

Elucigene[®] TRP Istruzioni per l'uso

Elucigene[®] è un marchio di Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS[®] è un marchio di AstraZeneca UK Ltd.

QIAamp[®] è un marchio di Qiagen Group

NuSieve[®] è un marchio di Lonza. AmpliTaq Gold[®] è un marchio di Roche Molecular Systems Inc.

I kit Elucigene sono sviluppati e prodotti da Gen-Probe Life Sciences Ltd. nell'ambito di sistemi di qualità accreditati ISO9001:2008 e ISO13485:2003.

Prodotto da Gen-Probe Life Sciences Ltd.

Heron House
Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester
M23 9HZ

Vendita, assistenza clienti e assistenza tecnica:

T: +49 (0) 6122 7076451

F: +49 (0) 6122 7076155

E: customerservice@gen-probe.eu

E: technicalsupport@gen-probe.eu



Elucigene[®] TRP (Thrombosis Risk Panel, test per la valutazione del rischio di trombosi)

Codice catalogo: TH003B2 – 50 test (con MTHFR)

Codice catalogo: TH002B2 – 50 test (senza MTHFR)

Nota: Per il N° Cat. TH002B2 si prega di ignorare tutti i riferimenti all'analisi e ai primer della MTHFR.

Uso previsto

Analisi qualitativa *in vitro* per il rilevamento simultaneo delle mutazioni del fattore V Leiden (R506Q), della protrombina (Fattore II 20210A) e della metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR C677T) in DNA estratto da campioni di sangue intero (conservato in EDTA) o gocce di sangue essiccate su carta da filtro.

Riepilogo e spiegazione

Secondo le stime, negli Stati Uniti la trombosi venosa provoca 50.000 decessi all'anno con un'incidenza annua di 1 caso su 1000 (1). Sono stati individuati numerosi fattori di rischio che contribuiscono all'insorgenza della trombosi quali, ad esempio, gli interventi chirurgici, la gravidanza, l'uso di contraccettivi orali e l'immobilizzazione prolungata (sindrome da classe economica) (2).

Il delicato equilibrio del processo di coagulazione del sangue è influenzato anche da un elemento genetico. La coagulazione del sangue è un processo biochimico complesso nel quale sono coinvolti numerosi fattori di stimolazione o inibizione, che possono portare a coagulazione insufficiente (emofilia) o eccessiva (trombofilia). Tra questi, sono stati identificati tre fattori chiave ritenuti responsabili della maggior parte dei casi di trombofilia ereditaria (3)(4)(5). Le mutazioni nei geni di questi fattori sono degli utili indicatori dell'aumento del rischio di trombosi venosa. Essi sono il fattore V Leiden (R506Q), il fattore II (protrombina 20210A) e la MTHFR (677C>T). La MTHFR (metilene tetraidrofolato reduttasi) è fondamentale per il mantenimento dei livelli di omocisteina che interviene nel processo di coagulazione del sangue.

Il fattore V Leiden è responsabile della forma più diffusa di trombofilia ereditaria. L'eterozigosi per il fattore V Leiden si verifica in una percentuale compresa fra il 3% e l'8% della popolazione generale europea e statunitense (6). La frequenza dell'omozigosi per la mutazione del fattore V Leiden è di circa 1 su 5000, benché la prevalenza vari considerevolmente fra diverse popolazioni. Il rischio di tromboembolismo venoso è dipendente sia da fattori genetici sia da fattori "acquisiti". L'età è un fattore importante, che fa aumentare il rischio di una percentuale maggiore negli individui con una mutazione del fattore V Leiden. Un individuo eterozigote per la mutazione del fattore V Leiden ha una probabilità 7 volte maggiore di sviluppare un tromboembolismo venoso, mentre il rischio per un individuo omozigote per il fattore V Leiden è 80 (ottanta) volte maggiore (7). Esistono anche altri fattori di rischio genetico (protrombina 20210A e MTHFR 677C) che contribuiscono ad aumentare il rischio; ad esempio, un eterozigote per il fattore V Leiden ha un rischio 20 volte maggiore se risulta eterozigote anche per il fattore 20210A (8). Nelle donne che fanno uso di contraccettivi orali, il rischio di trombosi venosa aumenta di 30 volte in caso di eterozigosi per il fattore V Leiden oppure di diverse centinaia di volte in caso di omozigosi per il fattore V (9).

Le analisi sono rivolte generalmente a pazienti al di sotto dei 50 anni con trombosi venosa e pazienti o familiari con anamnesi familiare di malattia trombotica. L'analisi viene garantita anche ai familiari di individui con fattore V Leiden noto e alle donne in cui si verificano aborto spontaneo ricorrente, grave gestosi o morte intrauterina. La conoscenza dello stato del fattore V Leiden può influenzare il modo in cui verrà portata avanti una gravidanza o la decisione di assumere o meno contraccettivi orali (10). Una volta identificato il fattore V Leiden è molto importante, per completare il quadro anamnestico, analizzare anche gli altri fattori di rischio della trombosi quali, ad esempio, la protrombina (fattore II) e la MTHFR. I vantaggi dell'identificazione delle mutazioni del fattore V Leiden in pazienti con trombosi venosa sta nel fatto che i loro familiari asintomatici possono decidere di sottoporsi a specifiche analisi per stabilire se anch'essi presentano un rischio elevato. In questo modo, per tali individui sarà possibile pianificare un trattamento antitrombotico mirato durante i periodi di rischio maggiore: in vista di un intervento chirurgico, di una gravidanza, durante l'assunzione di contraccettivi orali o per lunghi periodi di immobilizzazione, ad esempio quando si effettuano voli su lunghe tratte (11).

Principi della procedura

Il metodo impiegato dal test Elucigene TRP si basa sul sistema di mutazioni refrattarie all'amplificazione (Amplification Refractory Mutation System, ARMS), una tecnologia di amplificazione mediante PCR allele-specifica che è in grado di rilevare mutazioni puntiformi o piccole delezioni nell'acido deossiribonucleico (DNA)(12). Il test include due miscele di reazione complementari. La prima miscela di reazione amplifica in modo specifico tutti gli alleli TRP che non presentano mutazioni del fattore V Leiden (R506Q), del fattore II (protrombina 20210A) e della MTHFR (677C>T), ad esempio gli alleli wild-type. Al contrario, la seconda miscela di reazione contiene dei primer che amplificano in modo specifico solo gli alleli mutanti R506Q, 20210A e 677C>T. Ciascuna miscela di reazione contiene anche dei primer che amplificano le sequenze di DNA non codificanti per il fattore V Leiden, la protrombina e la MTHFR; questi primer rappresentano un controllo interno del test che indica che l'amplificazione è avvenuta correttamente. I prodotti di amplificazione (ampliconi) delle due reazioni vengono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio. La presenza o l'assenza delle bande sul gel indica lo stato degli alleli del fattore V Leiden (R506Q), del fattore II (protrombina 20210A) e della MTHFR (677C>T).

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico in vitro.
2. Il DNA di controllo fornito con questo kit, di origine umana e testato indipendentemente con un'analisi basata sulla PCR, è risultato negativo per il virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV) e per il virus dell'immunodeficienza umana 1 (HIV1).
3. Si consiglia di manipolare con cautela il materiale di origine umana. Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente infettivi. Nessun metodo di analisi può offrire la certezza assoluta dell'assenza dei virus HBV, HCV e HIV 1 o di altri agenti infettivi. La manipolazione dei campioni e dei componenti del test, il loro utilizzo, la conservazione e lo smaltimento devono avvenire in conformità con le procedure definite dalle rispettive linee guida o dai regolamenti nazionali in materia di sicurezza e rischio biologico.
4. Conservare tutti i componenti a temperature inferiori a -20 °C. Eliminarli dopo 3 mesi dall'apertura, a meno che non siano stati suddivisi in aliquote.

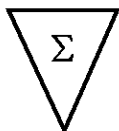
5. In osservanza delle buone pratiche di laboratorio correnti, in ciascuna analisi i laboratori devono utilizzare i propri campioni di controllo qualità interno contenenti un genotipo noto, in modo da poter valutare la validità della procedura.

Simboli utilizzati sulle etichette

I simboli utilizzati su tutte le etichette e le confezioni sono conformi alla norma armonizzata EN 980.



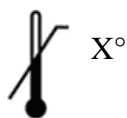
Produttore



Numero di test



Vedere le istruzioni per l'uso



Conservare al di sotto della temperatura indicata



Utilizzare prima della data indicata



Codice catalogo



Numero di lotto o partita

Materiali forniti

I reagenti devono essere conservati in un'area in cui non siano presenti prodotti contaminanti per il DNA o la PCR.

Tutti i reagenti devono essere forniti pronti per l'uso. Sia i reagenti sigillati che quelli aperti devono essere conservati a -20 °C. I reagenti aperti possono essere conservati per un massimo di 3 mesi.

Sono forniti materiali sufficienti per 50 test:

1. 2 fiale x 450 µl di miscela di primer A (TA) contenente primer specifici per l'amplificazione degli alleli che non presentano mutazioni per il fattore V, il fattore II o la MTHFR, primer di controllo e deossinucleotidi trifosfato in tampone (TH003TA, TH002TA (senza MTHFR)).
2. 2 fiale x 450 µl di miscela di primer B (TB) contenente primer specifici per l'amplificazione degli alleli che presentano mutazioni per il fattore V, il fattore II o la MTHFR, primer di controllo e deossinucleotidi trifosfato in tampone (TH003TB, TH002TB (senza MTHFR)).
3. 1 fiala x 600 µl di colorante di caricamento (LD). (CR000TR)
4. 1 fiala x 200 µl di tampone di diluizione (DB). (CR000TV)
5. 1 fiala x 50 µl di controllo per il DNA (DC), normale per le mutazioni del fattore V Leiden R506Q e della protrombina 20210A e omozigote per la variante allelica della MTHFR 677C. (CR002TX)

Materiali richiesti ma non forniti

Consumabili di laboratorio: guanti; provette per microcentrifuga con tappo a vite; puntali; provette per PCR a parete sottile da 0,2 ml o da 0,5 ml (utilizzando due provette di diverso colore risulterà più semplice identificare la miscela di primer).

Preparazione del DNA: acqua deionizzata sterile di buona qualità; cloruro di sodio (NaCl); sale disodico dell'acido etilendiamminotetra-acetico (EDTA disodico); idrossido di sodio in perle (NaOH); 2-ammino-2-(idrossimetil)-1,3-propandiolo (Tris-base) cristallizzato; acido cloridrico al 36% p.sp.1,18 (HCl); cloruro di ammonio (NH₄Cl).

Amplificazione mediante PCR: olio minerale bianco leggero Sigma*; acqua distillata sterile di buona qualità; AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

Elettroforesi: materiali per elettroforesi su gel, tra cui agarosio NuSieve® 3:1 (Lonza); 50 Base-Pair Ladder (GE Healthcare); etidio bromuro.

* Per amplificazione eseguita in provette per PCR da 0,5 ml o termociclatori senza coperchio riscaldante.

Apparecchiature necessarie

Apparecchiature di laboratorio: pipette di precisione (2 set: uno per la pre-amplificazione e uno per la manipolazione post-amplificazione, preferibilmente pipette a spostamento positivo); vetreria; indumenti di protezione; agitatore vortex; microcentrifuga; bilancia; rastrelliere per provette.

Preparazione del DNA: blocco riscaldante (riscaldamento fino a 100 °C).

Amplificazione: termociclatore per provette da 0,5 ml o 0,2 ml (con accuratezza di temperatura di +/-1 °C tra 33 °C e 100 °C e uniformità di temperatura statica di +/-1 °C), coperchio riscaldante opzionale.

Elettroforesi: vaschetta per gel orizzontale; pacco di alimentazione; forno a microonde; bagno termostato per raffreddare l'agarosio; transilluminatore UV; sistema fotografico.

Prelievo e conservazione dei campioni

È richiesto l'utilizzo di campioni di sangue intero (in EDTA) o gocce di sangue essiccate su carta da filtro.

È stato segnalato che talvolta i dispositivi di prelievo dei campioni hanno influito in modo negativo sull'integrità di determinati analiti e che potrebbero interferire con alcune tecnologie metodologiche(9). Si raccomanda a ciascun operatore di assicurarsi che il dispositivo scelto venga utilizzato secondo le istruzioni del produttore e che i dispositivi di prelievo dei campioni e i metodi alternativi di preparazione del DNA siano compatibili con questo test.

I campioni di sangue devono essere conservati a -20 °C prima della preparazione del DNA. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente il campione.

Preparazione del DNA da campioni di sangue intero (in EDTA)

1. Pipettare 80 µl di ciascun campione di sangue in una provetta per microcentrifuga con tappo a vite.
2. Pipettare 320 µl di soluzione di NH₄Cl 170 mM (9,09 g/l) in ciascuna provetta.
3. Miscelare per 20 minuti agitando e capovolgendo delicatamente la miscela. Non agitare in modo energico per evitare la formazione di schiuma.
4. Centrifugare ciascuna provetta per 2 minuti a 12.000 g fino a quando si formerà un pellet di cellule.
5. Rimuovere ed eliminare il liquido surnatante con una pipetta.
6. Pipettare 300 µl di NaCl 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 10 mM (3,72 g/l) in ciascuna provetta e risospendere le cellule miscelando con il vortex.
7. Centrifugare ciascuna provetta per 1 minuto a 12.000 g fino a quando si formerà un pellet di cellule.
8. Ripetere i passaggi da 5 a 7 per almeno altre due volte fino a quando tutta la colorazione rossastra verrà rimossa dal liquido surnatante.
9. Rimuovere ed eliminare il liquido surnatante con una pipetta.
10. Pipettare 200 µl di soluzione di NaOH 50 mM (2 g/l) in ciascuna provetta e risospendere le cellule miscelando con il vortex.
11. Incubare in un blocco riscaldante a 100 °C per 10 minuti.
12. Pipettare 40 µl di Tris-base/HCl 1 M (121,1 g/l) (pH 7,5) in ciascuna provetta e miscelare con il vortex.
13. Aggiungere 1 ml di acqua deionizzata sterile in ciascuna provetta per microcentrifuga per ottenere un volume totale di campione di DNA pari a 1,24 ml.
14. Centrifugare ciascuna provetta per 1 minuto a 12.000 g fino a quando si formerà un pellet di residui cellulari. Il DNA si trova nel liquido surnatante.

Preparazione del DNA da gocce di sangue essiccate su carta da filtro

1. Con un'apposita pinza perforatrice ricavare 2 dischetti da 3 mm^(b) dalla carta da filtro del campione e trasferirli in una provetta da 1,5 ml con tappo a vite.

I dischetti devono essere ottenuti da un'area della carta da filtro che sia completamente imbevuta di sangue.

Ricavare con la pinza vari dischetti "puliti" ed eliminarli prima di ciascun campione per prevenire la contaminazione da carry-over.

2. Aggiungere 1 ml di NaCl 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 10 mM (3,72 g/l) e miscelare su un agitatore rotante per 15 - 20 minuti. Se non si dispone di un agitatore rotante, potrebbe essere necessario prolungare i lavaggi fino a 30 minuti per ciascun campione.
3. Rimuovere ed eliminare la soluzione di lavaggio.
4. Ripetere un'altra volta i passaggi 2 e 3.
5. A questo punto, la maggior parte del gruppo eme dovrebbe essere eluita dal dischetto. In questa fase non è raro osservare una lieve colorazione marrone-rossastro sui dischetti di sangue.
6. Centrifugare brevemente (per 3 secondi) con una microcentrifuga per raccogliere la soluzione di lavaggio residua sul fondo della provetta. Utilizzando una pipetta, rimuovere ed eliminare quanto più possibile la soluzione di lavaggio, senza toccare i dischetti.
7. Questo breve passaggio con microcentrifuga rimuove tipicamente gli altri gruppi eme dai dischetti di sangue.
8. Aggiungere 150 µl di NaOH 50 mM (2 g/l) in ciascuna provetta. Scuotere delicatamente con le dita per miscelare.
9. Portare ad ebollizione nel blocco riscaldante per 10 minuti. Il blocco riscaldante deve essere equilibrato a 100 °C.
10. Centrifugare brevemente con una microcentrifuga per raccogliere il surnatante sul fondo della provetta.
11. Aggiungere 30 µl di Tris-base/HCl 1 M (121,1 g/l) (pH 7,5) in ciascuna provetta per far avviare la reazione di neutralizzazione, quindi miscelare delicatamente.
12. Aggiungere 420 µl di acqua sterile Sigma a ciascun campione di DNA per ottenere un volume totale di 600 µl.
13. Miscelare i campioni e centrifugare con una microcentrifuga per raccogliergli sul fondo della provetta.
14. Trasferire il surnatante in una provetta pulita con tappo a vite a cui è stata applicata un'etichetta.

Conservare il DNA estratto a -20 °C.

^(b) La superficie totale del campione di sangue utilizzato deve essere equivalente almeno a quella di 2 dischetti di sangue da 3 mm. Ad esempio, se occorre si può utilizzare un dischetto da 6 mm.

In aggiunta alla procedura descritta, è stato utilizzato anche il QIAmp DNA Blood Kit (Qiagen) per la preparazione del DNA da campioni di sangue liquido intero, ottenendo risultati riproducibili e interpretabili.

I metodi di preparazione del DNA descritti sopra sono raccomandati da Gen-Probe Life Sciences ed è stato dimostrato che sono in grado di fornire risultati affidabili e ripetibili. Il DNA preparato utilizzando altri metodi o altri tipi di campioni potrebbe non essere ottimale per il test Elucigene TRP e potrebbe fornire risultati poco affidabili. I criteri fondamentali da tenere in considerazione quando si utilizzano metodi alternativi per la preparazione del DNA sono la concentrazione del DNA e l'assenza di inibitori della PCR.

Prima di utilizzare i risultati a scopo diagnostico, si raccomanda di valutare accuratamente con il test Elucigene TRP i metodi e i tipi di campioni alternativi. È sconsigliabile analizzare

campioni di DNA a concentrazioni inferiori a 10 ng/5 µl. In condizioni ottimali per la PCR, risultati ripetibili si ottengono a concentrazioni di DNA comprese tra 10 e 100 ng/5 µl.

Nota: La qualità e la resa del DNA possono variare. Pertanto, in alcuni casi, potrebbe essere necessario diluire la soluzione finale di DNA di altre 5 volte per garantire un'amplificazione efficiente.

Protocollo di analisi

Procedura di amplificazione

I valori riportati nelle tabelle 1 e 2 possono essere aumentati in modo proporzionale per numeri di test diversi da quelli specificati. Tuttavia, dati i piccoli volumi coinvolti, Gen-Probe Life Sciences raccomanda di preparare non meno di 5 test alla volta.

1. Programmare il termociclatore con un tempo di ritardo che consenta l'attivazione dell'AmpliTaq Gold a 94 °C per 20 minuti seguita da 35 cicli di amplificazione alle seguenti temperature: 30 secondi a 94 °C (denaturazione), 2 minuti a 58 °C (appaiamento) e 1 minuto a 72 °C (estensione). A questo programma deve seguire da una fase attivata dopo il ciclo finale con un tempo di ritardo di 20 minuti a 72 °C (estensione).

Nota: Per PCR eseguite in provette da 0,5 ml selezionare l'opzione "Block" sul termociclatore.

2. Scongellare e centrifugare per 10 secondi a 12.000 g la miscela di primer A (TA), la miscela di primer B (TB), l'AmpliTaq Gold (non fornita), il colorante di caricamento (LD) e il tampone di diluizione (DB) nelle fiale, miscelare delicatamente con il vortex e centrifugare di nuovo le fiale per 10 secondi.

Nota: I passaggi da 3 a 6 devono essere effettuati in un'area priva di DNA

3. Facendo riferimento alla tabella 1, preparare una diluizione dell'AmpliTaq Gold in tampone di diluizione a cui vengono aggiunti il colorante di caricamento e l'acqua distillata sterile in base al numero di campioni e controlli da analizzare. **Miscelare con cura aspirando e rilasciando delicatamente con una pipetta.**

Tabella 1 - Diluizione dell'AmpliTaq Gold

	Numero di test richiesti			
	5	10	20	50
Volume di acqua distillata sterile (µl)	21	42	84	210
Volume del colorante di caricamento (µl)	30	60	120	300
Volume del tampone di diluizione (µl)	6	12	24	60
Volume dell'AmpliTaq Gold (µl)	3	6	12	30
Volume totale (µl)	60	120	240	600

4. Facendo riferimento alla tabella 2, preparare le miscele di reazione A e B. Trasferire l'aliquota appropriata di miscela di primer A in una provetta per microcentrifuga a cui è stata applicata un'etichetta. Ripetere l'operazione con la miscela di primer B trasferendone un'aliquota in un'altra provetta. Aggiungere il volume appropriato di diluizione dell'AmpliTaq Gold (ottenuta con il passaggio 3) in ciascuna provetta per microcentrifuga utilizzando puntali diversi. Miscelare delicatamente con il vortex e centrifugare le provette per 10 secondi a 12.000 g.

Tabella 2 - Preparazione delle miscele di reazione A e B

	Numero di test richiesti							
	5		10		20		50	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Volume della miscela di primer A (µl)	82,5		165		330		825	
Volume della miscela di primer B (µl)		82,5		165		330		825
Volume dell'enzima diluito (µl)	27,5	27,5	55	55	110	110	275	275
Volume totale (µl)	110	110	220	220	440	440	1100	1100

5. Per ciascun campione contrassegnare una provetta con la lettera "A" e una provetta con la lettera "B" oppure, se sono disponibili provette colorate, utilizzare un colore diverso per ogni miscela di primer.
6. Pipettare 20 µl della miscela di reazione A preparata sul fondo di ciascuna provetta per PCR con il numero appropriato e contrassegnata con la lettera "A". Ripetere l'operazione pipettando la miscela di reazione B in ciascuna provetta per PCR con il numero appropriato e contrassegnata con la lettera "B".
7. Aggiungere 5 µl di campione di DNA da analizzare in ciascuna coppia di provette A e B utilizzando ogni volta puntali diversi. Aggiungere una goccia di olio minerale bianco leggero Sigma per coprire la fase acquosa *. Chiudere bene il tappo della provetta.
8. Come controllo negativo utilizzare una coppia di provette A e B in cui non viene aggiunto il DNA. Aggiungere una goccia di olio minerale bianco leggero Sigma per coprire la fase acquosa *. Chiudere bene il tappo della provetta.
9. Centrifugare le provette A e B per 10 secondi a 12.000 g.
10. Posizionare tutte le provette nel blocco del termociclatore in modo che siano ben ferme. Avviare la fase con tempo di ritardo a 94 °C seguita dal programma dei cicli di amplificazione.
11. Eliminare tutti i residui non utilizzati della diluizione dell'AmpliTaq Gold e delle miscele di reazione A e B preparate.
12. Al termine dei cicli di amplificazione, i campioni possono essere conservati a temperatura ambiente per tutta la notte oppure a una temperatura compresa fra 2 °C e 8 °C fino a 7 giorni prima di essere analizzati mediante elettroforesi su gel.

* Per amplificazione eseguita in provette per PCR da 0,5 ml o termociclatori senza coperchio riscaldante.

Elettroforesi su gel

Si raccomanda a ciascun operatore di assicurarsi che le apparecchiature scelte vengano utilizzate secondo le istruzioni del produttore e che siano compatibili con questo test. In questo contesto, i parametri fondamentali sono le dimensioni della matrice di gel e le dimensioni del pettine (per la formazione dei pozzetti). I risultati sono stati ottenuti con le seguenti condizioni di elettroforesi:

1. Il prodotto di PCR è stato sottoposto a elettroforesi su un gel di agarosio al 3% NuSieve® 3:1 utilizzando come tampone di corsa tris-borato con etidio bromuro (TBE/EtBr). Il TBE/EtBr è stato preparato con Tris-base 134 mM (16,2 g/l), acido borico 74,9 mM (4,63 g/l), tampone EDTA 2,55 mM (0,95 g/l) a cui sono stati aggiunti 0,1 µg/ml di etidio bromuro.
2. 3g di NuSieve® 3:1 sono stati sciolti in 100 ml di TBE/EtBr e versati in un vassoio per gel orizzontale da 15 x 12 cm con pettini inseriti a 1 mm dalla base del vassoio per formare pozzetti da 1,5 mm x 5 mm.
3. 15 µl di prodotto di PCR di ciascuna provetta sono stati caricati in pozzetti adiacenti sul gel di agarosio.
4. Come marcatore del peso molecolare è stato utilizzato un 50 Base-Pair Ladder (GE Healthcare) caricato in posizione adiacente ai campioni.
5. La corsa elettroforetica è stata condotta applicando un gradiente di potenziale tra gli elettrodi compreso fra 5 e 6 V/cm fino a quando il fronte del colorante ha raggiunto una distanza di 4 cm dai pozzetti di caricamento in direzione dell'anodo (in un arco di tempo compreso tra 1 e 1,5 ore).
6. Al termine dell'elettroforesi, i gel sono stati posizionati su un transilluminatore UV a 260 nm dove sono stati visualizzati e fotografati.

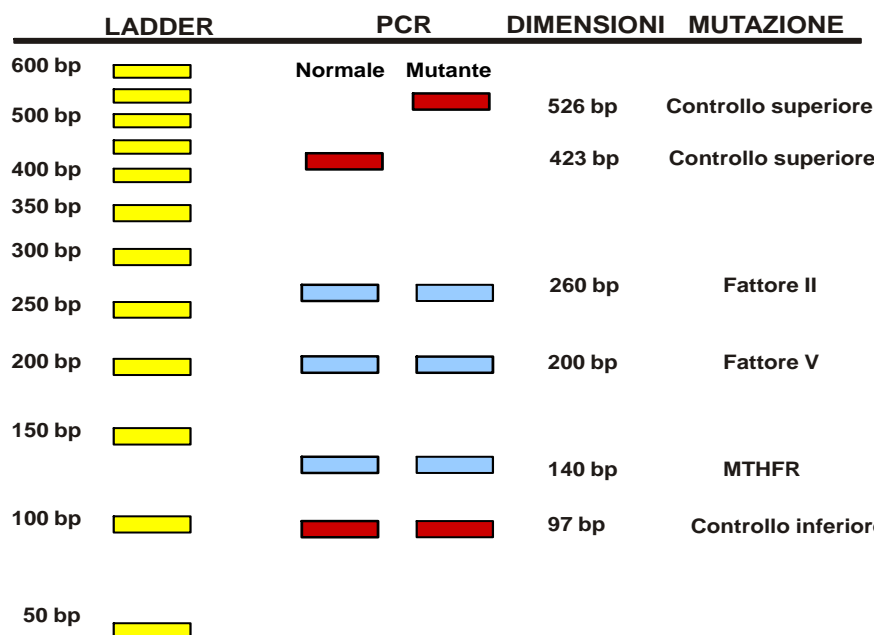
Interpretazione dei risultati

1. Il controllo negativo non deve mostrare alcuna banda nell'area compresa tra le bande di controllo superiori e inferiori (vedere la figura 1).
2. Le bande di controllo superiori e inferiori devono essere chiaramente visibili in tutti i campioni (vedere la figura 1).
3. La posizione delle bande di controllo superiori e inferiori deve indicare le dimensioni corrette dei frammenti (vedere la figura 1).

Se uno qualsiasi dei suddetti passaggi non viene eseguito, i risultati non dovranno essere interpretati e il test non dovrà essere ripetuto.

Nella figura 1 sono riportate in modo schematico la dimensione, in paia di basi, e la relativa posizione nel gel dei prodotti di PCR appartenenti a un genotipo eterozigote per la trombosi (contenente le mutazioni del fattore V, del fattore II o della MTHFR), che ci si aspetta di ottenere utilizzando il reagente del test per la valutazione del rischio di trombosi.

Figura 1



Nota: Il test Elucigene TRP N° Cat. TH002B2 non è in grado di rilevare gli alleli per la MTHFR.

Caratteristiche dell'esecuzione del test

Trenta campioni, precedentemente genotipizzati mediante digestione con enzimi di restrizione, sono stati analizzati con il kit Elucigene TRP (TH003B2) in uno studio interno utilizzando il protocollo raccomandato per il kit. Ventinove campioni di DNA sono stati amplificati correttamente mediante il kit Elucigene TRP. L'amplificazione non è riuscita per uno dei campioni di DNA per il quale, tuttavia, il risultato del test ripetuto è stato accettabile. Ventisei campioni analizzati sono risultati positivi per le mutazioni rilevate dal kit Elucigene TRP; in quattro campioni non è stata rilevata alcuna mutazione. Dei 30 campioni analizzati, 7 sono risultati positivi per la mutazione del fattore V (R506Q), 10 positivi per la mutazione del fattore II (protrombina 20210A) e 16 positivi per la mutazione della MTHFR (677C>T). Tutti i risultati ottenuti con il kit Elucigene TRP sono stati confermati dai risultati della precedente genotipizzazione.

Trenta campioni di sangue intero e di gocce di sangue essiccate su carta da filtro corrispondenti prelevati da trenta individui sono stati analizzati con il kit Elucigene TRP (TH003B2) in uno studio interno utilizzando il protocollo raccomandato per il kit. Diciotto dei campioni corrispondenti analizzati sono risultati positivi per le mutazioni rilevate dal kit Elucigene TRP. Il risultato ottenuto da ciascun campione di sangue intero è stato concorde con il risultato ottenuto utilizzando le gocce di sangue essiccate su carta da filtro prelevate dallo stesso individuo.

Limiti della procedura

1. I risultati di questo e degli altri saggi diagnostici devono essere interpretati congiuntamente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.
2. L'assenza delle mutazioni rilevate da questo kit non costituisce una garanzia dell'assenza di altre mutazioni a carico dei geni del fattore V Leiden, del fattore II e della MTHFR. È possibile che siano presenti altre mutazioni non rilevate da questo kit.
3. Come per qualunque test genetico, risultati erronei possono derivare da campioni di sangue prelevati dopo una recente trasfusione.

L'operatore di questi test è tenuto a sottolineare l'importanza di queste considerazioni nel riportare i risultati al medico o al consulente genetico che esegue la diagnosi.

Bibliografia

1. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost* 2001;86:452-463.
2. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999;82:610-619.
3. Bertina RM, Rosendaal FR. Venous thrombosis – the interaction of genes and environment. *N Engl J Med* 1998;338:1840-1841.
4. 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 Nov 15;88:3698-3703.
5. 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* 2002;126:1304-1318.
6. Zöller B, Hillarp A, Berntorp E, Dahlback B. Activated protein C resistance due to a common factor V gene mutation is a major risk factor for venous thrombosis. *Ann Rev Med* 1997;48:45-58.
7. Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, Cooper PC, Daly ME, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ. Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997;78:1426-1429.
8. Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta* 2003;330:31-55.
9. Hirsch DR, Mikkola KM, Marks PW, Fox EA, Dorfman DM, Ewenstein BM, Goldhaber SZ. Pulmonary embolism and deep venous thrombosis during pregnancy or oral contraceptive use: prevalence of factor V Leiden. *Am Heart J* 1996;131:1145-1148.
10. Bokarewa MI, Bremme K, Blombäck M. Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. *Br J Haematol* 1996;92:473-478.
11. Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, Palomaki GE, Bellissimo DB, Wolff DJ, 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 Jul-Aug;7(6):444-53
12. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucleic Acid Res* 17: 2503-2516 (1989).
13. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet* 343:1509-1510 (1994).