



Duplica^{RealTime} Mix & Match Factor V G1691A Kit

REV. EER038032_IFU_REV.04D_ENITA

REF. EER038032 - 32 tests

Instructions For Use

INTENDED USE/PURPOSE

Duplica^{RealTime} Mix & Match FACTOR V G1691A Kit is a qualitative in vitro nucleic acid amplification test for the detection of the nucleotide substitution G1691A (allelic variant g.169549811C>T) of the blood coagulation Factor V gene in genomic DNA extracted from peripheral whole blood samples collected in EDTA. The device is intended to be used for the detection of a specific allele associated with predisposition to the disease in individuals with suspected risk of Thrombophilia. This kit is for in vitro diagnostics (IVD), for professional use only and not for in vivo use.

INTRODUCTION

The resistance to Activated Protein C (APC), characterized by a poor response to anticoagulant activity of APC, a key enzyme in the downregulation of blood coagulation that causes a disposition for hypercoagulable state, increases the risk of thrombotic events. A number of clinical studies show a prevalence of APC resistance of 20-60% among patients with venous thromboembolism (VTE). The actual thrombotic risk is moderate with an odds ratio of 5-7 but its high prevalence makes it by far the most important risk factor known today, even higher than the sum of contributions from inherited deficiencies of Antithrombin, protein C and protein S. At least 90% of the cases with resistance to APC are explained by a nucleotide substitution in the gene for the coagulation Factor V (Guanine to Adenine, G1691A) causing the substitution of an Arginine to Glutamine at position 506 (FV Q506, often denoted as Factor V Leiden mutation), originating one of the three APC cleavage sites in activated Factor V. The mutation is inherited as an autosomal dominant trait and has a prevalence of 2% to 10% in the general Caucasian population. Heterozygous carriers for Factor V Leiden have a 5 to 8 times increased risk of thrombosis and a 30 to 40 times for homozygous carriers. Recently it has been shown a 1.3-fold increased risk only for a coronary disease. Heterozygous carriers who take oral contraceptives are at a 15-fold increased risk of VTE, while carriers also heterozygous with Factor V Leiden have an approximate 20-fold higher risk and it seems to be higher when the coagulation Factor II G20210A transition is associated with the Factor V Leiden mutation.

PRINCIPLE OF THE TEST

Duplica^{RealTime} Mix & Match FACTOR V G1691A Kit is a qualitative test designed to identify the G1691A substitution of the blood coagulation Factor V gene. Two reaction mixes are provided for the amplification:

- **AMPLIFICATION MIX**, containing Hot Start Taq DNA polymerase, nucleotides, MgCl₂ and buffer.
- **OLIGO MIX**, containing primers and fluorogenic probes.

Duplica^{RealTime} Mix & Match FACTOR V G1691A Kit is based on specific recognition and amplification of target sequences by PCR, and the simultaneous detection of the accumulation of PCR amplification products by fluorescent DNA probes. In particular, the probe designed to detect the Wild Type allele carries the fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) at the 5' end, while the probe detecting the Mutated allele, is labelled with the fluorophore HEX (hexachloro-fluorescein). Both probes have a non-fluorescent black quencher at the 3' end. If excited, the whole probe does not emit fluorescence, since the proximity of the quencher to the reporter prevents the emission of the fluorescence from the reporter (quenching effect).

Clonit **Duplica^{RealTime} Mix & Match kits** of the CardioVascular Diseases panel – *CVD Panel* (EER037032, EER038032, EER039032 and EER040032) share a common thermal profile.

REAGENTS PROVIDED

Each kit contains enough reagents to perform 32 tests when used in 4 analytical sessions with 5 **samples**, 1 **Wild Type control (Control 1, C1)**, 1 **Mutated control (Control 2, C2)** and one **Reaction Blank (BM)** each. **Kit Components**

Reagent	Color Code	Storage (range, °C)	Volume (µl)	Quantity (tubes)
Oligo Mix (OM)*	Green Cap	-22÷-18	400	1
Amplification Mix (AM)	Blue Cap	-22÷-18	400	1
Control 1 (C1, Wild Type)	Red Cap	-22÷-18	>50	1
Control 2 (C2, Mutated)	Yellow Cap	-22÷-18	>50	1
Reaction Blank (BM)	Neutral Cap	-22÷-18	>50	1

*protect the tube from direct light

STORAGE AND HANDLING

All reagents must be stored at **-22÷-18°C** and can be used until the expiry date printed on the labels. Do not freeze and thaw the products more than six times.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Extraction kit for DNA purification (refer to the specific handbook's section)
- Optical tubes or microplate for Real Time PCR
- Disposable powder-free gloves and laboratory coat
- Variable volumes pipettes (5-20 µl, 20-200 µl and 100-1000 µl)
- Disposable RNase/DNase-free tips with aerosol barriers
- Tube racks
- Desktop centrifuge
- PCR box
- Refrigerator
- Deep-freezer
- Thermal cycler for Real Time PCR

The kit has been optimized to be used on DX®/CFX (Bio-Rad), Rotor-Gene® Q (Qiagen) and Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies™) thermal cyclers. Other makes and models should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

The equipment should be regularly maintained, in accordance with the manufacturer's instructions, and calibrated to ensure an optimal performance.

PRECAUTIONS FOR USE

- This kit is for in vitro diagnostics (IVD), for professional use only and not for in vivo use.
- Carefully read this Instruction For Use before using the kit.
- If required, Clonit offers the necessary technical support for the correct use of the kit.
- In compliance with Good Laboratory Practice, define three separate laboratory's areas for: DNA extraction, PCR reaction mix preparation; manipulation of controls provided with the kit. Each area must have dedicated pipettes and laminar flow hood.
- Periodically wipe the working area with 0,5% hypochlorite.
- Wear protective clothing such as laboratory coats and disposable gloves while assaying samples.
- Use powder-free gloves. Do not leave fingerprints on optical caps. Do not write on caps as this may cause an interference with fluorescent detection.
- Avoid any contact between hands and eyes or nose during specimen collection and testing.
- Materials containing or potentially containing infectious agents must always be manipulated in a separated microbiological safety room under a Biohazard biological hood. Waste should be discarded according to local law.
- Never pipette solutions by mouth.
- Use calibrated and regularly checked pipettes and instrumentation only.
- Avoid the air bubbles during the master mix dispensing. Eliminate them before starting amplification.
- Wash hands carefully after handling samples and reagents.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
- Provided reagents are not infectious and hazardous for the health (see Material Safety data Sheet – MSDS).

LIMITS OF THE METHOD

The extreme sensitivity of gene amplification may cause wrong genotyping due to cross-contamination between samples and/or controls. Therefore, you should:

- physically separate all the products and reagents used for amplification reactions from those used for other reactions, as well as from post-amplification products;
- use tips with filters to prevent cross-contamination between samples;
- use disposable gloves and change them frequently;
- carefully open test tubes to prevent aerosol formation;
- close every test tube before opening another one.

As with any diagnostic device, the results obtained with this product must be interpreted taking into consideration all the clinical data and other laboratory tests available for the patient.

As with any diagnostic device, with this product there is a residual risk of obtaining invalid or wrong results. Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis.

WARNINGS

- Use only samples in EDTA anti-coagulant solution. Other anti-coagulants may interfere with the amplification reaction.
- Do not mix reagents from different lots.
- Thaw and carefully mix the reagents of the kit before use.
- The PCR mix has to be freshly prepared every time.
- Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
- Do not use the product when stored at temperatures other than those indicated on the labels or described in this Instructions For Use.

- In case of spillage of the kit contents, please refer to the specific Material Safety Data Sheet (MSDS, available on request).
- In case of damaged package, contact the technical support before using the kit.
- In case of any serious incident that has occurred in relation to the device, a notice shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

OPERATING PROCEDURE

a) DNA purification

Collected material must be shipped and stored at +2 - +8°C. Samples must be stored at -20°C if not used within 3 days for a maximum of thirty days. Extracted DNA can be stored at -20°C for up to six months.

For genomic DNA purification Clonit recommends to use:

- Duplica Blood DNA kit (ref. EDI002250) and Duplica NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) with Duplica® PREP Automatic Extractor (ref. EDI001) for automated purification.
- CloNext Blood DNA Extraction kit (ref. OP02001-48) with CloNext 12 Automated Nucleic Acid Purification System (ref. OP01018) or CloNext 24 Automated Nucleic Acid Purification System (ref. OP01019) for automated purification.

For manual extraction/purification:

- Fasst DNA Releaser (ref. EMR057050) for **fresh** peripheral blood (i.e. stored for up to 24 hours at 2÷8°C).
- Spin DNA Purification Kit (ref. EMR061050) for **frozen** blood or stored at 2÷8°C for more than 24 hours.

Other extraction reagents and methods should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

Attention! Use blood samples in EDTA anti-coagulant solution.

b) Thermal cycler Setup

Refer to the specific handbook of the equipment used to set the thermal profile indicated in the **Thermal Profile Table**. We recommend to switch on the instrument and to set the thermal profile before preparing the reaction mix.

DX®/CFX platform

- Select *Create a new Experiment*
- In the *Protocol* section select *Create New* to set the thermal profile
- In *Plate Editor*: set FAM (Wild Type genotype, Allele 1) and HEX (Mutated genotype, Allele 2) as *Fluorophores* and define the sample name

Applied Biosystems® 7500 platform

- Select *Create a new Experiment*
- In the *Experiment Properties* select *Quantitation-Standard curve* as experiment type and *Taqman® Reagents* as reagent type
- Select the Run Mode (*7500* or *7500 Fast*) and the Ramp Speed (*Standard*)
- In the *Setup* menu select *Run Method* to set the thermal profile
- In the *Setup* menu select *Plate Setup-Define Targets and Samples* to select Samples and assign VIC target to MUT (Mutated genotype) and FAM target to WT (Wild-Type genotype). Leave the default value (*NFQ-MGB*) as quencher type
- In *Define Samples* insert the sample name
- Select the used wells in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*
- Select *None* as passive reference

Rotor-Gene® Q platform

- Start the software and on the box *New Run* select *Advanced*
- Select a *new template* in *Empty Run* or a pre-existing one
- Select the Rotor Type of your instrument and then *Next*
- Type 25 µl in the reaction volume and then *Next*
- Select *Edit Profile* and set up the correct Thermal Profile as indicated in the Table below
- Select *Gain Optimisation* and then flag the option *Perform Optimisation before 1st acquisition*
- On *Channel Settings* select the green/yellow fluorophores and tube position "1" to perform the optimization. Then close the window and select *Next* and *Start Run*

Thermal Profile Table (common for all the supported platforms)

Time	Temperature	Cycles
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	35
30 sec	60°C	Fluorescence Acquisition

c) Preparation of PCR mix

The total reaction volume is **25 µl**.

For each experiment prepare a PCR mix for the **2 controls (C1 and C2)**, 1 **Reaction Blank (BM)** and **n+1** samples. The reagents of the PCR mix have to be mixed as indicated in the table below:

REAGENT	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	10
Extracted DNA	5

The PCR mix has to be freshly prepared every time.

After its preparation, aliquot **20 µl of Master Mix** in the tubes or in the microplates well for PCR then add in each tube/well **5 µl** (100-250 ng/reaction) from the **extracted DNA** or **control DNA**, place in order the tubes/microplate in the instrument and start the program of amplification. At the end of the program remove the tubes/microplate from the thermal cycler.

d) ANALYSIS and INTERPRETATION of the RESULTS

Real Time PCR curves analysis

Refer to the instrument specific user guide to visualize the amplification plots for the entire plate/rotor. Detailed analysis of raw data depends on the Real Time PCR instrument used. Baseline noise levels should either be set automatically or at predefined cycles.

The fluorescence in each channel indicates the hybridisation of the allelic specific probes: **Channel 1** for **FAM/green= Wild Type allele probe** and **Channel 2** for **HEX/VIC/Yellow= Mutated allele probe**. If a sample shows a fluorescence in **FAM/Green**, the sample has the **Wild Type allele**. If a sample shows a fluorescence in **HEX/VIC/Yellow**, the sample has the **Mutated allele**.

Therefore, if only a **FAM/Green signal** is detected the sample is **Homozygous Wild Type**, whereas if only a **HEX/VIC/Yellow signal** is detected the sample is **Homozygous Mutated**. Finally, if both **FAM/Green** and **HEX/VIC/Yellow** are detected the sample is **Heterozygous**.

Condition in which no signal is detected indicates PCR inhibition. In this case, refer to troubleshooting.

Control 1 (Wild Type), Control 2 (Mutant) and reaction blank (BM) are provided and must be included in each analytical session in order to validate the run. After the run, the threshold line has to be set so that: **Control 1 is detected in FAM/Green and not detected in HEX/VIC/Yellow, whereas Control 2 is detected in HEX/VIC/Yellow and not detected in FAM/Green. The Reaction Blank must not be detected in any channel.**

If these three conditions have been met, the run is valid and it is possible to analyse the data; otherwise the run is not valid. It is responsibility of the user to validate the run.

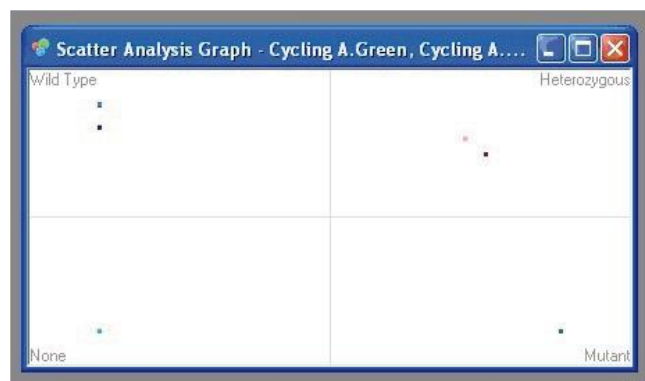
Results Interpretation Table

FAM/Green	HEX/VIC/Yellow	Results
Detected	Not detected	Wild Type
Not detected	Detected	Mutated
Detected	Detected	Heterozygous
Not detected	Not detected	Inhibition

Scatter Plot analysis

Additionally, the **Scatter Plot Analysis** can be used to visualize the results for **Rotor-Gene®Q** and **DX®/CFX** platforms. In this analysis each sample is identified by a spot representing the end-point fluorescence values for the two dyes.

Rotor-Gene® Q platform

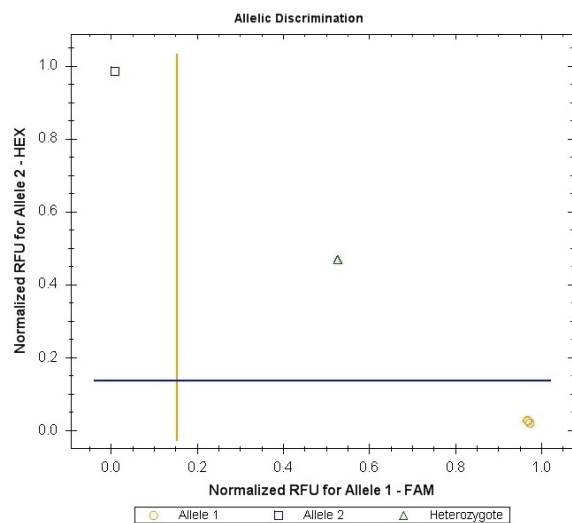


- In the *Analysis* menu select *Other*
- Select *Scatter Graph Analysis*, highlight both *Green* and *Yellow* channels and press *Show* to display the scatter plot. The scatter plot is divided in four areas corresponding to samples classified as Wild Type, Mutant, Heterozygous.

In the *Scatter Analysis graph* window that appears select with the mouse the area corresponding to a specific Genotype and name it as show in the figure below (*Green* → *Wild Type*; *Yellow* → *Mutated*; and *Green/Yellow* → *Heterozygous*):

DX®/CFX platform

- Select *Cr Determination Mode* and *Regression* in the *Settings* menu
- In the *View/Edit Plate* menu set the reaction blank as *NTC*
- Select *Quantitation*. In the *Cr* table in the lower right part of the screen no amplification must be detected (*Cr* value=N/A for both fluorophores) for the **blank/NTC** sample. **Control 1 (C1)** must be detected (*Cr* value≠N/A) in FAM and non detected (*Cr* value=N/A) in HEX, whereas **Control 2 (C2)** detected in HEX and not detected in FAM.



- If these conditions have been met, the run is valid and it is possible to analyse the data; otherwise the run is not valid. It is responsibility of the user to validate the run by checking that these conditions have been met
 - **Unknown (Unk)** samples must be detected in at least one fluorescence channel. Condition in which no signal is detected (*Cr* value=N/A for both fluorophores) indicates PCR inhibition and **samples presenting this condition must be excluded from the following Allelic Discrimination analysis**. For troubleshooting refer to the point 1 and 2 of the Troubleshooting section.
 - In the *Allelic Discrimination* menu select *RFU* and flag the *Normalize Data* in the *Display Mode* to display the relative Scatter Plot
 - For both Fluorophores set manually the Threshold to 0,15
- The Scatter Plot displays three main quadrants in which each spot represents the two fluorescent signals for a single sample/control.

The corresponding genotype of the samples is reported in a table displayed close to the Scatter Plot:

Bottom Right Quadrant	Wild Type Samples (WT- <i>Allele 1</i>)
Upper Left Quadrant	Mutated Samples (MUT- <i>Allele 2</i>)
Upper Right Quadrant	Heterozygote Samples (HET- <i>both Alleles</i>)

ANALYTICAL AND CLINICAL PERFORMANCE

1. ANALYTICAL SPECIFICITY

The Analytical Specificity of the product is ensured by proper design of primers and probes and stringent conditions in which the test is performed. Primers and probes were checked for potential homologies with published sequences on different databases, and never resulted in nonspecific alignments.

2. ANALYTICAL SENSITIVITY

In order to determine if the device is able to detect and identify the specific alleles even in the presence of a low amount of genomic DNA, 84 DNA extracts present in house and previously characterized for FV (51 WT, 25 Heterozygous and 8 Mutant) were quantified, diluted to a final concentration of 5ng/μl and tested on Biorad CFX96. All samples tested were correctly genotyped.

3. DIAGNOSTIC ACCURACY

Automatic Extraction (Duplica Prep)

To assess the accuracy of the test with Duplica Prep Extraction system, a series of 68 EDTA-collected whole-blood samples with known genotype were analyzed, 40 of which wild-type (WT), 22 heterozygous (HET) and 6 mutated samples (MUT). The overall accuracy was 100% with no discordances found between DUPLICa Real Time Mix & Match Factor V G1691A Kit and the reference method.

Automatic Extraction (CloNext 24 Automated Nucleic Acid Purification System)

To assess the accuracy of the test with CloNext Extraction system, a series of 48 EDTA-collected whole-blood samples with known genotype were analyzed, 45 of which wild-type (WT) and 3 heterozygous (HET) samples. The overall accuracy was 100%.

Manual Extraction (Spin DNA Purification Kit, EMR061050)

To assess the accuracy of the test with Spin DNA Purification Kit, a series of 16 EDTA-collected whole-blood samples with known genotype were analyzed, 13 of which wild-type (WT), 2 heterozygous (HET) and 1 mutated (MUT) sample. The overall accuracy was 100%.

Manual Extraction (Fassst DNA Releaser, EMR057050)

To assess the accuracy of the test with Fassst DNA Releaser, a series of 16 EDTA-collected whole-blood samples with known genotype were analyzed, 13 of which wild-type (WT), 2 heterozygous (HET) and 1 mutated (MUT) sample. The overall accuracy was 100%.

4. INTER-ASSAY PRECISION

In order to demonstrate the reproducibility of the test among different analytical sessions, 5 samples (2 WT, 2 HET and 1 MUT samples) plus controls (WT, MUT and Reaction Blank), were tested as single replicates in 4 independent runs on AB7500 instrument. Results show 100% of accuracy between expected genotypes and obtained results. CV% is below 5% in agreement with the acceptance criteria.

5. INTRA-ASSAY PRECISION

In order to demonstrate the reproducibility of the test within the same analytical session, 5 samples (2 WT, 2 HET and 1 MUT samples) plus controls (WT, MUT and Reaction Blank), were tested in 4 replicates in the same run on AB7500 instrument. Results show 100% of accuracy between expected genotypes and obtained results. CV% is below 5% in agreement with the acceptance criteria.

6. REPRODUCIBILITY BETWEEN LOTS AND OPERATORS

Positive WT and Mutant controls were used to simulate real samples, 1 FV Wt, 1 Heterozygous and 1 Mutant. 5 replicates for each simulated sample were tested with three different lots on all the device compatible real time platforms, AB7500, CFX96 and Rotorgene Q. In all runs, positive and negative controls were added. Tests were also repeated with two different operators. Results show 100% of accuracy between expected genotypes and obtained results. CV% is below 5% in agreement with the acceptance criteria.

BIBLIOGRAPHY

- E Thorelli 1, R J Kaufman, B Dahlbäck. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood*. 1999 Apr 15;93(8):2552-8.
- C Aparicio 1, B Dahlbäck. Molecular mechanisms of activated protein C resistance. Properties of factor V isolated from an individual with homozygosity for the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene. *Biochem J*. 1996 Jan 15;313 (Pt 2) (Pt 2):467-72.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88:3698-3703.
- Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1995;33:2912-2917.
- P de Moerloose 1, G Reber, A Perrier, T Perneger, H Bounameaux. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol*. 2000 Jul;110(1):125-9.
- Kathrin Geiger, Andreas Leiherer, Eva-Maria Brandtner, Peter Fraunberger, Heinz Drexel, Axel Muendlein. Direct blood PCR: TaqMan-probe based detection of the venous thromboembolism associated mutations factor V Leiden and prothrombin c.20210G>A without DNA extraction. *Clin Chim Acta*. 2019 Jan;488:221-225.
- USE OF ANTICOAGULANTS IN DIAGNOSTIC LABORATORY INVESTIGATIONS, WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2
- Visvikis S, Schlenck A, Maurice M. DNA extraction and stability for epidemiological studies. *Clin Chem Lab Med*. 1998 Aug;36(8):551-5. doi: 10.1515/CCLM.1998.094. PMID: 9806458.
- Sotoudeh Anvari M, Gharib A, Abolhasani M, Azari-Yam A, Hossieni Gharalari F, Safavi M, Zare Mirzaie A, Vasei M. Pre-analytical Practices in the Molecular Diagnostic Tests, A Concise Review. *Iran J Pathol*. 2021 Winter;16(1):1-19. doi: 10.30699/ijp.2020.124315.2357. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33391375; PMCID: PMC7691716.

TROUBLESHOOTING

Problem 1: Weak or no signal of unknown samples.

1. The PCR was inhibited:
 - Make sure to use a recommended DNA purification method and carefully follow the manufacturer's instructions.
2. Pipetting error due to omitted reagents or samples:
 - Repeat the analysis starting from the PCR.
3. Deterioration of dyes and/or primers. The reagents storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.
4. Very low starting amount and/or low purity of genomic DNA. Improper DNA extraction:
 - Repeat the DNA purification.
5. Wrong channel/filter was chosen. The PCR conditions did not comply with the instructions:
 - Check the PCR conditions and select the fluorescence channels reported in the protocol for the Unknown Sample detection.

Problem 2: Weak or no signal of the Wild Type Control C1 and/or Mutated Control C2.

1. The PCR conditions did not comply with the instructions:
 - Check the amplification protocol and select the fluorescence channel reported in the manual.
2. Deterioration of dyes and/or primers. The reagents storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.

Problem 3: Any signal with Reaction Blank BM.

1. Contamination during PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate the working area and all instruments.
 - Pipette the controls C1 and C2 at last.
 - Repeat the PCR preparation using a new set of reagents.

Problem 4: HEX signal in Wild Type Control C1 and/or FAM signal in Mutated Control C2.

1. Contamination during PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate the working area and all instruments.
 - Use tips with aerosol barriers only. Change tips between tubes/wells.
 - Repeat the PCR preparation using a new set of reagents.

Problem 5: Fluorescence intensity varies.

1. The PCR Master Mix is not well prepared:
 - Carefully repeat the PCR preparation procedure.
2. Air bubbles trapped in the PCR tubes:
 - Check the presence of air bubbles before starting a new run.

Problem 6: Absence of any fluorescent signal.

1. Verify the performance of the thermal cycler:
 - Calibrate the equipment.
2. Deterioration of dyes and/or primers. The storage conditions did not comply with the instructions:
 - Check storage conditions.
 - Check the expiry date of the kit.

Problem 7: The thermal cycler gives an error message.

1. Refer to the Real Time PCR instrument user manual or contact the local technical support of the Real Time PCR instrument company.

Problem 8: The kit reagents left out of the storage range temperature.

1. These reagents must be stored as indicated for a proper execution of the test. The performance of the product is not guaranteed if the reagents have not been properly stored.



Duplica^{RealTime} Mix & Match Factor V G1691A Kit

[REV]: EER038032_IFU_REV.04D_ENITA

[REF]: EER038032 - 32 tests

Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' E SCOPO D'USO

Duplica^{RealTime} Mix & Match FACTOR V G1691A Kit è un test qualitativo di amplificazione di acidi nucleici *in vitro* per la ricerca della sostituzione nucleotidica G1691A (variante allelica g.169549811C>T) nel gene che codifica per il fattore V della cascata coagulativa, in DNA genomico estratto da campioni di sangue intero periferico. Il dispositivo è destinato ad essere utilizzato per la rilevazione di un allele specifico associato alla predisposizione alla malattia in soggetti con sospetto rischio di Trombofilia. Questo kit è per diagnostica in vitro (IVD), ad esclusivo uso professionale e non per utilizzo in vivo.

INTRODUZIONE

La resistenza alla Proteina C Attivata (Activated Protein C, APC), caratterizzata da una scarsa risposta all'attività anticoagulante di APC, un enzima chiave nell'inibire la coagulazione del sangue, causa uno stato di ipercoagulabilità e aumenta il rischio di eventi trombotici. Un certo numero di studi clinici mostra come la resistenza alla APC abbia una prevalenza del 20-60% in pazienti affetti da tromboembolismo venoso (VTE). Il rischio trombotico reale è moderato, con un rapporto di probabilità di 5-7, ma l'alta incidenza lo rende di gran lunga il fattore di rischio più importante ad oggi conosciuto, perché superiore al contributo totale ottenuto da carenze ereditarie di Antitrombina, Proteina C e Proteina S. Almeno il 90% dei casi di resistenza alla APC mostrano una sostituzione nucleotidica nel gene per il Fattore V della coagulazione (da Guanina ad Adenina, G1691A) che comporta la sostituzione di una Arginina al posto di una Glutamina in posizione 506 (FV Q506, indicata anche mutazione di Leiden del Fattore V) e origina uno dei tre siti di cleavage della APC del Fattore V attivo. La mutazione è autosomica dominante ed ha una prevalenza generica del 2-10% nella popolazione caucasica. Portatori eterozigoti per il Fattore V Leiden presentano un aumentato rischio di trombosi di 5-8 volte, mentre sale a 30-40 volte per portatori omozigoti. Recentemente è stato mostrato un aumento di 1,3 volte del rischio di sviluppare malattie coronariche. Nei soggetti eterozigoti che assumono contraccettivi orali il rischio di VTE aumenta di 15 volte, mentre nei soggetti eterozigoti per il Fattore V di Leiden di 20 volte e questo sembra aumentare quando la variante G20210A del Fattore II di coagulazione è associata con la mutazione di Leiden del Fattore V.

PRINCIPIO DEL TEST

Duplica^{RealTime} Mix & Match FACTOR V G1691A Kit è un test qualitativo disegnato per riconoscere la sostituzione aminoacidica G1691A nel gene umano del Fattore V. I reagenti per la reazione di amplificazione sono pronti all'uso e forniti in due mix di reazione:

- **AMPLIFICATION MIX**, contenente Hot Start Taq DNA polimerasi, nucleotidi, MgCl₂ e buffer.
- **OLIGO MIX**, contenente i primers e le sonde fluorogeniche.

Duplica^{RealTime} Mix & Match FACTOR V G1691A Kit è basato sul riconoscimento specifico e amplificazione di sequenze target mediante PCR simultanea rilevazione dei prodotti tramite sonde fluorescenti a DNA. In particolare, la sonda per l'allele Wild Type porta all'estremità 5' il fluoroforo FAM (6-carbossi-fluoresceina) mentre l'altra sonda, che va a rilevare l'allele Mutato, ha legato il fluoroforo HEX (esa-cloro-fluoresceina). Entrambe le sonde hanno all'estremità 3' un quencher non fluorescente. Se eccitata, la sonda integra non emette fluorescenza, in quanto la vicinanza del quencher al reporter impedisce a quest'ultimo l'emissione della fluorescenza (effetto di quenching).

I kit di Clonit **Duplica^{RealTime} Mix & Match** appartenenti al pannello delle malattie cardiovascolari (CardioVascular Diseases, CVD) - pannello CVD (EER037032, EER038032, EER039032 e EER040032), hanno un profilo termico comune.

COMPOSIZIONE DEL KIT

Questo kit è stato realizzato per poter eseguire 32 reazioni se utilizzato in 4 sessioni analitiche con 5 **campioni**, 1 **controllo Wild Type (Controllo 1, C1)**, 1 **Controllo Mutato (Controllo 2, C2)** e 1 **Bianco di Reazione (BM)**.

Componenti del kit

Reagenti	Codice Colore	Conservazione (range, °C)	Volume (µl)	Quantità (tubi)
Oligo Mix (OM)*	Tappo Verde	-22÷-18	400	1
Amplification Mix (AM)	Tappo Blu	-22÷-18	400	1
Controllo 1 (C1, Wild Type)	Tappo Rosso	-22÷-18	>50	1
Controllo 2 (C2, Mutato)	Tappo Giallo	-22÷-18	>50	1
Bianco di Reazione (BM)	Tappo Neutro	-22÷-18	>50	1

*la provetta deve essere conservata lontano dalla luce

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i reagenti devono essere conservati a **-22÷-18°C** fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. Non scongelare e ricongelare il prodotto più di sei volte.

MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO

- Kit di estrazione per la purificazione del DNA (fare riferimento alla sezione specifica del relativo manuale d'uso)
- Tubi ottici o micropiastra ottica per Real Time PCR
- Guanti senza talco e camice da laboratorio monouso
- Micropipette (5 -20 µl, 20-200 µl e 100-1000 µl)
- Puntali con filtro RNasi/Dnasi-free
- Porta provette
- Centrifuga da tavolo
- PCR box
- Refrigeratore
- Congelatore
- Termociclatore per Real Time PCR

Il kit è stato ottimizzato per le piattaforme DX®/CFX (Bio-Rad), Rotor-Gene Q® (Qiagen) e Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies™). Altre marche e modelli devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

La strumentazione deve essere mantenuta regolarmente, in accordo con le istruzioni del produttore, e calibrato in modo da assicurare prestazioni ottimali.

PRECAUZIONI PER L'USO

- Questo kit è per diagnosi in vitro (IVD), solo per uso professionale e non per uso in vivo.
- Leggere attentamente queste istruzioni per l'uso prima di utilizzare il kit.
- Se richiesto, Clonit offre il supporto tecnico necessario per il corretto utilizzo del kit.
- In conformità con le Buone Pratiche di Laboratorio, definire tre aree separate del laboratorio per: estrazione del DNA, preparazione della miscela di reazione PCR; manipolazione dei controlli forniti con il kit. Ogni area deve avere pipette dedicate e cappa a flusso laminare.
- Pulire periodicamente l'area di lavoro con ipoclorito allo 0,5%.
- Indossare indumenti protettivi come camici da laboratorio e guanti monouso durante l'analisi dei campioni.
- Utilizzare guanti senza polvere. Non lasciare impronte sui tappi ottici. Non scrivere sui tappi ottici in quanto ciò potrebbe causare un'interferenza con la rilevazione della fluorescenza.
- Evitare qualsiasi contatto con le mani, gli occhi e il naso durante la raccolta e l'analisi dei campioni.
- I materiali contenenti o potenzialmente contenenti agenti infettivi devono essere sempre manipolati in una stanza di sicurezza microbiologica separata sotto una cappa biologica a rischio biologico. I rifiuti devono essere smaltiti secondo la legge locale.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Utilizzare solo pipette e strumenti calibrati e regolarmente controllati.
- Evitare le bolle d'aria durante la dispensazione della master mix. Eliminarli prima di iniziare l'amplificazione.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area in cui vengono manipolati i campioni e reagenti del kit.
- I reagenti forniti non sono infettivi e pericolosi per la salute (vedere la scheda di sicurezza del materiale – MSDS).

LIMITI DEL METODO

L'estrema sensibilità dell'amplificazione genica può causare una genotipizzazione errata a causa della contaminazione incrociata tra campioni e/o controlli. Pertanto, si raccomanda di:

- separare fisicamente tutti i prodotti e i reagenti utilizzati per le reazioni di amplificazione da quelli utilizzati per le altre reazioni, nonché dai prodotti di post-amplificazione;
- utilizzare puntali con filtro per prevenire la cross-contaminazione tra i campioni;
- utilizzare guanti monouso e cambiarli frequentemente;
- aprire accuratamente le provette per evitare la formazione di aerosol;
- chiudere ogni provetta prima di aprirne un'altra.

Come per qualsiasi dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i dati clinici e gli altri test di laboratorio disponibili per il paziente.

Come con qualsiasi dispositivo diagnostico, con questo prodotto esiste il rischio residuo di ottenere risultati non validi o errati.

Il trattamento farmacologico può interferire con il risultato finale dell'analisi di biologia molecolare.

AVVISI:

- Utilizzare solo campioni in soluzione anticoagulante EDTA. Altri anticoagulanti possono interferire con la reazione di amplificazione.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Scongelare e miscelare accuratamente i reagenti del kit prima dell'uso.
- La miscela di PCR deve essere preparata fresca ogni volta.
- Non utilizzare oltre la data di scadenza che appare sull'etichetta della confezione.
- Non utilizzare il prodotto se conservato a temperature diverse da quelle indicate sulle etichette o descritte nelle presenti Istruzioni per l'uso.

- In caso di fuoriuscita del contenuto del kit, fare riferimento alla specifica Scheda di Sicurezza del Materiale (MSDS, disponibile su richiesta).
- In caso di pacco danneggiato, contattare il supporto tecnico prima di utilizzare il kit.
- In caso di incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo, deve essere notificato un avviso al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui si trova l'utente e/o il paziente.

PROTOCOLLO OPERATIVO

a) Purificazione del DNA

I campioni raccolti devono essere trasportati e conservati a +2-+8°C ed utilizzati entro 3 giorni dalla data del prelievo. Conservare il campione a -20°C se utilizzato dopo 3 giorni. Il DNA estratto può essere conservato a -20°C per un massimo di sei mesi.

Per la purificazione del DNA genomico Clonit raccomanda:

- Duplica Blood DNA kit (ref. EDI002250) e Duplica NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) per Duplica®PREP Automatic Extractor (ref. EDI001) nel caso di estrazione automatica.
- CloNext Blood DNA kit 200 (ref. OP02001-48) con CloNext 12 Automated Nucleic Acid Purification System (ref. OP01018) o CloNext 24 Automated Nucleic Acid Purification System (ref. OP01019) nel caso di estrazione automatica.

Nel caso di estrazione/purificazione manuale:

- Fassst DNA Releaser (ref. EMR057050) per sangue **fresco** (conservato fino a un massimo di 24 ore a 2÷8°C).
- Spin DNA Purification Kit (ref. EMR061050) per sangue **congelato** o conservato a 2÷8°C per più di 24 ore.

Altri reagenti e metodi di estrazione devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

Attenzione! Utilizzare sangue in soluzione anticoagulante EDTA.

b) Programmazione del termociclatore

Riferirsi allo specifico manuale dello strumento assicurandosi di impostare il profilo termico indicato in tabella (**Profilo Termico**). Raccomandiamo di accendere e programmare il termociclatore prima di allestire la miscela di reazione.

Piattaforma DX®/CFX

- Selezionare *Create a new Experiment*
- Nella sezione *Protocol* impostare il profilo termico in *Create New* come indicato in tabella
- Selezionare i campioni e impostare i fluorofori FAM (genotipo Wild Type, Allele 1) ed HEX (genotipo Mutato, Allele 2) nel menu *Plate Editor*

Piattaforma Applied Biosystems® 7500

- Selezionare *Create a New Experiment*
- Nella sezione *Experiment Properties* definire il nome e il tipo di esperimento (*Quantitation-Standard Curve*)
- Infine, impostare il tipo di tecnologia (*Taqman® Reagents*), la modalità di esecuzione (Run Mode: 7500 o 7500 Fast) e la velocità di ramping (Ramp Speed: Standard)
- Nel menu *Setup* selezionare *Run Method* e impostare il profilo termico come indicato in tabella
- Nel menu *Setup* selezionare *Plate Setup-Define Targets and Samples* per selezionare i campioni e assegnare il target VIC a MUT (genotipo Mutato) e il target FAM a WT (genotipo Wild Type)
- Nella sezione *Define Samples* inserire il nome del campione
- Selezionare i pozzetti in uso in *Plate Setup-Assign Targets and Samples*
- Selezionare None nella tendina *Select the dye to use as the passive reference*

Piattaforma Rotor-Gene® Q

- Avviare il programma e selezionare *Advanced* nella finestra *New Run*
- Selezionare *new template* in *Empty Run* oppure un template già esistente
- Selezionare il Tipo di Rotore dello strumento in uso e poi *Next*
- Indicare 25 µl come volume di reazione e poi *Next*
- Selezionare *Edit Profile* impostare il profilo termico come indicato nella Tabella di seguito
- Selezionare *Gain Optimisation* e attivare la funzione *Perform Optimisation before 1st acquisition*
- In *Channel Settings* selezionare green/yellow fluorophores e la posizione "1" per effettuare l'ottimizzazione. Chiudere la finestra e selezionare *Next*, infine *Start Run*

Tabella Profilo Termico (comune per tutte le piattaforme)

Tempo	Temperatura	Cicli
10 min	95°C	1
20 sec	95°C	35
30 sec	60°C	Acquisizione Fluorescenza

c) Preparazione della PCR mix

Il volume totale della reazione è di **25 µl**. Per ogni esperimento preparare una mix di PCR per i **2 controlli (C1 e C2)**, 1 **Bianco di Reazione (BM)** e **n+1** campioni. La mix deve essere preparata miscelando i reagenti come indicato in tabella:

REAGENTI	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	10
DNA Estratto	5

Non conservare la mix di PCR ma prepararla fresca ogni volta.

Terminata la preparazione della mix, aliquotare **20 µl** della **Master Mix** nelle provette o nei pozzetti della micropiastra per PCR e aggiungere in ogni provetta/pozzetto **5 µl** di **DNA estratto** (100-250 ng/reazione) o dei **controlli**; disporre le provette o la piastra all'interno dello strumento e avviare il programma di amplificazione precedentemente impostato.

d) ANALISI ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Analisi delle curve di Real Time PCR

Fare riferimento al manuale d'uso specifico per la piattaforma in uso per visualizzare le curve di amplificazione di tutti i campioni in analisi. L'analisi dettagliata dei dati grezzi dipende dallo strumento utilizzato. La linea di base del rumore di fondo del segnale fluorescente può essere settata sia in automatico sia a un numero di cicli predefinito.

La fluorescenza di ogni canale indica l'ibridazione di una sonda specifica per un allele: il **Canale 1 per FAM/Green= sonda dell'Allele Wild Type**, mentre il **Canale 2 per HEX/VIC/Yellow= sonda dell'Allele Mutato**. Se un campione mostra una fluorescenza in **FAM/Green**, il campione ha un **Allele Wild Type**. Se il campione mostra una fluorescenza in **HEX/VIC/Yellow**, il campione ha un **Allele Mutato**.

Se viene rilevato solo il **segnale FAM/Green** il campione è **Omozigote Wild Type**; mentre se viene rilevato solo il **segnale HEX/VIC/Yellow** il campione è **Omozigote Mutato**. Infine, se sono rilevati sia **FAM/Green** che **HEX/VIC/Yellow** il campione è **Eterozigote**.

La PCR risulta inibita se non viene rilevato nessun segnale. In questo caso fare riferimento alla sezione Troubleshooting.

Il Controllo 1 (Allele Wild Type), il Controllo 2 (Allele Mutato) e il Bianco di Reazione (BM) forniti devono essere inclusi in ogni seduta analitica per poter validare la seduta. Dopo la corsa, la linea soglia deve essere impostata affinché: **il Controllo 1 risulti positivo in FAM/Green e negativo in HEX/VIC/Yellow, mentre il Controllo 2 risulti positivo in HEX/VIC/Yellow e negativo in FAM/Green. Il Bianco di Reazione deve essere negativo sia nel canale FAM/Green che nel canale HEX/VIC/Yellow.**

Se si verificano queste tre condizioni la corsa è valida ed è possibile analizzare i dati, altrimenti la corsa non è valida. È responsabilità dell'operatore validare la corsa controllando che queste condizioni si siano verificate.

Interpretazione dei Risultati

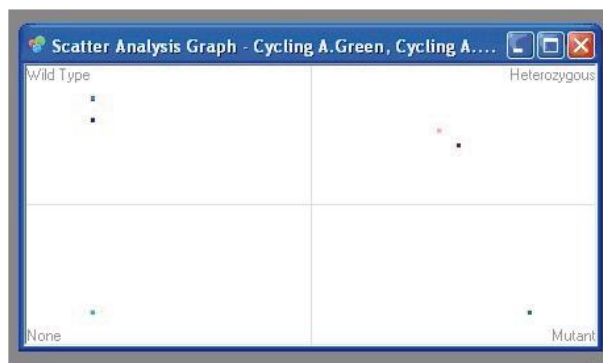
FAM/Green	HEX/VIC/Yellow	Risultato
Rilevato	Non Rilevato	Wild Type
Non Rilevato	Rilevato	Mutato
Rilevato	Rilevato	Eterozigote
Non rilevato	Non Rilevato	Inibizione

Analisi in Scatter Plot

È inoltre possibile utilizzare l'**analisi in Scatter Plot** per visualizzare i risultati ottenuti con le piattaforme **Rotor-Gene® Q** e **DX®/CFX**. In questo tipo di analisi ogni campione è identificato da un punto che rappresenta il valore finale di fluorescenza (end-point) per i due fluorofori.

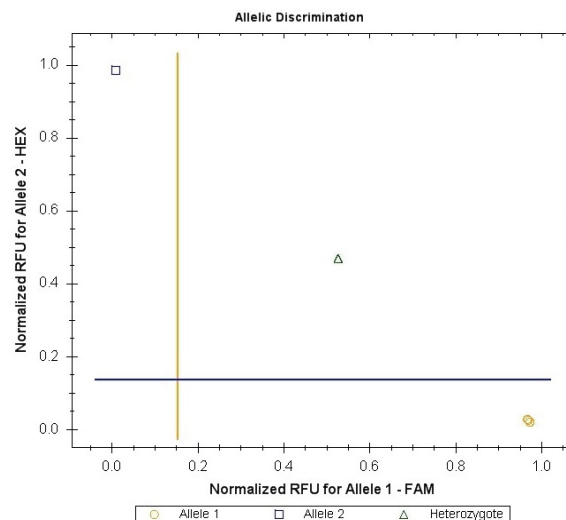
Piattaforma Rotor-Gene®Q

- Nel menu *Analysis* selezionare *Other*
- Selezionare *Scatter Graph Analysis*, evidenziare entrambi i canali *Green* e *Yellow* e premere *Show* per visualizzare lo Scatter Plot. Il grafico Scatter plot è suddiviso in quattro aree rappresentanti i campioni classificati come Wild Type, Mutati, Eterozigoti e Non Amplificati
- Nella finestra *Scatter Analysis graph* selezionare con il mouse l'area corrispondente a uno specifico genotipo e denominarlo come è mostrato in figura (*Green* → *Wild Type*; *Yellow* → *Mutated*; e *Green/Yellow* → *Heterozygous*)



Piattaforma DX®/CFX

- Selezionare *Ct Determination Mode* e *Regression* nel menu *Settings*
- Impostare il bianco di reazione come NTC in View/Edit Plate
- Selezionare *Quantitation*. Il **bianco/NTC** non deve risultare amplificato dalla tabella dei *Ct* in basso a destra della schermata (valori di *Ct*=N/A per entrambi i fluorofori). Il **Controllo 1 (C1)** deve risultare positivo (valore di *Ct*≠N/A) in FAM e negativo (valore di *Ct* =N/A) in HEX, mentre il **Controllo 2 (C2)** positivo in HEX e negativo in FAM. Se si verificano queste condizioni la corsa è valida ed è possibile analizzare i dati, altrimenti la corsa non è valida. E' responsabilità dell'operatore convalidare la corsa controllando che queste condizioni si siano verificate
- I campioni da analizzare (**Unk**) devono risultare amplificati in almeno uno dei canali di fluorescenza. Se non viene rilevato nessun segnale (valori di *Ct*=N/A per entrambi i fluorofori) la PCR risulta inibita e i **campioni che presentano questa condizione devono essere esclusi dalla successiva analisi in scatter plot**. Per la soluzione del problema fare riferimento ai punti 1 e 2 della sezione Troubleshooting.
- In *Allelic Discrimination* impostare *RFU* e *Normalize Data* per visualizzare il corrispondente Scatter Plot
- Impostare manualmente le linee di Threshold a 0,15



Lo Scatter Plot presenta tre quadranti principali, nei quali ogni punto rappresenta i due segnali di fluorescenza per ogni singolo campione/controllo:

I segnali inclusi in ciascun quadrante corrispondono rispettivamente a campioni con il seguente genotipo:

Quadrante in basso a destra	Campioni Wild Type (WT- <i>Allele 1</i>)
Quadrante in alto a sinistra	Campioni Mutati (MUT- <i>Allele 2</i>)
Quadrante in alto a destra	Campioni Eterozigoti (HET- <i>entrambi gli Alleli</i>)

PERFORMANCE ANALITICHE E CLINICHE

1. SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica del prodotto è stata garantita dal corretto design di primers e sonde e dalle condizioni stringenti in cui viene effettuata la prova. Primers e sonde sono stati controllati per possibili omologie con altre sequenze pubblicate in diverse banche dati, senza mai riscontrare appaiamenti aspecifici.

2. SENSIBILITÀ ANALITICA

Per determinare se il dispositivo è in grado di rilevare e identificare gli alleli specifici anche in presenza di una bassa quantità di DNA genomico, sono stati testati 84 estratti di DNA presenti in house e precedentemente caratterizzati per FV (51 WT, 25 eterozigoti e 8 mutanti) quantificati, diluiti ad una concentrazione finale di 5ng/μl e testati su Biorad CFX96.

Tutti i campioni testati sono stati correttamente genotipizzati.

3. ACCURATEZZA DIAGNOSTICA

Estrazione Automatica (Duplica Prep)

Al fine di dimostrare l'accuratezza del test, 68 campioni di sangue intero a genotipo noto (40 campioni WT, 22 HET e 6 MUT), raccolti in EDTA, sono stati testati con il prodotto in oggetto. Il DNA genomico di tali campioni è stato ottenuto mediante l'uso dell'Estrattore automatico DuplicaPREP (Ref. EDI001). I risultati sono stati analizzati tramite la funzione Allelic Discrimination e hanno evidenziato una specificità del 100% senza rilevare nessuna discordanza tra il prodotto in oggetto e il metodo impiegato come riferimento.

Estrazione Automatica (CloNext 24 Automated Nucleic Acid Purification System)

Per valutare l'accuratezza del test con il sistema CloNext, sono stati analizzati 48 campioni di sangue intero raccolti in EDTA con genotipo noto, 45 dei quali wild-type (WT) e 3 eterozigoti (HET). La precisione complessiva è stata del 100%.

Estrazione Manuale (Spin DNA Purification Kit, EMR061050)

Per valutare l'accuratezza del test con Spin DNA Purification Kit, sono stati analizzati 16 campioni di sangue intero raccolti in EDTA con genotipo noto, 13 dei quali wild-type (WT), 2 eterozigoti (HET) e 1 mutato (MUT). La precisione complessiva è stata del 100%.

Estrazione Manuale (Fassst DNA Releaser, EMR057050)

Per valutare l'accuratezza del test con Fassst DNA Releaser, sono stati analizzati 16 campioni di sangue intero raccolti con EDTA con genotipo noto, 13 dei quali wild-type (WT), 2 eterozigoti (HET) e 1 mutato (MUT). La precisione complessiva è stata del 100%.

4. PRECISIONE INTER-ASSAY

Al fine di dimostrare la riproducibilità inter-assay del kit sono stati testati 5 campioni (2 campioni WT, 2 HET e 1 MUT) più i controlli (WT, MUT e Bianco di Reazione) ripetuti in 4 prove diverse come replicati singoli sulla piattaforma AB7500. I risultati mostrano il 100% di accuratezza tra i genotipi attesi e i risultati ottenuti. CV% è inferiore al 5% in accordo con i criteri di accettazione.

5. PRECISIONE INTRA-ASSAY

Al fine di dimostrare la riproducibilità intra-assay del kit sono stati testati 5 campioni (2 campione WT, 2 HET e 1 MUT) più i controlli (WT, MUT e Bianco di Reazione) ripetuti 4 volte nella stessa prova sulla piattaforma AB7500. I risultati mostrano il 100% di accuratezza tra i genotipi attesi e i risultati ottenuti. CV% è inferiore al 5% in accordo con i criteri di accettazione.

6. RIPRODUCIBILITÀ TRA LOTTI E OPERATORI

I controlli positivi WT e mutati sono stati utilizzati per simulare campioni reali, 1 FV Wt, 1 eterozigote e 1 mutato. 5 replicati per ogni campione simulato sono stati ripetuti con tre diversi lotti su tutte le piattaforme real time compatibili con il dispositivo, AB7500, CFX96 e Rotorgene Q. In tutte le analisi sono stati aggiunti controlli positivi e negativi. I test sono stati ripetuti anche con un operatore diverso solo sullo strumento Rotorgene Q. I risultati mostrano il 100% di accuratezza tra i genotipi attesi e i risultati ottenuti. CV% è inferiore al 5% in accordo con i criteri di accettazione.

BIBLIOGRAFIA

- E Thorelli 1, R J Kaufman, B Dahlbäck. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. Blood. 1999 Apr 15;93(8):2552-8.
- C Aparicio 1, B Dahlbäck. Molecular mechanisms of activated protein C resistance. Properties of factor V isolated from an individual with homozygosity for the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene. Biochem J. 1996 Jan 15;313 (Pt 2) (Pt 2):467-72.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996;88:3698-3703.
- Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. N Engl J Med. 1995;33:2912-2917.
- P de Moerloose 1, G Reber, A Perrier, T Perneger, H Bounameaux. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. Br J Haematol. 2000 Jul;110(1):125-9.
- Kathrin Geiger, Andreas Leiherer, Eva-Maria Brandtner, Peter Fraunberger, Heinz Drexel, Axel Muendlein. Direct blood PCR: TaqMan-probe based detection of the venous thromboembolism associated mutations factor V Leiden and prothrombin c.20210G>A without DNA extraction. Clin Chim Acta. 2019 Jan;488:221-225.
- USE OF ANTICOAGULANTS IN DIAGNOSTIC LABORATORY INVESTIGATIONS, WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2
- Visvikis S, Schlenck A, Maurice M. DNA extraction and stability for epidemiological studies. Clin Chem Lab Med. 1998 Aug;36(8):551-5. doi: 10.1515/CCLM.1998.094. PMID: 9806458.
- Sotoudeh Anvari M, Gharib A, Abolhasani M, Azari-Yam A, Hossieni Gharalari F, Safavi M, Zare Mirzaie A, Vasei M. Pre-analytical Practices in the Molecular Diagnostic Tests, A Concise Review. Iran J Pathol. 2021 Winter;16(1):1-19. doi: 10.30699/ijp.2020.124315.2357. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33391375; PMCID: PMC7691716.

TROUBLESHOOTING

Problema 1: Segnale debole o assente nei campioni analizzati.

1. La PCR è stata inibita:
 - Assicurarsi di utilizzare un metodo di estrazione di DNA validato e seguire attentamente le istruzioni riportate nel manuale d'uso del produttore.
2. Errore nel pipettaggio per omissione di un reagente o del campione:
 - Ripetere l'analisi partendo dalla PCR.
3. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di conservazione del kit.
4. Quantità di DNA insufficiente e/o di bassa purezza. Estrazione di DNA inefficiente:
 - Ripetere l'estrazione del DNA.
5. Selezione del canale/filtro sbagliato. Le condizioni di preparazione di PCR non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
 - Verificare le condizioni di PCR e selezionare i canali di fluorescenza riportati nel protocollo per la rilevazione del campione ignoto.

Problema 2: Segnale debole o assente nel controllo Wild Type C1 e/o controllo Mutato C2.

1. Le condizioni di PCR non rispecchiano le istruzioni riportate:

- Verificare il protocollo di amplificazione e selezionare il canale di fluorescenza riportato nel manuale.
2. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio dei reagenti non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
- Verificare le condizioni di conservazione del kit.

Problema 3: Presenza di segnale nel Bianco di Reazione BM.

1. Contaminazione durante la procedura di estrazione del DNA. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
- Decontaminare il piano di lavoro e tutti gli strumenti.
 - Manipolare i controlli C1 e C2 solo alla fine.
 - Ripetere la PCR utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 4: Segnale HEX nel controllo Wild Type C1 e/o segnale FAM nel controllo Mutato C2.

1. Contaminazione durante la procedura di preparazione della PCR. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
- Decontaminare il piano di lavoro e tutti gli strumenti.
 - Usare solo puntali con filtro durante la procedura. Cambiare puntali per ogni tubo/pozzetto.
 - Ripetere la PCR utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 5: Intensità di fluorescenza variabile.

1. La Master Mix di PCR non è stata miscelata bene:
- Ripetere attentamente la procedura di preparazione della PCR.
2. Presenza di bolle d'aria nei tubi/piastra di PCR:
- Eliminare le eventuali bolle presenti prima di iniziare una nuova corsa.

Problema 6: Assenza completa di segnale.

1. Controllare le prestazioni del termociclatore:
- Effettuare la calibrazione dello strumento.
2. Deterioramento dei fluorofori/primers. Le condizioni di stoccaggio non sono conformi alle istruzioni riportate nel manuale d'uso:
- Verificare le condizioni di conservazione del kit.
 - Verificare la data di scadenza del kit.

Problema 7: Il termociclatore dà un messaggio di errore.

1. Consultare il manuale di Istruzioni Per l'Uso dello strumento o contattare il supporto tecnico.

Problema 8: I reagenti del kit sono stati lasciati fuori dall'intervallo di temperatura di stoccaggio.

1. Questi reagenti devono essere conservati come indicato per una corretta esecuzione del test. Le prestazioni del prodotto non sono garantite se questi reagenti non sono stati correttamente conservati.

Legenda dei Simboli Utilizzati Key to symbols used			
REF	Codice del prodotto <i>Catalogue number</i>		Limitazioni di temperatura <i>Temperature limitation</i>
IVD	Dispositivo medico diagnostico in vitro <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i>	REV	Revisione <i>Revision</i>
LOT	Numero di lotto <i>Batch code</i>		Leggere le istruzioni d'uso <i>Consult instructions for use</i>
	Data di scadenza <i>Use by</i>		Sufficiente per un <n> di test <i>Contains sufficient for <n> tests</i>
	Fabbricante <i>Manufacturer</i>	CE	Conforme ai requisiti della Direttiva 98/79/CE <i>According to 98/79/CE Directive</i>



CLONIT S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano

Production Site: Via Umberto Saba, 25 - 20081 Abbiategrosso (MI)

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it

