

Instruções de utilização de Elucigene[®] TRP

Elucigene[®] é uma marca registada da Gen-Probe Life Sciences Ltd.

ARMS[®] é uma marca comercial registada da AstraZeneca UK Ltd.

QIAamp[®] é uma marca registada do Qiagen Group

NuSieve[®] é uma marca registada de Lonza. AmpliTaq Gold[®] é uma marca registada da Roche Molecular Systems Inc.

Os kits Elucigene são desenvolvidos e fabricados pela Gen-Probe Life Sciences Ltd. de acordo com sistemas de qualidade acreditados segundo as normas ISO9001:2008 e ISO13485:2003.

Fabricado pela Gen-Probe Life Sciences Ltd.
Heron House
Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe
Manchester
M23 9HZ

Para Vendas, Assistência ao Cliente e Assistência Técnica:

T: +49 (0) 6122 7076451

F: +49 (0) 6122 7076155

E: customerservice@gen-probe.eu

E: technicalsupport@gen-probe.eu



Elucigene[®] TRP (painel de risco de trombose)

Código de catálogo: TH003B2 – 50 testes (com MTHFR)

Código de catálogo: TH002B2 – 50 testes (sem MTHFR)

Nota: Para o n.º de catálogo TH002B2, ignore todas as referências aos primers MTHFR e análise.

Utilização prevista

Para a detecção qualitativa *in vitro* simultânea de mutações do factor V de Leiden (R506Q), da protrombina (factor II 20210A) e da metilenoetraidrofolato redutase (MTHFR C677T) em DNA extraído a partir de amostras de sangue total (conservado em EDTA) ou de gota seca.

Resumo e explicação

Estima-se que a trombose venosa seja responsável por 50 000 mortes/ano nos EUA e tenha uma incidência anual de 1 em 1000 (1). São muitos os factores de risco descritos que contribuem para a trombose, tal como cirurgia, gravidez, contraceptivos orais e imobilização prolongada (síndrome da classe económica) (2).

Um elemento genético também influencia o equilíbrio delicado do processo de coagulação do sangue. A via bioquímica da coagulação é complexa e contém muitos factores que optimizam ou inibem o processo, tendo como resultado a coagulação deficitária (hemofilia) ou excessiva (trombofilia). Destes factores, 3 foram identificados como factores-chave que contribuem para a maioria dos casos de trombofilia hereditária (3)(4)(5). As mutações nos genes destes factores são indicadores úteis do risco aumentado de trombose venosa. São o factor V de Leiden (R506Q), o factor II (protrombina 20210A) e a MTHFR (677C>T). A MTHFR (metilenoetraidrofolato redutase) é essencial para manter os níveis de homocisteína, que influencia o processo de coagulação do sangue.

O factor V de Leiden é a forma de trombofilia hereditária mais comum. A heterozigotidade do factor V de Leiden ocorre em 3 a 8% das populações gerais dos EUA e Europa (6). A frequência da homozigotidade da mutação do factor V de Leiden é de aproximadamente 1 em 5000, ainda que a prevalência seja consideravelmente variável em diferentes populações. O risco de tromboembolismo venoso depende de factores genéticos e factores "adquiridos". A idade é um factor importante, progredindo o risco aumentado a uma velocidade superior em indivíduos com mutação no factor V de Leiden. Um indivíduo heterozigótico para a mutação do factor V de Leiden tem uma probabilidade 7 vezes maior de desenvolver um tromboembolismo venoso e um indivíduo homozigótico para o factor V de Leiden tem um risco 80 (oitenta) vezes maior (7). Outros factores de risco genéticos (protrombina 20210A e MTHFR 677C) também contribuem para o aumento do risco, por exemplo, um heterozigótico para o factor V de Leiden tem um risco aumentado de 20 vezes se também for heterozigótico para o factor 20210A (8). Em mulheres que tomam contraceptivos orais, o risco de trombose venosa aumenta até 30 vezes caso a mulher seja heterozigótica para o factor V de Leiden, ou várias centenas de vezes se for homozigótica para o factor V (9).

O teste é geralmente direccionado para doentes com menos de 50 anos com trombose venosa e doentes ou familiares com uma história de doença trombolítica. O teste seria ainda necessário em familiares de pessoas que se sabe terem mutação do factor V de Leiden e em mulheres com perda de fetos recorrente ou pré-eclampsia grave ou nados-mortos. O conhecimento do estado do factor V de Leiden pode influenciar a forma como se lida com uma gravidez ou o processo de tomada de decisão em relação a contraceptivos

orais (10). Logo que a mutação do factor V de Leiden seja identificada, é muito útil testar também os outros factores de risco de trombose, como a protrombina (factor II) e a MTHFR. Os benefícios da identificação de mutações do factor V de Leiden em doentes com trombose venosa é que os familiares assintomáticos poderão optar por determinar se também apresentam um risco aumentado e, assim, ajudar a orientar o seu tratamento antitrombótico em períodos de maior risco, como em cirurgia, gravidez, contraceptivos orais ou longos períodos de imobilização, por exemplo, viagens de longo curso (11).

Princípios do procedimento

O método empregue no teste Elucigene TRP baseia-se no sistema de amplificação refractária de mutações (Amplification Refractory Mutation System – ARMS), uma tecnologia de amplificação de PCR específica de alelos com capacidade para detectar mutações pontuais ou pequenas deleções no ácido desoxirribonucleico (DNA)(12). O teste compreende duas misturas de reacção complementares. A primeira mistura de reacção amplifica especificamente todos os alelos TRP não afectados por mutações do factor V de Leiden (R506Q), factor II (protrombina 20210A) e MTHFR (677C>T), ou seja, tipo selvagem. Em contraste, a segunda mistura de reacção contém primers que amplificam especificamente apenas os alelos mutantes R506Q, 20210A e 677C>T. Cada mistura de reacção inclui ainda primers que amplificam as sequências de DNA sem mutação do factor V de Leiden, protrombina e MTHFR como um controlo interno de amplificação do ensaio para indicar uma amplificação bem sucedida. Os produtos amplificados (amplicons) das duas reacções são separados por electroforese num gel de agarose, em que a presença ou a ausência de bandas no gel indicam o estado dos alelos do factor V de Leiden (R506Q), do factor II (protrombina 20210A) e da MTHFR (677C>T).

Advertências e precauções

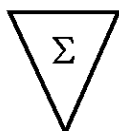
1. Para diagnóstico in vitro.
2. O controlo de DNA fornecido com este kit é de origem humana e foi analisado independentemente com um ensaio de PCR, tendo-se verificado que é negativo para o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV1).
3. Há que ter cautela quando se manuseia material de origem humana. Todas as amostras devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Nenhum método de teste pode garantir totalmente a ausência de HBV, HCV, HIV 1 ou de outros agentes infecciosos. O manuseamento das amostras e dos componentes dos testes, a sua utilização, o seu armazenamento e a sua eliminação devem estar de acordo com os procedimentos definidos pelas orientações ou regulamentos nacionais de segurança biológica.
4. Armazene todos os componentes a uma temperatura inferior a -20 °C. Elimine 3 meses após a abertura, excepto se dividido em subalíquotas.
5. De acordo com as boas práticas de laboratório actuais e para que se possa avaliar a validade do procedimento, os laboratórios devem processar em cada ensaio as suas próprias amostras de controlo de qualidade (QC) interno de genótipo conhecido.

Símbolos utilizados nos rótulos

Os símbolos utilizados em todos os rótulos e embalagens estão em conformidade com a norma EN 980 harmonizada



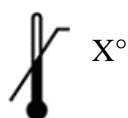
Fabricante



Número de análises



Consulte as instruções de utilização



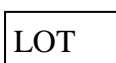
Armazene abaixo da temperatura indicada



Utilize até à data indicada



Código de catálogo



Número de lote

Materiais fornecidos

Os reagentes devem ser armazenados em áreas isentas de DNA ou produtos de PCR contaminantes.

Todos os reagentes são fornecidos prontos a utilizar. Armazene os reagentes abertos e por abrir a -20 °C. Os reagentes abertos podem ser armazenados durante até 3 meses.

São fornecidos materiais suficientes para 50 análises:

1. 2 frascos x 450 µl de mistura A de primers (TA) com primers específicos para a amplificação de alelos não afectados por mutações do factor V, factor II ou MTHFR, primers de controlo e desoxinucleótidos trifosfatos em tampão (TH003TA, TH002TA (sem MTHFR)).
2. 2 frascos x 450 µl de mistura B de primers (TB) com primers específicos para a amplificação de alelos afectados por mutações do factor V, factor II ou MTHFR, primers de controlo e desoxinucleótidos trifosfatos em tampão (TH003TB, TH002TB (sem MTHFR)).
3. 1 frasco x 600 µl de corante de carga (LD). (CR000TR)
4. 1 frasco x 200 µl de tampão de diluição (DB). (CR000TV)
5. 1 frasco x 50 µl de controlo de DNA (DC), normal para mutações do factor V de Leiden R506Q, da protrombina 20210A e homozigótico para a variante do alelo MTHFR 677C. (CR002TX)

Materiais necessários mas não fornecidos

Consumíveis de laboratório — luvas, tubos de microcentrifugação com tampa de rosca, pontas de pipeta, frascos de PCR de parede fina de 0,2 ml ou 0,5 ml (a utilização de dois frascos de cor diferente ajudará a identificar a mistura de primers).

Preparação do DNA — água desionizada estéril de boa qualidade, cloreto de sódio (NaCl), sal dissódico do ácido etilenodiaminetetracético (EDTA), pellets de hidróxido de sódio (NaOH), 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (base Tris) cristalizado, ácido clorídrico (HCl) a 36% sp.gr.1.18 e cloreto de amónio (NH₄Cl).

Amplificação por PCR — óleo mineral branco leve Sigma*, água destilada estéril de boa qualidade, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

Electroforese — materiais de electroforese em gel, incluindo agarose NuSieve® 3:1 (Lonza), marcador de 50 pares de base (GE Healthcare) e brometo de etídio.

* Para a amplificação executada em frascos de PCR de 0,5 ml ou termocicladores sem tampas aquecidas

Equipamento Necessário

Equipamento de laboratório — pipetas de precisão (2 conjuntos: 1 para utilizar antes da amplificação e 1 para depois da amplificação: de preferência, pipetas com deslocação positiva), protecção ocular, vestuário de protecção, agitador vórtex, microcentrifugadora e suportes de tubos.

Preparação do DNA — bloco de aquecimento (aquecimento a 100 °C).

Amplificação — termociclador onde caibam frascos de 0,5 ml ou 0,2 ml (com exactidão da temperatura de +/-1 °C entre 33 °C e 100 °C e uniformidade da temperatura estática de +/-1 °C), tampa aquecida opcional.

Electroforese — reservatório de gel submarino horizontal, unidade de alimentação, microondas, banho de água para arrefecer a agarose; transiluminador de UV, sistema fotográfico.

Colheita e armazenamento de amostras

Devem ser usadas amostras de sangue total (EDTA) ou gota seca.

Há relatos de alguns casos em que dispositivos de colheita de amostras afectaram a integridade de determinados analitos e poderiam interferir com as tecnologias de alguns métodos(9). Recomenda-se que cada utilizador zelee para que o dispositivo escolhido seja utilizado de acordo com as instruções do fabricante e que os dispositivos de colheita de amostras e métodos de preparação de DNA alternativos sejam compatíveis com este teste.

As amostras de sangue devem ser armazenadas a -20 °C antes da preparação do DNA. Evite congelar e descongelar repetidas vezes.

Preparação de DNA a partir de amostras de sangue total (EDTA)

1. Pipete 80 µl de cada amostra de sangue para um tubo de microcentrifugação com tampa de rosca.
2. Pipete 320 µl de solução de NH₄Cl 170 mM (9,09 g/l) para dentro de cada tubo.
3. Misture durante 20 minutos por rotação e inversão suaves. Evite a agitação vigorosa e a formação de espuma.
4. Centrifugue cada tubo durante 2 minutos a 12 000 g, até que se forme um pellet (concentrado) de células.
5. Remova o líquido sobrenadante com uma pipeta e elimine-o.
6. Pipete 300 µl de NaCl 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 10 mM (3,72 g/l) para cada tubo e ressuspenda as células misturando os tubos no vórtex.
7. Centrifugue cada tubo durante 1 minuto a 12 000 g, até que se forme um pellet de células.
8. Repita os passos 5 a 7 pelo menos mais duas vezes até que toda a coloração visível no líquido sobrenadante tenha sido removida.
9. Remova o líquido sobrenadante com uma pipeta e elimine-o.
10. Pipete 200 µl de solução de NaOH 50 mM (2 g/l) para cada tubo e ressuspenda as células misturando os tubos no vórtex.
11. Incube num bloco aquecido a 100 °C durante 10 minutos.
12. Pipete 40 µl de base Tris 1 M (121,1 g/l)/HCl (pH 7,5) para dentro de cada tubo e misture no vórtex.
13. Adicione 1 ml de água desionizada estéril a cada tubo de microcentrifugação para perfazer um volume total de amostra de DNA de 1,24 ml.
14. Centrifugue cada tubo durante 1 minuto a 12 000 g, até que se forme um pellet de detritos celulares. O DNA fica no líquido sobrenadante.

Preparação de DNA a partir de gotas de sangue seco

1. Perfure 2 discos de 3 mm^(b) do cartão de amostra para um tubo de 1,5 ml com tampa de rosca.

A perfuração deve ser feita numa área do cartão que esteja totalmente saturada com sangue.

Perfure e elimine várias áreas do cartão "limpas" antes de cada amostra, para evitar o transporte de amostras.

2. Adicione 1 ml de NaCl 10 mM (0,58 g/l)/EDTA 10 mM (3,72 g/l) e misture num misturador rotativo durante 15 a 20 minutos. Se não tiver um misturador rotativo disponível, então as lavagens podem prolongar-se até 30 minutos cada.
3. Retire e elimine a solução de lavagem.
4. Repita os passos 2 e 3 uma vez mais.
5. Neste ponto, deve ter ocorrido a eluição do pigmento heme a partir do disco. Nesta fase, não é rara uma coloração castanho-avermelhada das gotas de sangue secas.
6. Centrifugue na microcentrifugadora por breves instantes (3 segundos) para recolher a solução de lavagem no fundo do tubo. Remova a quantidade máxima de solução de lavagem possível com uma pipeta, e elimine, sem perturbar as gotas de sangue secas.
7. Este breve passo de microcentrifugação remove tipicamente os pigmentos heme adicionais das gotas de sangue secas.
8. Adicione 150 µl de NaOH 50 mM (2 g/l) a cada tubo. Faça um movimento rápido com o dedo para misturar.
9. Ferva num bloco quente durante 10 minutos. O bloco quente deve ter a temperatura estabilizada nos 100 °C.
10. Centrifugue na microcentrifugadora por breves instantes para recolher o sobrenadante no fundo do tubo.
11. Adicione 30 µl de base Tris 1 M (121,1 g/l)/HCl (pH 7,5) a cada tubo, para neutralizar, e misture cuidadosamente.
12. Adicione 420 µl de água Sigma estéril a cada amostra de DNA para dar um volume total de 600 µl.
13. Misture bem as amostras e centrifugue na microcentrifugadora para recolha.
14. Transfira o sobrenadante para um novo tubo com tampa de rosca identificado.

Conserve o DNA extraído a -20 °C.

^(b) A área total da amostra de sangue utilizada deve ser pelo menos equivalente a gotas de sangue seco circulares de 2 x 3 mm. Por exemplo, podem usar-se gotas de sangue seco em cartão de 1 x 6 mm, caso seja conveniente.

O QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) também foi utilizado para preparação de DNA a partir de sangue total líquido, tendo sido obtidos resultados reprodutíveis e interpretáveis.

Os métodos de preparação de DNA supramencionados são recomendados pela Gen-Probe Life Sciences e foi demonstrado que produziram resultados consistentes e fiáveis. O DNA preparado com outros métodos ou a partir de outros tipos de amostra poderá não ser o ideal para o teste Elucigene TRP e poderá produzir resultados abaixo dos ideais. Os critérios chave para métodos alternativos de preparação do DNA são a concentração de DNA e a ausência de inibidores da PCR.

Recomenda-se que métodos e tipos de amostra alternativos sejam cuidadosamente avaliados com o teste Elucigene TRP antes de os resultados serem utilizados para fins de diagnóstico. Não se recomenda o teste de amostras de DNA com concentrações < 10 ng/5 µl. Em condições de PCR ideais, os resultados são obtidos de forma consistente em concentrações de DNA entre 10 e 100 ng/5 µl.

Nota: Devido á variação na qualidade e produção de DNA, por vezes pode ser necessário diluir a solução de DNA final mais 5 vezes, para assegurar uma amplificação eficiente.

Protocolo de teste

Procedimento de amplificação

Os números indicados nas tabelas 1 e 2 podem ser aumentados proporcionalmente para números de testes além dos especificados. Contudo, devido aos pequenos volumes envolvidos, a Gen-Probe Life Sciences recomenda que não sejam preparados mais de 5 testes de cada vez.

1. Programe o termociclador para um ficheiro de tempo de atraso para activar o AmpliTaq Gold a 94 °C, durante 20 minutos, ligado a um programa de ciclos de amplificação de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 2 minutos a 58 °C (hibridação) e 1 minuto a 72 °C (extensão) para 35 ciclos. Este deve estar ligado a um ficheiro de tempo de atraso de 20 minutos a 72 °C (extensão) no ciclo final.

Nota: Seleccione a opção do método "Block" no termociclador para PCR em frascos de 0,5 ml.

2. Descongele e centrifugue os frascos da mistura de primers A (TA), da mistura de primers B (TB), do AmpliTaq Gold (não fornecido), do corante de carga (LD) e do tampão de diluição (DB) durante 10 segundos a 12 000 g, misture suavemente no misturador vórtex e centrifugue novamente os frascos durante 10 segundos.

Nota: Os passos 3 a 6 têm de ser realizados numa área sem DNA

3. Tendo a tabela 1 como referência, prepare uma diluição suficiente do AmpliTaq Gold no tampão de diluição e no corante de carga fornecidos e em água destilada estéril para o número de amostras e controlos a serem testados. **Misture bem por pipetagem suave para cima e para baixo.**

Tabela 1. Diluição de AmpliTaq Gold

| | Número de testes necessário | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| | 5 | 10 | 20 | 50 |
| Volume de água destilada estéril (µl) | 21 | 42 | 84 | 210 |
| Volume de corante de carga (µl) | 30 | 60 | 120 | 300 |
| Volume de tampão de diluição (µl) | 6 | 12 | 24 | 60 |
| Volume de AmpliTaq Gold (µl) | 3 | 6 | 12 | 30 |
| Volume total (µl) | 60 | 120 | 240 | 600 |

4. Consultando a tabela 2, prepare as misturas de reacção A e B. Retire a alíquota adequada de mistura de primers A para um tubo de microcentrifugadora identificado. Repita para a mistura de primers B para um segundo tubo de microcentrifugadora identificado. Utilizando pontas de pipeta separadas, adicione o volume adequado da diluição de AmpliTaq Gold (a partir do passo 3) a cada tubo de microcentrifugadora. Misture suavemente no misturador vórtex e centrifugue os frascos durante 10 segundos a 12 000 g.

Tabela 2. Preparação das misturas de reacção A e B

| | Número de testes necessário | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | |
| | A | B | A | B | A | B | A | B |
| Volume de mistura de primers A (µl) | 82,5 | | 165 | | 330 | | 825 | |
| Volume de mistura de primers B (µl) | | 82,5 | | 165 | | 330 | | 825 |
| Volume de enzima diluída (µl) | 27,5 | 27,5 | 55 | 55 | 110 | 110 | 275 | 275 |
| Volume total (µl) | 110 | 110 | 220 | 220 | 440 | 440 | 1100 | 1100 |

- Identifique um frasco "A" e um frasco "B" para cada amostra ou, caso estejam disponíveis frascos coloridos, utilize uma cor diferente para cada mistura de primers.
- Pipete 20 µl da mistura de reacção A preparada para o fundo de cada um dos frascos (em número adequado) de PCR identificados com "A". Repita com a mistura de reacção B para cada um dos frascos (em número adequado) de PCR identificados com "B".
- Utilizando pontas de pipeta diferentes para cada acção, adicione 5 µl de amostra de DNA de teste a cada par de frascos A e B. Adicione uma gota de óleo mineral branco leve Sigma, para cobrir a fase aquosa*. Volte a tapar com firmeza.
- Para o controlo negativo, não adicione DNA a um par de frascos A e B. Adicione 1 gota de óleo mineral branco leve Sigma, para cobrir a fase aquosa*. Volte a tapar com firmeza.
- Centrifugue os frascos A e B durante 10 segundos a 12 000 g.
- Coloque todos os frascos com firmeza no bloco do termociclador. Inicie o ficheiro de tempo de atraso de 94 °C, seguido do programa de ciclos de amplificação.
- Elimine a totalidade da diluição de AmpliTaq Gold e misturas de reacção A e B preparadas e não usadas.
- Concluído o programa de ciclos de amplificação, as amostras podem ser armazenadas durante a noite à temperatura ambiente ou a 2-8 °C, durante 7 dias, até à análise por electroforese em gel.

* Para a amplificação executada em frascos de PCR de 0,5 ml ou termocicladores sem tampas aquecidas.

Electroforese em gel

Recomenda-se que cada utilizador zele para que o equipamento escolhido seja utilizado de acordo com as instruções do fabricante e que seja compatível com este teste. Neste contexto, os parâmetros chave são as dimensões da matriz de gel e do pente (formador de poços). Os resultados foram obtidos com as seguintes condições de electroforese:

- O produto de PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose 3:1 com NuSieve® a 3% usando tris-borato com brometo de etídio (TBE/EtBr) como tampão de análise. O TBE/EtBr foi preparado como base Tris 134 mM (16,2 g/l), ácido bórico 74,9 mM (4,63 g/l), tampão com EDTA 2,55 mM (0,95 g/l) com brometo de etídio 0,1 µg/ml.
- Foram dissolvidos 3 g de NuSieve® 3:1 em 100 ml de TBE/EtBr e vertidos para um tabuleiro de gel horizontal de 15 x 12 cm com formadores de poços de 1,5 mm x 5 mm suspensos 1 mm acima da base.
- 15 µl do produto de PCR de cada um dos frascos de PCR deve ser carregado em posições de poços adjacentes no gel de agarose preparado.

- Um marcador de 50 pares de bases (GE Healthcare) foi analisado adjacente às amostras como um marcador de peso molecular.
- A electroforese foi realizada a 5 a 6 V/cm entre eléctrodos até a frente de corante ter migrado 4 cm desde os poços de carga até ao ânodo (1 a 1,5 horas).
- Após a electroforese, os géis foram colocados num transiluminador UV a 260 nm e depois visualizados e fotografados.

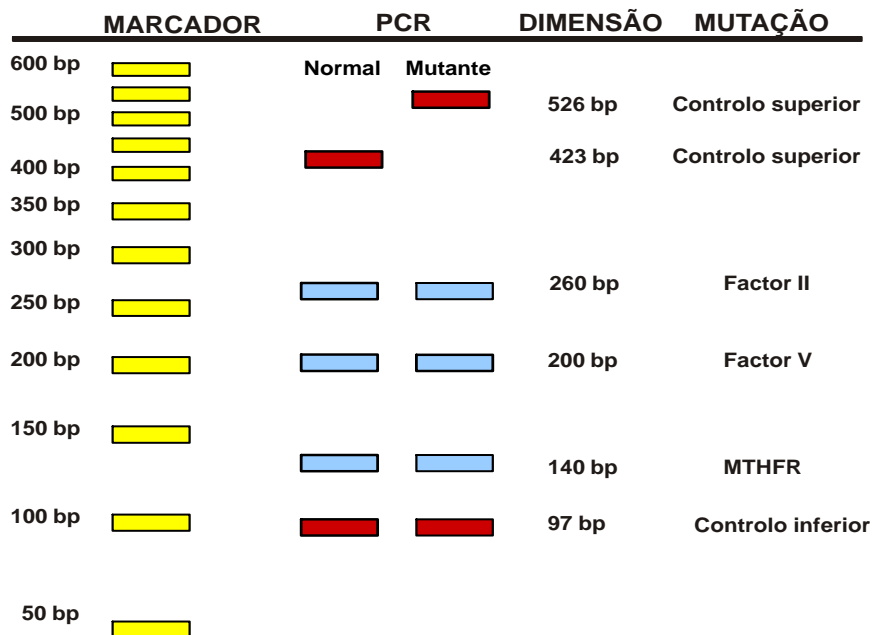
Interpretação dos resultados

- O controlo negativo não deve apresentar bandas na área definida pelas bandas de controlo superior e inferior (ver figura 1).
- As bandas de controlo superior e inferior devem ser bem nítidas em todas as amostras (ver figura 1).
- A posição das bandas de controlo superior e inferior deve indicar o tamanho molecular correcto (ver figura 1).

Se algum dos pontos acima descritos não for observado, os resultados não devem ser interpretados e o teste deve ser repetido.

A figura 1 mostra um diagrama do tamanho, em pares de bases, e da localização relativa dos produtos de PCR esperado para um genótipo de trombose heterozigótico (portador de mutações do factor V, factor II ou MTHFR) com o reagente de teste do risco de trombose.

Figura 1



Nota: Alelos MTHFR não detectados pelo teste Elucigene TRP, n.º de catálogo TH002B2

Características de desempenho

Foram testadas trinta amostras, cuja genotipagem foi previamente feita por análise por digestão enzimática com restrição, com o kit Elucigene TRP (TH003B2) num estudo interno seguindo o protocolo do kit recomendado. Foram amplificadas com êxito vinte e nove amostras de DNA utilizando o kit Elucigene TRP. Não foi possível amplificar uma amostra de DNA, tendo, no entanto, sido obtido um resultado aceitável no teste de repetição. Vinte e seis das amostras testadas foram positivas para mutações detectadas pelo kit Elucigene TRP; não foram detectadas mutações em quatro amostras. Das 30 amostras testadas, 7 foram positivas para a mutação do factor V (R506Q), 10 foram positivas para a mutação do factor II (protrombina 20210A) e 16 foram positivas para a mutação MTHFR (677C>T). Todos os resultados determinados pelo kit Elucigene TRP foram confirmados com resultados de genotipagem originais.

Trinta amostras de sangue total e amostras de gota seca correspondentes foram colhidas em trinta indivíduos com o kit Elucigene TRP (TH003B2) num estudo interno seguindo o protocolo do kit recomendado. Dezoito das amostras correspondentes tiveram um resultado positivo para mutações detectadas pelo kit Elucigene TRP. O resultado obtido com cada amostra de sangue total foi concordante com o resultado obtido com cada amostra de gota de sangue seca do mesmo indivíduo.

Limitações do procedimento

1. Os resultados deste e de outros ensaios de diagnóstico devem ser interpretados em conjunto com dados laboratoriais e clínicos que o médico tenha disponíveis.
2. A ausência das mutações detectadas com este kit não garante que não possam existir outras mutações nos genes do factor V de Leiden, factor II e MTHFR. É possível a existência de outras mutações não detectadas por este kit.
3. Tal como com qualquer outro teste genético, é possível obter resultados erróneos a partir de amostras de sangue que tenham sido recolhidas após uma transfusão sanguínea recente.

O utilizador destes testes deve salientar estes aspectos quando apresenta os resultados ao médico assistente/responsável pelo aconselhamento genético.

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, Blomback 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).