente para el LightMix® Kit Factor V, acceda a navifyportal.roche.com para descargarla. Consulte la última versión del LCAP.

El perfil del ensayo específico del kit forma parte del LCAP y es equivalente a las condiciones del ensayo que se han mostrado anteriormente.

LightCycler® Analysis Package: 1004_FactorV_96

Guarde el archivo de LCAP en la carpeta de ensayos del SFTP o en una memoria USB.

Importe e instale el LCAP en el LightCycler® PRO Instrument y actívelo.
Cree o importe una configuración de pocillos en la pestaña Pocillos.

6. Protocolo experimental

Programe el Instrumento antes de preparar las soluciones (consulte el apartado 5. Programación y lea el manual del operador del instrumento para ver más detalles). Las prestaciones del ensayo descritas solamente se pueden garantizar cuando se utiliza con los sistemas de PCR de Roche Diagnostics descritos.

6.1. Preparación de la muestra

Para la preparación del ADN genómico, utilice sangre periférica humana (EDTA, citrato). No se recomienda utilizar sangre heparinizada, ya que este anticoagulante podría interferir con la PCR.

Realice la purificación del ácido nucleico usando el kit de preparación High Pure PCR Template o los Instrumentos MagNA Pure usando el kit de extracción adecuado para el Instrumento MagNA Pure utilizado (consulte el apartado 2. Dispositivos y reactivos adicionales) como se describe en los respectivos protocolos.

En los ensayos representados (consulte el apartado 7.5. Lectura de resultados) el ADN se extrajo manualmente a partir de 200 µl de sangre usando el kit de preparación High Pure PCR Template siguiendo las instrucciones del fabricante; se usaron 100 µl de tampón de elución para la elución final del ADN purificado de la columna.

6.2. Preparación de los reactivos

6.2.1. Preparation of the LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

Para obtener más información, consulte la hoja del método de LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe.

1	Mantenga frío el reactivo LightCycler® FastStart Enzyme 1a .
2	Descongele el reactivo LightCycler® FastStart Reaction Mix 1b calentando el tubo a 30-35 °C durante 3-5 minutos.
3	Centrifugue rápidamente los tubos para recoger las gotas.
4	La solución debe estar exenta de partículas.
5	Añada 60 µl de 1b al vial 1a .
6	Mezcle la solución cuidadosamente con una pipeta. ¡No someter a vortización! Evite la producción de burbujas.
7	Centrifugue los tubos para recoger las gotas.
8	Utilice el reactivo para preparar la mezcla de reacción (6.3).
9	Guarde el reactivo que sobre a 2 °C-8 °C.



6.2.2. Preparación de reactivos específicos de parámetros

▶	El tubo de PSR proporcionado es suficiente para 64 reacciones.
1	Centrifugue el tubo de PSR premezclado a 10 000 r.p.m. durante 1 minuto.
2	Compruebe que el sedimento está en el fondo del tubo.
3	Añada 66 µl de agua calidad PCR al tubo de PSR .
4	Incube durante 20 s a temperatura ambiente.
5	Someta a vortización durante 10 s.
6	Centrifugue los tubos para recoger las gotas.

- Utilice **1 µl** de **PSR** disuelto para una reacción de PCR de 10 µl.

6.2.3. Preparación del control positivo

►	Un tubo de Control positivo HT es suficiente para 40 determinaciones.
1	Centrifugue el tubo de HT a 10 000 r.p.m. durante 1 minuto.
2	Compruebe que el sedimento de color azul está en el fondo del tubo.
3	Disuelva el sedimento por adición de 80 µl de agua calidad PCR.
4	Incube durante 20 s a temperatura ambiente.
5	Someta a vortización durante 10 s.
6	Centrifugue los tubos para recoger las gotas.

- Utilice **2 µl** de **control positivo** para una reacción de PCR de 10 µl.

- El **control positivo** debe usarse en cada ciclo de análisis.

Tenga en cuenta lo siguiente: Abrir el vial puede producir contaminaciones del espacio de trabajo (aerosol).

6.2.4. Preparación de los controles de genotipado

El software LightCycler® 4.05 y posterior (instrumentos que usan capilares), el software 1.5 y posterior (Instrumentos LightCycler® 480) y el software 1.X.X y posterior (LightCycler® PRO) se pueden calibrar con patrones de referencia para llevar a cabo un genotipado automatizado de muestras clínicas desconocidas.

►	Los patrones de genotipado WT y MT son suficientes para 40 determinaciones.
	Si no se usan, conserve los patrones de genotipado secos. Deseche los reactivos cuando el kit se haya usado o cuando alcancen la fecha de caducidad.
1	Centrifugue los tubos de WT y MT a 10 000 r.p.m. durante 1 minuto.
2	Compruebe que el sedimento azul está en el fondo del tubo.
3	Disuelva el sedimento por adición de 80 µl de agua calidad PCR.
4	Incube durante 20 s a temperatura ambiente.
5	Someta a vortización durante 10 s.
6	Centrifugue los tubos para recoger las gotas.

- Utilice **2 µl** de los patrones de genotipado **WT** y **MT** para una reacción de PCR de 10 µl.

► Ambos **patrones de genotipado** deben utilizarse en el primer ciclo de análisis del kit para calibrar el módulo de genotipado. En el caso de LightCycler® PRO, se deben utilizar los dos **patrones de genotipado** en **cada** ciclo de análisis.

Tenga en cuenta lo siguiente: Abrir los viales puede producir contaminaciones del espacio de trabajo (aerosol).


6.3. Preparación de la mezcla de reacción

6.3.1. Preparation de 64 LightCycler® Reaction Mix

Recomendamos preparar 64 determinaciones para evitar el almacenamiento de los reactivos disueltos o activados en volúmenes variables. Consulte en el capítulo 6.4 el almacenamiento y la estabilidad de los componentes diluidos.

Para la preparación de la mezcla de reacción de menos muestras, vaya al paso 6.3.2 «Mezcla de reacción para una sola determinación».

Prepare la mezcla de reacción en tubo de PSR (enfriado):

Componentes	64 determinaciones
Al tubo de PSR (tapón rojo) que ya contiene	66.0 µl
Añadir:	
H ₂ O, calidad PCR (tapón incoloro)	343.2 µl
Solución MgCl ₂ 25 mM (tapón azul)	52.8 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (tapón rojo), consulte el apartado 6.2.1	66.0 µl
Sustituya el «tapón de cuello largo» del tubo de PSR por el tapón rojo del FastStart	
Volumen total	528.0 µl

Tab. 4. Volúmenes de los componentes para preparar 64 mezclas de reacción

6.3.2. Preparación de Single LightCycler® Reaction Mix

Prepare la mezcla de reacción multiplicando cada volumen (tabla 6) por el número de muestras biológicas a analizar, más tres determinaciones (**control negativo**, **control positivo**, uno de más) y (opcionalmente) dos **patrones de genotipado**. En el caso de LightCycler® PRO, se deben utilizar los dos **patrones de genotipado**, **control positivo** y **control negativo** en **cada** ciclo de análisis.

Prepare la mezcla de reacción en vial enfriado:

Componentes	Único reacción
H ₂ O, calidad PCR (tapón incoloro)	5.2 µl
Solución MgCl ₂ 25 mM (tapón azul)	0.8 µl
PSR (tapón rojo), consulte el apartado 6.2.2	1.0 µl
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (tapón rojo), consulte el apartado 6.2.1	1.0 µl
Volumen de la mezcla de reacción	8.0 µl

Tab. 5. Volúmenes de los componentes para preparar una única mezcla de reacción



Pipetee arriba y abajo suavemente la mezcla de reacción.
¡Un elevado porcentaje de errores experimentales se debe a una mezcla de reacción no homogénea!



6.3.3. Procedimiento de carga de capilares/pocillos

Cada ciclo de análisis debe incluir un control negativo (NTC) para demostrar la ausencia de contaminaciones con ADN genómico o producto de la PCR de MTHFR, y un **control positivo** para identificar temperaturas de fusión específicas del ciclo de análisis. Los organismos reguladores, los requisitos instrumentales o la normativa del laboratorio local pueden requerir la inclusión de los dos patrones de genotipado.

▶	Recuerde incluir los controles al configurar la ejecución.
1	Mezcle suavemente, centrifugue y compruebe la ausencia de burbujas de aire en el vial de la mezcla de reacción.
2	Dispense 8 µl de mezcla de reacción a cada capilar/pocillo.
3	Obligatorio: Añada 2 µl de H₂O calidad PCR como control negativo (NTC) Añada 2 µl de control positivo HT . En el caso de LightCycler® PRO, se deben utilizar los dos patrones de genotipado (WT, MT) .
	Opcional: Añada 2 µl de patrón de genotipado WT . Añada 2 µl de patrón de genotipado MT .
4	Añada 2 µl de muestra a los siguientes capilares/pocillos.
5	Cierre el capilar/la placa y centrifugue. Compruebe que no hay burbujas de aire.
6	Ponga el rotor/la placa en el Instrumento LightCycler®.
7	Solamente para usuarios de capilares: introduzca el número de muestras.
8	Inicie el ciclo de análisis.
9	Introduzca el nombre del experimento cuando se le pida.
10	Guarde los datos de la muestra en la ventana de muestras.

Consulte el apartado 6.5 para ver la carga de muestra y la calibración con patrones de genotipado.

6.4. Almacenamiento y estabilidad de los componentes disueltos

Mezcla de reacción

La mezcla de reacción completa que contiene los reactivos específicos de parámetros (PSR), LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe y MgCl₂ se puede conservar

refrigerada (2-8 °C) durante un máximo de 30 días.

Evite una exposición prolongada a la luz.

Reactivos específicos de parámetros (PSR)

El PSR disuelto es estable durante un máximo de 30 días si se conserva refrigerado (2-8 °C).

Evite una exposición prolongada a la luz.

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe

La mezcla maestra FastStart DNA Master HybProbe (1a+1b) combinada se puede conservar refrigerada (2-8 °C) durante un máximo de 30 días.

Control positivo

El control positivo disuelto es estable durante un máximo de 30 días si se conserva refrigerado (2-8 °C).

Patrones de genotipado

Los **patrones de genotipado** disueltos son estables durante un máximo de 30 días si se conservan refrigerados (2-8 °C).

6.5. Carga de controles y patrones de genotipado

Las muestras descritas como posiciones 1 y 2 se deben rellenar en cada ciclo de análisis; las muestras 3 y 4 se necesitan para ver los patrones de genotipado (solamente en el primer ciclo de análisis del kit).

En el caso de LightCycler® PRO, se deben utilizar los dos **patrones de genotipado** en **cada** ciclo de análisis



Los resultados de genotipado se basan en las temperaturas de fusión.

El uso del módulo de genotipado automatizado presente en el software LightCycler® 2.0 y LightCycler® 480 es opcional, pero es obligatorio para el LightCycler® PRO.

Consulte el manual del operador del LightCycler® para obtener más detalles.

6.5.1. Instrumentos que utilizan capilares

En «Samples data - Capillary View» (Datos de las muestras: vista capilar) introduzca el nombre de la muestra como se describe en la segunda columna. Seleccione «Analysis Type – Genotyping» (Tipo de análisis: genotipado). Seleccione el canal 530 y deseccione los demás. En el menú desplegable, seleccione «Sample Type» (Tipo de muestra) y copie la descripción «Genotype» (Genotipo).

Pos .	Muestra Nombre	Canal	Diana Nombre	Muestra Tipo	Genotipo
1	NTC	530	Diana 1	Control negativo	
2	HT	530	Diana 1	Patrón de fusión	Factor V G1691A Heterocigótico
3	WT	530	Diana 1	Patrón de fusión	Factor V G1691 Sin modificación
4	MT	530	Diana 1	Patrón de fusión	Factor V 1691A Mutante

6.5.2. LightCycler® 480 Instruments

En la ventana «Sample Editor» (Editor de la muestra), en la sección «Step1: Select Workflow» (Paso1: selección de flujo de trabajo), seleccione «Melt Geno», combinación de filtro 465-510. Introduzca la descripción del **control positivo** y los **patrones de genotipado** como se indica:

Pos .	Muestra Nombre	Geno Fus Tipo de muestra	Geno Fus Genotipo
1	NTC	Control negativo	
2	HT	Patrón de fusión	Factor V G1691A Heterocigótico
3	WT	Patrón de fusión	Factor V G1691 Sin modificación
4	MT	Patrón de fusión	Factor V 1691A Mutante

6.5.3. LightCycler® 96 Instruments

En la ventana «Sample Editor» (Editor de la muestra), introduzca como se describe más adelante la descripción del **control positivo** y, opcionalmente, de los **patrones de genotipado**.

Vista de tabla:

Color	Posición	Nombre de la muestra	Tipo de muestra	Colorante
	A1	NTC	Se desconoce.	FAM
	A2	HT	Se desconoce.	FAM
	A3	WT	Se desconoce.	FAM
	A4	MT	Se desconoce.	FAM

6.5.4. LightCycler® PRO Instruments

En la configuración de los pocillos se debe seleccionar el LCAP correspondiente. Los patrones de fusión y NTC se deben asignar a la posición del pocillo asociada.

Pos .	ID de la muestra	Función de la muestra	Genotipo
1	1004_FactorV_NTC	Sin control de plantilla	
2	Factor V_HT	Patrón de fusión	Factor V G1691A Heterocigótico
3	FactorV_WT	Patrón de fusión	Factor V G1691 Sin modificación
4	FactorV_MT	Patrón de fusión	Factor V 1691A Mutante

7. Análisis e interpretación de los datos

7.1. Límites e interferencias

Este ensayo es específico para el ADN G1691A del Factor V.
No se conocen interferencias.

7.2. Calibración

La calibración se debe llevar a cabo siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 6.5, 7.3.1, 7.3.2 y 7.3.3.

7.3. Control de calidad: criterios de aceptación

Para poder llevar a cabo un análisis de genotipado fiable, es esencial que se incluyan un control negativo **NTC** y un control positivo **HT** en cada ciclo de análisis. Para el LightCycler® PRO, es esencial que, además del **NTC** y del control positivo **HT**, se incluyan los dos patrones de genotipado **WT** y **MT** en cada ciclo de análisis. **Nota:** La prueba se lleva a cabo a una temperatura de hibridación de 60 °C, a la cual las sondas no se unirán bien, proporcionando una señal baja, o incluso ninguna señal, en «cuantificación». Por este motivo, los criterios de aceptación están basados solamente en la definición de los patrones de la curva de fusión, como se describe a continuación.

7.3.1. Control negativo

Control negativo **NTC** (obligatorio: posición 1).

El análisis de la curva de fusión del control negativo debe proporcionar un resultado negativo:

No se pueden detectar picos de fusión específicos del ensayo (consulte el apartado 7.3.2).

Si el **NTC** proporcionara uno o más picos específicos (compare la señal con los resultados de la muestra para evitar que el software amplifique ruido de fondo al tamaño de la ventana, sugiriendo la presencia de picos de fusión), entonces se ha producido una contaminación o un error de pipeteo. La sesión no es válida y el procedimiento debe repetirse. Si el problema persiste, cambie el agua y/o los reactivos y repita.

Si se detecta un pico a una temperatura no específica (consulte el apartado 7.3.5), el software podría identificarlo incorrectamente como positivo, por lo que el genotipado automatizado es imposible.

En este caso, para permitir el genotipado automatizado, cambie la muestra NTC de «Control negativo» a «Desconocida» (consulte el apartado 6.5); alternativamente, los resultados pueden leerse a partir de las temperaturas de fusión (consulte el apartado 7.7). No se aplica con los LightCycler® PRO Instruments.

7.3.2. ADN de control positivo

Control positivo **HT** (Obligatorio: posición 2).

El análisis de la curva de fusión siempre debe proporcionar dos picos de fusión.

HT imita muestras clínicas **heterocigóticas**.

Consulte el apartado **7.7 Interpretación de los resultados** para ver la temperatura de fusión esperada.

7.3.3. Patrones de genotipado de ADN

Los patrones de genotipado son **obligatorios** en **cada** ciclo de análisis realizado en el

LightCycler® PRO.

Patrón de genotipado **WT** (opcional: posición 3).

El análisis de la curva de fusión siempre debe mostrar un único pico de fusión.

WT imita muestras clínicas de tipo **no modificado** homocigóticas.

Patrón de genotipado **MT** (opcional: posición 4).

El análisis de la curva de fusión siempre debe mostrar un único pico de fusión.

MT imita muestras clínicas homocigóticas **mutantes**.

Consulte el apartado **7.7 Interpretación de los resultados** para ver la temperatura de fusión esperada.

7.3.4. muestras

El resultado del presente ensayo debe mostrar uno o dos picos de fusión.

No se esperan más de dos picos por muestra.



Los perfiles de los picos de fusión deben ajustarse a los criterios de aceptación descritos en el presente capítulo y en el apartado **7.7 Interpretación de los resultados**.



Antes de repetir un ensayo, tenga en cuenta los errores comunes; compruebe en particular el perfil de amplificación, que se han utilizado la mezcla maestra y la concentración de MgCl₂ correctas, y tenga en cuenta que también un almacenamiento inadecuado de los reactivos puede producir un error de este producto.

7.3.5. Curvas de fusión anormales

Una curva de fusión inesperada podría deberse a una preparación incorrecta de la muestra, a un defecto en el producto o a una variante bajo la región de unión de la sonda. Se debe repetir todo el procedimiento (preparación de la muestra, amplificación y detección). Si persiste la curva de fusión anormal, se tendrá que usar otro método para identificar la secuencia. Envíe el fragmento de PCR para su secuenciación para confirmar la secuencia o la identidad de cualesquiera mutaciones desconocidas.

Con fines de mejora del producto y de vigilancia posterior a la comercialización, envíe muestras de fusión que muestren desviaciones a los laboratorios TIB Molbiol GmbH, Berlín. Póngase en contacto con service@tib-molbiol.de antes de enviarlas. En el apartado **7.8.2 Variantes poco frecuentes** se presentan ejemplos de variantes conocidas.

7.4. Almacenamiento de patrones de genotipado externos



(No se aplica a versiones del software de LC1.x inferiores a la 4.0, LightCycler®96 ni a los LightCycler® PRO Instruments)

Tras el análisis del genotipado, si las muestras 1 a 4 cumplen los criterios de aceptación (consulte el apartado 7.3), guarde los patrones de genotipado como se indica y úselos en los próximos ciclos de análisis.

7.4.1. Instrumentos que utilizan capilares

En la ventana Melting Curve analysis - Genotyping (Análisis de la curva de fusión: genotipado), abra el menú «Standard (Int)» y seleccione «Save standards as External» (Guardar patrones como externos).

7.4.2. LightCycler® 480 Instruments

En la ventana Melting Curve analysis - Genotyping (Análisis de la curva de fusión: genotipado), abra el menú «Standards (In-run)» y seleccione «Save as ext.» (Guardar como ext.).

7.4.3. LightCycler® PRO Instruments

Se deben utilizar los dos patrones de genotipado en cada ciclo de análisis.

7.5. Lectura de los resultados

Los picos de fusión discriminan entre genotipos: heterocigótico, sin modificación genética y mutante.

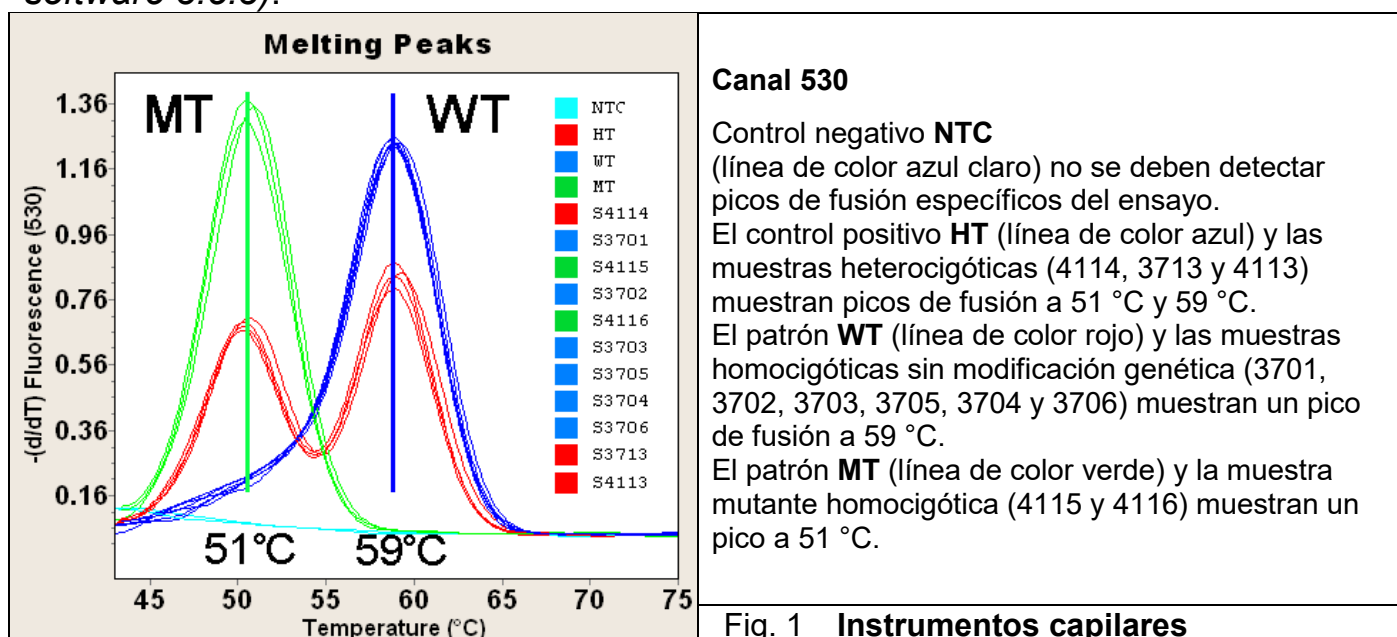
Las curvas de amplificación no contienen ninguna información analítica (consulte el apartado 7.3 Control de calidad: criterios de aceptación).

El uso del módulo de genotipado integrado en el software LightCycler® 2.0 y LightCycler® 480 es opcional; en caso de fallo del módulo de genotipado automatizado (puntuación <0,6 o res<0,4), pase a identificación manual de la curva de fusión (T_m calling) y compare los resultados con la tabla del capítulo 7.7. Interpretación de los resultados.



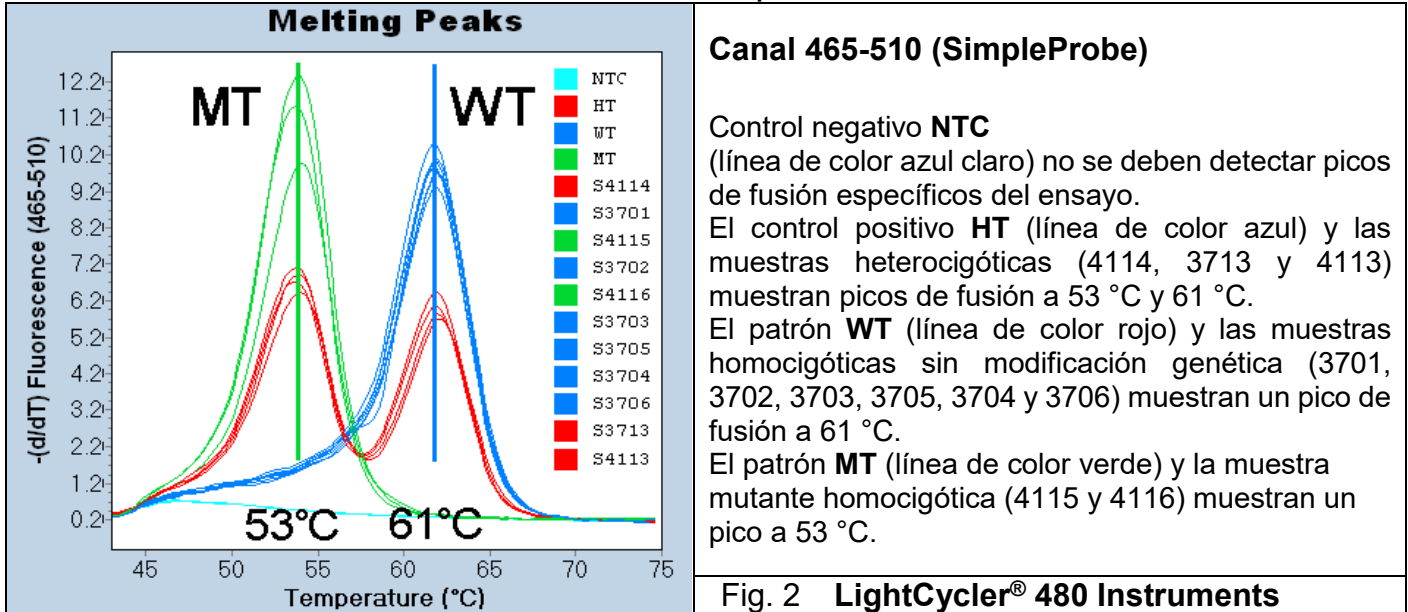
7.5.1. Análisis de fusión: Instrumentos que utilizan capilares

Consulte los datos de fusión en el canal 530 (canal F1 para LC1.x, versión de software 3.5.3).



7.5.2. Análisis de fusión: LightCycler® 480 Instruments

Consulte los datos de fusión en el canal SimpleProbe.

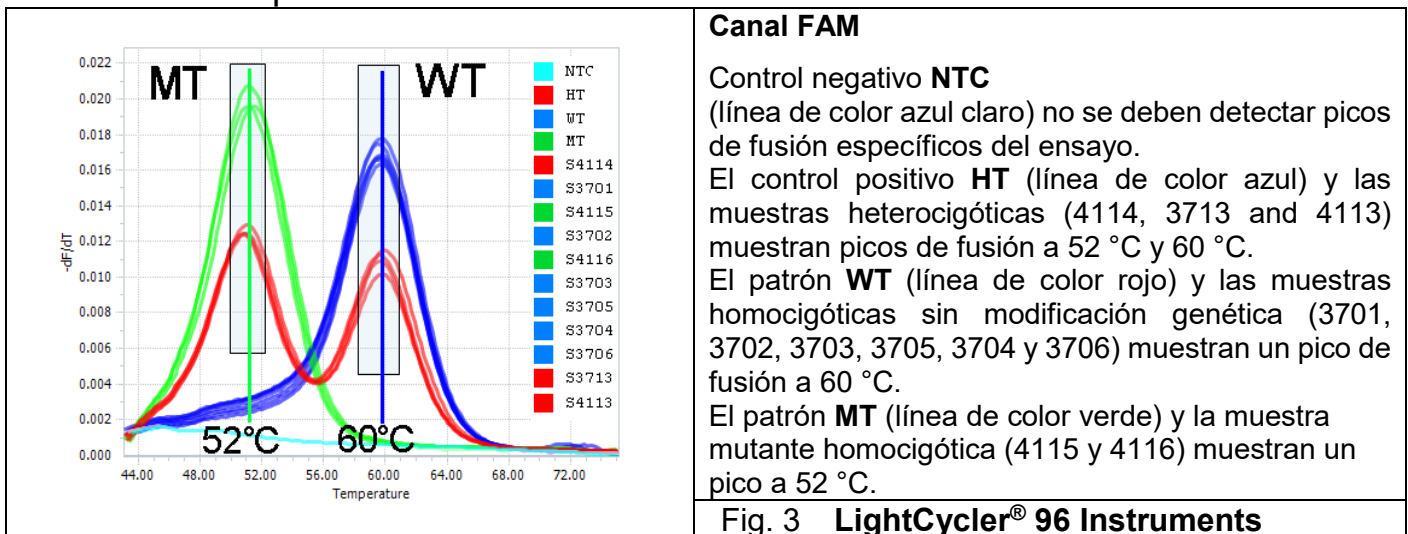


7.5.3. Análisis de fusión: LightCycler® 96 Instruments

Añadir análisis: **Tm Calling**

Consulte los datos en: **Pico de fusión**

Seleccione los picos usando la: **Herramienta de marcador de área**



7.5.4. Análisis de genotipado: LightCycler® PRO Instruments

Realice el análisis de los datos como se describe en la Asistencia al usuario del sistema LightCycler® PRO.

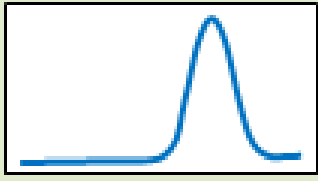
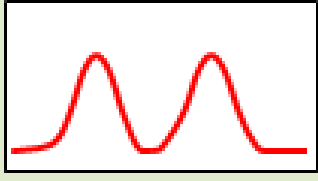
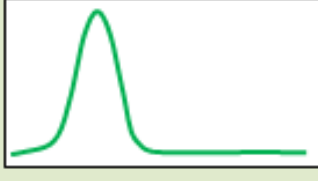
Revise y apruebe los resultados en la pestaña Resultados objetivo. Es necesario mejorar los resultados de los patrones de fusión (**WT**, **HT**, **MT**) y **NTC** antes de aprobar los resultados de muestras desconocidas. Se pueden sobrescribir resultados; los resultados que se sobrescriban se marcarán. En la pestaña Resultados de las muestras se pueden publicar los resultados aprobados.

7.6. Temperatura de fusión esperada

Genotipo:	homocigoto mutante Factor V 1691A/A	heterocigoto Factor V 1691G/A	no modificado Factor V 1691G/G
Número de picos de fusión	1	2	1
Temperatura de fusión de los picos	51-53 °C	51-53 °C y 59-61 °C	59-61 °C
Diferencia de temperatura entre picos	---	8 °C	---
Fenotipo	Resistencia APC Riesgo fuertemente aumentado	Parcial Resistencia APC	Asintomático

Tab. 6. Resultados típicos del análisis realizado en los LightCycler® 480 Instruments

7.7. Interpretación de los resultados

Factor V G1691A Canal 530 Pico(s) de fusión		Genotipos del Factor V	Metabolizadores Fenotipo
1691A	G1691		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Tipo no modificado Factor V 1691G/G	Asintomático
-	59-61		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		compuesto Factor V 1691G/A	Resistencia APC parcial Riesgo aumentado
51-53	59-61		
Melting Peaks  530 Temperature (°C)		Homocigoto mutante Factor V 1691A/A	Resistencia APC Riesgo fuertemente aumentado
51-53	-		
ΔTm 8 °C			

Tab. 7. Resultados típicos del análisis



Variaciones permitidas en las temperaturas de fusión

±0.5 °C	entre muestras del mismo genotipo
±1.5 °C	entre el patrón de genotipado y las muestras biológicas
±1.5 °C	de ΔT entre los picos de fusión de las muestras heterocigóticas.
±1.5 °C	entre picos de fusión con el mismo genotipo entre ciclos de análisis
±5.0 °C	entre las temperaturas indicadas aquí y los valores obtenidos por instrumentos locales. Esta variación depende del instrumento: consulte siempre la temperatura obtenida con el control positivo HT incluido en el análisis.

7.8. Información adicional

7.8.1. Datos típicos de la amplificación

Las curvas de amplificación no contienen ninguna información analítica (consulte el apartado 7.3 Control de calidad: criterios de aceptación).

7.8.2. Variantes poco frecuentes

Las secuencias utilizadas en este producto no tienen interferencias con otras variantes génicas conocidas; las nuevas variantes generarán normalmente un pico a una T_m diferente a WT o MT. Para demostrar la capacidad del ensayo para discriminar el genotipo correcto, se utilizan dianas sintéticas que imitan todas las variantes recogidas en el GeneBank (noviembre de 2023). Los valores de T_m absolutos obtenidos con las dianas sintéticas pueden diferir de los obtenidos con muestras biológicas; sin embargo, los **ΔT_m relativos deben permanecer constantes**.

Este kit no tiene como finalidad identificar variantes diferentes a las especificadas en el apartado **1.2 Uso previsto**. Debe utilizarse otro método para identificar secuencias que presenten picos de fusión anormales (consulte los apartados **7.3.5** y **7.7**).

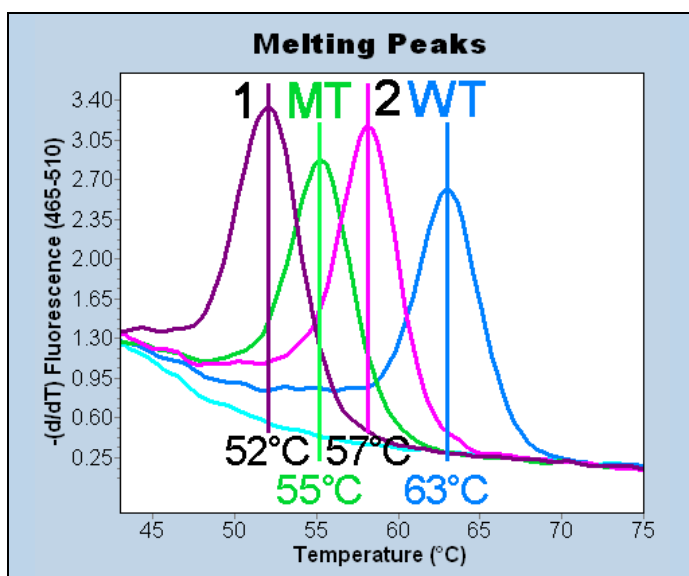


Fig. 4 Datos de fusión de variantes poco frecuentes

n.º	RS	Tm	HGVS	RAM
WT		63 °C		
MT	rs6025	55 °C	NM_000130.4:c.1601G>A	T=0,01926 (2418/125568)
1	rs6025 + rs770011773	52 °C	NM_000130.4:c.1600-1601CG>TA	1 informe
2	rs770011773	57 °C	NM_000130.4:c.1600C>T	A=0,00001 (1/125568)

FAM = recuento del alelo minoritario; **N.D.** = no disponible

Las variantes experimentalmente probadas con código rs (dbSNP), nomenclatura de la Human Genome Variation Society (HGVS) y frecuencias de alelos (según datos del TOPMed).

Las temperaturas (Tm) se recogieron usando dianas sintéticas. Los valores de Tm no se deben utilizar para la predicción del genotipo. Utilice la información indicada en los apartados 7.5 a 7.7.

8. Solución de problemas

Códigos específicos del instrumento	Instrumentos que utilizan capilares	Instrumentos LightCycler® 96, 480 y PRO
Evento	Causa posible	Solución
No se ha detectado ninguna muestra	Sin centrifugado	Capilar de centrifugado
Todas las PCR negativas	Selección incorrecta del canal de detección	Seleccione el canal correcto antes de realizar el análisis
	Protocolo de amplificación incorrecto	Compruebe el programa del instrumento
Línea base inconsistente entre varias muestras	Pipeteado incorrecto	Asegúrese de la homogeneidad de la cantidad de mezcla en cada muestra
	Mezcla de reacción no homogénea	Pipetee la mezcla de reacción arriba y abajo 10 veces con una punta limpia de 200 µl antes de distribuirla en el recipiente de reacción
	Placa multipocillos mal sellada	Asegúrese de que la placa multipocillo está correctamente sellada
Valores iniciales Con forma de dientes de sierra	Burbuja en el pocillo	Centrifugue la placa antes del ciclo de análisis
	Colocación incorrecta del capilar en el carrusel	Presione firmemente el capilar en el carrusel
No hay señal en el control positivo	Error al configurar el instrumento	Compruebe los ajustes de posición del control positivo
	Concentración incorrecta de PSR/MgCl ₂	Repita el ensayo
	Degradación del control positivo o del patrón	Utilice una nueva alícuota de control positivo o patrón
Señal positiva en control negativo NTC	Error al configurar el instrumento	Compruebe los ajustes de posición del control negativo
	Error de dispensación	Cumpla con la ficha de trabajo al dispensar muestras, controles negativos, controles positivos y patrones
	Error de dispensación	Cambie siempre las puntas entre muestras
	Error de dispensación	Evite derramar el contenido del tubo de ensayo de la muestra
	Contaminación del agua de calidad PCR.	Utilice una nueva alícuota de agua de calidad PCR

	Contaminación de la mezcla de reacción	Utilice nuevas alícuotas de reactivos para preparar la mezcla de reacción
	Contaminación de la zona de extracción/preparación de las reacciones de amplificación	Limpie las superficies y el instrumental con detergentes acuosos, lave las batas de laboratorio, sustituya los tubos de ensayo y las puntas en uso
	Contaminación de la zona de extracción/preparación de las reacciones de amplificación	Añada Uracil ADN glucosilasa LightCycler® (n.º de cat. 03 539 806 001) a la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones
No hay señal en las muestras	Baja cantidad de ADN	Compruebe la concentración de ADN
	Inhibición de la muestra	Diluya la muestra y repita la PCR, o bien repita la extracción y la PCR, o bien añada control positivo y repita
Curva de fusión fuera del intervalo de temperatura esperado	Con Tm de los picos que concuerda con el control positivo: Concentración incorrecta de reactivo	Asigne manualmente los resultados correspondientes al control positivo
	Con Tm de los picos que no concuerda con el control positivo: Posible inhibidor de la extracción	Repita el ensayo diluyendo el ADN 1:3
	Con Tm de los picos que no concuerdan con el control positivo: Posible mutación diferente	Repita el ensayo mediante secuenciación e informe de la variante inesperada escribiendo a service@tib-molbiol.de

9. Referencias

1) Bertina, R. M., Koeleman, B. P. C., Koster, T., Rosendaal, F. R., Dirven, R. J., de Ronde, H., van der Velden, P. A., Reitsma, P. H.

Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.

Nature 369: 64-67, 1994.

2) Ridker PM1, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE.

Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening.

JAMA. 23-30 Abr 1997;277(16):1305-7.

3) Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, Korf BR, Heit JA; ACMG Factor V. Leiden Working Group.

Am. College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing.

Genet Med. 2001 Mar-Apr;3 (2):139-48.

4) Press RD, Bauer KA, Kujovich JL, Heit JA.

Clinical utility of factor V Leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders.

Arch Pathol Lab Med. Nov 2002;126(11):1304-18.

5) Rodger MA, Paidas M, McLintock C, Middeldorp S, Kahn S, Martinelli I, Hague W, Rosene Montella K, Greer I.

Inherited thrombophilia and pregnancy complications revisited.

Obstet Gynecol. Ago 2008;112(2 Pt 1):320-4

6) Lindqvist, P. G., Svensson, P. J., Dahlback, B., Marsal, K.

Factor V Q-506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss: a possible evolutionary selection mechanism.

Thromb. Haemost. 79: 69-73, 1998

7) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=72561750

Aviso para el consumidor: patentes y marcas comerciales

La compra del presente producto otorga el derecho a utilizarlo para realizar la amplificación y detección de secuencias de ácidos nucleicos con fines de diagnóstico *in vitro* en muestras de origen humano. No se transfiere ningún otro tipo de licencia, excepto el derecho a utilizar el presente producto derivado de su compra.

Aparte de las licencias indicadas expresamente, TIB MOLBIOL no garantiza que este kit y/o su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.

LightCycler®, MagNA Pure® y High Pure® son marcas comerciales propiedad de Roche Diagnostics. El analizador genético ABI 3730xl y el análisis de secuenciación son productos registrados por Applied. LightMix® es una marca comercial propiedad de TIB MOLBIOL. SimpleProbe®, las sondas de hibridación y los kits LightMix® se fabrican con licencia de Roche.

Historial de versiones

Las notas en rojo marcan los eventos que requieren cambiar los procedimientos de laboratorio

Las notas en azul marcan las mejoras y los cambios en la composición

software	Evento	Fecha
V170303	Se ha corregido la redacción confusa del apartado 7.3.1. En el apartado 7.8.2, se ha actualizado la FAM de rs770011773	10/04/2017
V190123	En el apartado 7.8.2, se han actualizado los valores de FAM y se ha incluido un nuevo descargo de responsabilidad. 9. Kit 40-2594-64 retirado.	06/01/2019
V240326	Se ha añadido el LightCycler® PRO y MagNa Pure24. Se han eliminado el LightCycler® Nano y el FastStart DNA Master HybProbe. Cambios editoriales.	26/03/2024

Informe sobre las observaciones, desviaciones y problemas del dispositivo, incluyendo los números de lote y una breve descripción de los errores a su representante local de Roche.

Fabricado por:

TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Eresburgstrasse 22-23
D-12103 Berlín, Alemania
www.tib-molbiol.de

