



Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit

[REV] EER039032_IFU_REV.05D_ENITA

[REF] EER039032-32 tests

Instructions For Use

INTENDED USE

Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit is an *in vitro* nucleic acid amplification test for the detection of the nucleotide substitution C677T (allelic variant g.14783C>T) of MTHFR C677T gene in human genomic DNA extracted from peripheral whole blood samples collected in EDTA.

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

INTRODUCTION

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is the rate-limiting enzyme in the methyl cycle, and it is encoded by the MTHFR gene. Methylenetetrahydrofolate reductase catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, a co-substrate for homocysteine remethylation to methionine. Genetic variation in this gene may influence susceptibility to occlusive vascular disease, neural tube defects, dementia, colon cancer, and acute leukemia. The enzyme is coded by the gene with the symbol MTHFR on chromosome 1 location p36.3 in humans. There are DNA sequence variants (genetic polymorphisms) associated with this gene. In a report brought the number of polymorphisms up to 24. Two of the most investigated are C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) single nucleotide polymorphisms (SNP). The MTHFR nucleotide at position 677 in the gene has two possibilities: C (cytosine) or T (thymine). C at position 677 (leading to an alanine at amino acid 222) is the normal allele. The 677T allele (leading to a valine substitution at amino acid 222) encodes a thermolabile enzyme with reduced activity. The degree of enzyme thermolability (assessed as residual activity after heat inactivation) is much greater in 677TT individuals (18-22%) compared with 677CT (56%) and 677CC (66-67%). Individuals of 677TT are predisposed to mild hyperhomocysteinemia (high blood homocysteine levels), because they have less active MTHFR available to produce 5-methyltetrahydrofolate (which is used to decrease homocysteine). Low dietary intake of the vitamin folic acid can also cause mild hyperhomocysteinemia.

PRINCIPLE OF THE TEST

Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit is designed to identify the C677T nucleotide substitution in the human MTHFR 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 MTHFR C677T 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 (hexa-chloro-fluorescein). Both the 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).

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), Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies™) and ELITE InGenius® (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030). Other makes and models should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

For automatic sample analysis with the instrument «ELITE InGenius®» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) the following generic products are required:

- The extraction cartridges «ELITE InGenius® SP 200» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- The consumables for extraction of nucleic acids from biological samples «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- The box for tips waste «ELITE InGenius® Waste Box» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000),
- The cassettes for amplification of nucleic acids «ELITE InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- The filter tips for the single nozzle pipettor «300 µL Filter Tips Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

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

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- 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
- If required, Clonit offers the necessary technical support for the correct use of the kit.
- Carefully read this Instruction for Use before using the kit
- Do not use the reagents after the expiry date
- Thaw and carefully mix the reagents of the kit before use
- Do not mix the reagents from different lots of the product
- Use calibrated and regularly checked pipettes and instrumentation only
- Use dedicated laboratory equipments. Change gloves frequently
- Periodically wipe the working area with 0,5% hypochlorite
- 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
- Materials containing or potentially containing infectious agents must always be manipulated in a separated microbiological safety room under a Biohazard biological hood
- In case of damaged package, contact the technical support before using the kit
- 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)
- The kit reagents, individual protective equipments, used materials, biological samples and test residuals must be disposed in accordance with local regulations
- Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis
- The ELITE InGenius® PCR Cassettes must be handled in such a way to reduce as much as possible amplification product diffusion into the environment in order to avoid sample and reagent contamination.

OPERATING PROCEDURE

a) DNA purification

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.

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 in order to properly set the threshold line before samples analysis. 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

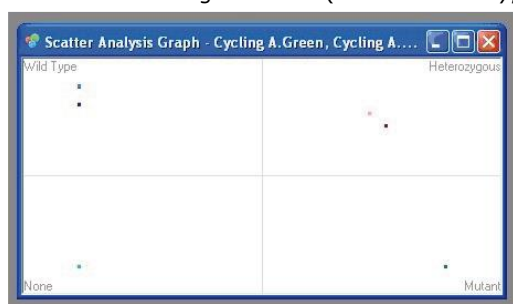
Scatter Plot analysis

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

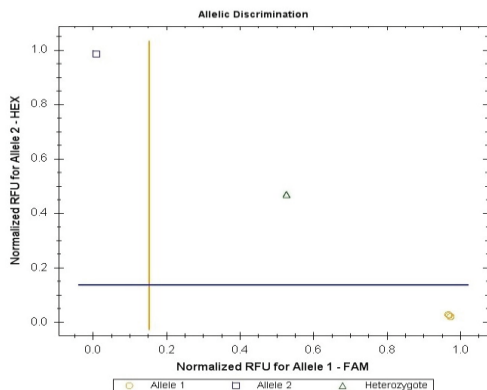
- In the *Analysis* menu select *Other*
- Select *Scatter Graph Analysis*, highlight both *Green* and *Yellow* channels and press *Show* to display the scatter plot. The scatter plot is divided in four areas corresponding to samples classified as Wild Type, Mutant, Heterozygous.

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 *Ct Determination Mode* and *Regression* in the *Settings* menu
- In the *View/Edit Plate* menu set the reaction blank as *NTC*
- Select *Quantitation*. In the *Ct* table in the lower right part of the screen no amplification must be detected (*Ct* value=N/A for both fluorophores) for the **blank/NTC** sample. **Control 1 (C1)** must be detected (*Ct* value≠N/A) in FAM and non detected (*Ct* 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 (*Ct* 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>)

OPERATING PROCEDURE FOR ELITE InGenius® SYSTEM

Before starting the session, it is necessary to (refer to the specific instrument documentation):

- switch on the ELITE InGenius® and select the login mode "**CLOSED**",
- verify that the amplification controls (**Wild Type Control (Control 1, C1)**, **Mutated Control (Control 2, C2)** and **Reaction Blank (BM)**) were run in association with the amplification reagent lot to be used and that they are approved and valid (Status). If there are not amplification controls approved or valid, run them as described in the following paragraphs;
- choose the type of run, following the instructions on the Graphical User Interface (GUI) for the session setup and using the Assay Protocols provided by ELITEchGroup S.p.A. These IVD protocols were specifically validated with the ELITE InGenius® instrument and the cited matrix. The Assay protocol available for sample testing with the **Duplico^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit** product is described in the table below.

Name	Matrix	Report	Characteristics
Clonit_COAG MTHFR C677T_WB_200_200	Whole Blood	Wild type/ Heterozygous/ Mutated	Extraction Input Volume: 200 µL Extraction Elute Volume: 200 µL Internal Control: NO Sonication: NO Dilution Factor: 1 PCR Mix volume: 20 µL Sample PCR input volume: 5 µL

The **Duplico^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit**, in association with the ELITE InGenius® system, can be used in order to perform:

- Integrated run (Extract + PCR),
- Amplification run (PCR only),
- Amplification Positive Control and Negative Control run (PCR only).

All the parameters needed for the session are included in the Assay protocol available on the instrument and are automatically recalled when the Assay protocol is selected.

INTEGRATED RUN (EXTRACT + PCR).

To setup an integrated run, carry out the following steps as per the GUI:

1. Thaw the Amplification Mix and the Oligo Mix tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of samples to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
2. Select "Perform Run" from the "Home" screen.
3. Ensure that the "Extraction Input Volume" is 200 µL and the Extracted Elute Volume is 200 µL.
4. For each Track of interest fill in the "SampleID" (SID) by typing or by scanning the sample barcode.
5. Select the Assay protocol to be used in the "Assay" column
6. Ensure that the "Protocol" displayed is: "Extract + PCR".
7. Select the sample loading position in the "Sample Position" column:
 - if a primary tube is used, select "Primary Tube",
 - if a secondary tube is used, select "Extraction Tube".
8. Click "Next" to continue the setup.

9. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
10. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
11. Load the "PCR Cassettes", the "ELiTe InGenius® SP 200" extraction cartridges, all the required consumables and the samples to be extracted, following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
12. Close the instrument door.
13. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELiTe InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

AMPLIFICATION RUN (PCR ONLY)

To set up the amplification run carry out the following steps as per GUI:

1. Thaw the Amplification Mix and the Oligo Mix tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of samples to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
2. Select "Perform Run" from the "Home" screen.
3. Even if no extraction will be carried out, ensure that the Extraction Input Volume is 200 µL and the Extracted Elute Volume is 200 µL.
4. For each Track of interest fill in the "SampleID" (SID) by typing or by scanning the sample barcode.
5. Select the Assay protocol to be used in the "Assay" column.
6. Select "PCR Only" in the "Protocol" column.
7. Ensure the sample loading position in the "Sample Position" column is "Elution Tube (bottom row)". Click "Next" to continue the setup.
8. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
9. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
10. Load the "PCR Cassette" and the extracted Nucleic Acid samples following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
11. Close the instrument door.
12. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELiTe InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

AMPLIFICATION RUN FOR POSITIVE CONTROL WILD TYPE, POSITIVE CONTROL MUTATED AND NEGATIVE CONTROL

Before analysis of any sample, it is mandatory to generate and to approve the amplification controls for the amplification reagent lot that will be used in testing:

- as amplification Positive Controls, use the Positive Control Wild Type (C1) tube and the Positive Control Mutated (C2) (provided with this kit) in association with Assay Protocol Clonit COAG MTHFR C677T_PC,
- as amplification Negative Control, use the negative control (BM) tube (provided with this kit) in association with Assay Protocol Clonit COAG MTHFR C677T_NC.

To setup the amplification run for amplification controls carry out the following steps as per GUI:

1. Thaw the Amplification Mix and the Oligo Mix tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
2. Select "Perform Run" from the "Home" screen.
3. Thaw the Positive Control Wild Type (C1) tube, the Positive Control Mutated (C2) tube and the negative control (BM) tube for the session.
4. Transfer at least 10 µl of each control to an "Elution tube", provided with the ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set.
5. In the Track of interest, select the Assay protocol to be used in the "Assay" column.
6. For the Wild Type Control (Control 1, C1) and Mutated Control (Control 2, C2), select the Assay Protocol Clonit COAG MTHFR C677T_PC in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date.
7. For the Negative Control (Reaction Blank (BM)), select the Assay Protocol Clonit COAG MTHFR C677T_NC in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date of the molecular biology grade water. Click "Next" to continue the setup.
8. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
9. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
10. Load the "PCR Cassettes", the Wild type control tube, Mutated Control and the Negative Control (Reaction Blank (BM)) tube following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
11. Close the instrument door.
12. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELiTe InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

Review and approval of results

At the end of the run, the "Results Display" screen is automatically shown. In this screen, the sample/control results and the run information are shown. From this screen it is possible to approve the results, print or save the reports ("Sample Report" or "Track Report"). Refer to the ELiTe InGenius® instrument user's manual for more details.

The ELiTe InGenius® system generates the results with the product **Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit** through the following procedure:

- Validation of amplification Positive Control and Negative Control results,
- Validation of sample results,
- Sample result reporting.

The amplification Wild Type Control, Mutated Control and Negative Control results, specific for the amplification reagent lot, will expire **after 15 days**.

The results of Wild Type Control, Mutated Control and Negative Control amplification runs are used by the instrument software to setup the "Control Charts" monitoring the amplification step performances. Refer to the instrument user's manual for more details. When the Wild Type control or Mutated control or Negative Control result does not meet the acceptance criteria, the "not passed" message is shown on the "Controls" screen and it is not possible to approve it. In this case, the amplification Wild Type Control or Mutated Control or Negative Control reaction has to be repeated.

When the Wild Type Control and/or Mutated Control and/or Negative Control is run together with samples to be tested and its result is invalid, the entire session is invalid. In this case, the amplification of all samples must be repeated too.

For each sample, the assay result is automatically interpreted by the system as established by the ELITE InGenius® software algorithm and the Assay protocol parameters.

The sample results are stored in the database and can be exported as "Sample Report" and "Track Report".

Sample Result Reporting

The sample results are stored in the database and can be viewed as "Sample Report" and "Track Report".

The "Sample Report" shows the details of a sample run sorted by Sample ID (SID).

The "Track Report" shows the details of a sample run track by track.

The "Sample Report" and "Track Report" can be printed and signed by authorized personnel

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 MTHFR C677T Kit

[REV] EER039032_IFU_REV.05D_ENITA

[REF] : EER039032-32 test

Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' D'USO

Il **Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit** è un test di amplificazione di acidi nucleici *in vitro* per la ricerca della sostituzione aminoacidica (variante allelica g.14783C>T) del gene che codifica per il gene MTHFR C677T, nel DNA ottenuto da campioni clinici di sangue intero periferico, raccolti in EDTA.

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 che permette di testarli contemporaneamente.

INTRODUZIONE

La metilenetetraidrofolato reduttasi (MTHFR) è l'enzima limitante nel ciclo-metile, ed è codificata dal gene MTHFR. La metilenetetraidrofolato reduttasi catalizza la conversione di 5,10-metilene a 5-metiltetraidrofolato, un co-substrato per la rimetilazione dell'omocisteina in metionina. Variazioni genetiche a carico di questo gene possono causare: suscettibilità alla malattia vascolare-occlusiva, difetti al tubo neurale, demenza, cancro del colon e leucemia acuta. L'enzima è codificato dal gene MTHFR localizzato sul cromosoma 1 posizione p36.3. Esistono varianti di sequenza del DNA (polimorfismi genetici) associati a questo gene. Un report ha portato il numero di polimorfismi fino a 24. Due dei più studiati polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131). Il nucleotide del gene MTHFR in posizione 677 ha due possibilità: C (citocina) o T (timina). C alla posizione 677 (che porta ad un'alanina all'aminoacido 222) è l'allele normale. L'allele 677T (che porta a una sostituzione a valina nell'aminoacido 222) codifica per un enzima termolabile con attività ridotta. Il grado di termolabilità dell'enzima (valutata come attività residua dopo l'inattivazione di calore) è molto maggiore negli individui 677TT (18-22%) rispetto 677CT (56%) e 677CC (66-67%). Gli individui di 677TT sono predisposti per iperomocisteinemia lieve (livelli di omocisteina alta nel sangue), poiché presentano MTHFR meno attivi e meno disponibili per la produzione di 5-metiltetraidrofolato (che viene utilizzato per diminuire l'omocisteina). Basso apporto dietetico di acido folico può anche causare iperomocisteinemia lieve.

PRINCIPIO DEL TEST

Il **Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit** è stato disegnato per riconoscere la sostituzione aminoacidica C677T nel gene umano MTHFR. I reagenti per la reazione di amplificazione sono pronti all'uso e suddivisi 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.

Il **Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit** è basato sul riconoscimento specifico e amplificazione di sequenze target di PCR e sulla rilevazione simultanea dei prodotti di PCR tramite sonde fluorescenti a DNA. Vengono usate due sonde marcate con un differente fluoroforo per ogni sequenza investigata; 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).

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)** ciascuna.

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 micropiastre ottiche 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/Dnase-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), Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies™) e ELiTe InGenius® (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030). Altre marche e modelli devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento «ELiTe InGenius®» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici:

- Cartucce di estrazione «ELiTe InGenius® SP200» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200),
- Materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici «ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS),
- «ELiTeInGenius® Waste Box» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000),
- «ELiTe InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR),
- «300 µL Filter Tips Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, codice TF-350-L-R-S).

La strumentazione deve essere regolarmente mantenuta e calibrata in accordo con le istruzioni del produttore, in modo da garantire una performance ottimale.

PRECAUZIONI E RACCOMANDAZIONI

- È buona pratica suddividere il laboratorio in tre aree distinte: estrazione del DNA, preparazione della miscela di PCR, e manipolazione dei controlli forniti con il kit. Ogni area deve essere completa di cappa a flusso laminare e di un set di pipette dedicato
- Clonit offre se richiesto ai suoi clienti il supporto tecnico necessario per il corretto utilizzo del kit
- Leggere attentamente questo manuale di Istruzioni Per l'Uso prima di utilizzare il kit
- Non utilizzare reagenti dopo la data di scadenza
- Scongellare e miscelare attentamente i reagenti prima dell'utilizzo
- Non mescolare reagenti provenienti da lotti diversi del prodotto
- Usare pipette e strumentazione tarata e controllata regolarmente
- Usare attrezzatura di laboratorio dedicata e cambiare spesso i guanti
- Pulire regolarmente l'area di lavoro con ipoclorito al 0,5%
- Utilizzare i guanti senza talco ed evitare di lasciare impronte sui tappi ottici. Non scrivere sui tappi ottici per evitare problemi nella rilevazione della fluorescenza
- I materiali contenenti o sospettati di contenere agenti infettivi devono essere sempre manipolati all'interno di una stanza a sicurezza microbiologica e sotto una cappa biologica Biohazard
- In caso di imballo danneggiato del kit, prima dell'utilizzo contattare l'assistenza tecnica
- Non utilizzare il prodotto se conservato in condizioni ambientali diverse da quelle riportate in etichetta e descritte nella specifica sezione di questo manuale di Istruzioni Per l'Uso
- In caso di sversamento del contenuto del kit riferirsi alla Scheda di Sicurezza specifica del prodotto (Material Safety Data Sheet, MSDS; disponibile su richiesta)
- I reagenti del kit, le misure di protezione individuali, i materiali utilizzati, e i residui dei campioni biologici e del test vanno smaltiti in conformità con le norme in vigore nel Paese di utilizzo
- Il trattamento farmacologico potrebbe interferire con il risultato finale
- Le cartucce di amplificazione (PCR Cassettes) di ELiTe InGenius® devono essere manipolate in modo da non disperdere nell'ambiente i prodotti di amplificazione per evitare la possibilità di contaminazioni

PROTOCOLLO OPERATIVO

a) Purificazione del DNA

Per la purificazione del DNA genomico Clonit raccomanda:

-DupliCα Blood DNA kit (ref. EDI002250) e DupliCα NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) per DupliCα®PREP Automatic Extractor (ref. EDI001) nel caso di estrazione automatica

Nel caso di estrazione/purificazione manuale:

-Fasst 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 nella Tabella di seguito

– 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 micropiastre 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. Sono forniti il Controllo 1 (Allele Wild Type), il Controllo 2 (Allele Mutato) e il Bianco di Reazione (BM) per impostare correttamente la linea soglia prima di analizzare i campioni. 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

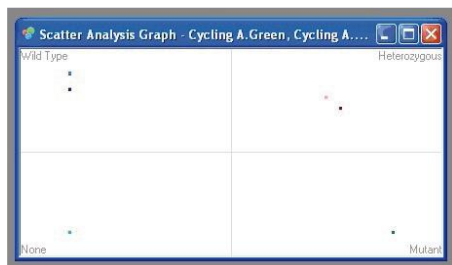
FAM/Green	HEX/VIC/Yellow	Risultato
Rilevato	Non Rilevato	Wild Type
Non Rilevato	Rilevato	Mutato
Rilevato	Rilevato	Eterozigote
Non rilevato	Non Rilevato	Inibizione

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.

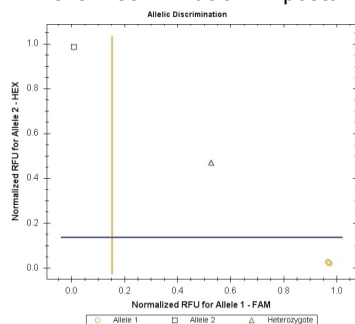
Piattaforma Rotor-Gene® Q

- 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 nella figura che segue (*Green* → *Wild-type*; *Yellow* → *Mutated*; e *Green/Yellow* → *Heterozygous*)



Piattaforma DX®/CFX

- Selezionare *Cr 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 dai tabella dei *Cr* in basso a destra della schermata (valori di *Cr*=N/A per entrambi i fluorofori). Il **Controllo 1 (C1)** deve risultare positivo (valore di *Cr*≠N/A) in FAM e negativo (valore di *Cr* =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 *Cr*=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>)

PROTOCOLLO OPERATIVO PER IL SISTEMA ELITE InGenius®

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario

- accendere ELITE InGenius® e accedere al sistema con la modalità **"CLOSED"**;
- verificare che i controlli di amplificazione (Controllo Wild-Type (controllo 1, C1), Controllo Mutato (Controllo 2, C2) e Bianco di reazione (BM)) siano ottenuti in associazione al lotto di reagente di amplificazione che si intende usare e che i risultati siano presenti, approvati e non scaduti (Status). Se non sono presenti risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi.
- Scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione e utilizzando i protocolli del saggio forniti da ELITechGroup S.p.A..
- L'Assay Protocol del saggio per l'analisi dei campioni clinici disponibile per il prodotto **Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit** è descritto nella tabella seguente:

Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
Clonit COAG MTHF C677T_WB_200_200	Sangue intero	Wild Type Eterozigote Mutato	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume dell'Eluato Estratto: 200 µL Internal Control: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 5 µL

Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit in associazione al sistema ELITE InGenius® può essere utilizzato per eseguire:

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- Corsa di Amplificazione Controllo Wild-Type (C1), Controllo Mutato (C2) e Bianco di Reazione (BM) (PCR only).

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay Protocol del saggio disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol del saggio.

CORSA INTEGRATA (EXTRACT + PCR)

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da GUI

1. Scongela la provetta di Amplification Mix e di Oligo Mix e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL.
4. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay"
6. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
7. Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position": se è utilizzato il tubo primario, selezionare "Primary Tube", se è utilizzato un tubo secondario, selezionare "Extraction Tube".
8. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI.
10. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius® SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

13. Chiudere lo sportello dello strumento.

14. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, l'ELITE InGenius® permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

CORSA DI AMPLIFICAZIONE (PCR ONLY)

Per impostare la corsa di amplificazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare la provetta di Amplification Mix e di Oligo Mix e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home". Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL.
3. Per ogni Track di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
4. Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay"
5. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
6. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare le "PCR Cassette" e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Chiudere la porta dello strumento.
11. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITE InGenius® permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

CORSA DI AMPLIFICAZIONE PER CONTROLLO WILD-TYPE, MUTATO e NEGATIVO (PCR ONLY)

Prima dell'analisi di qualunque campione, è obbligatorio amplificare e approvare i controlli di amplificazione per il lotto di reagenti che verrà usato:

- Come Controllo Positivo di amplificazione, usare il Controllo Positivo Wild Type (C1) e il Controllo Positivo Mutato (C2) (forniti con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit COAG MTHFR C677T_PC.
- Come Controllo Negativo di amplificazione, usare il Controllo Negativo (BM) (fornito con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit MTHFR COAG C677T_NC.

Per impostare la corsa di amplificazione, seguire i seguenti step come indicato dalla GUI:

1. Scongellare la provetta di Amplification Mix e di Oligo Mix e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei controlli da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Scongellare la provetta del controllo positive Wild Type (C1), del controllo positivo Mutato (C2) e del controllo negativo (BM).
4. Trasferire almeno 10 µL di ciascun controllo in un "Elution tube" fornito con l'ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set.
5. A partire dalla "Track" di interesse, selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay".
6. Per i controlli Wild Type e Mutato, selezionare l'Assay Protocol Clonit_MTHFR C677T_PC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dei controlli.
7. Per il controllo negativo (bianco di reazione), selezionare l'Assay Protocol del test Clonit COAG MTHFR C677T_NC nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo negativo.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'impostazione.
9. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le "PCR Cassette", la provetta del Controllo Wild Type, la provetta del Controllo Mutato e la provetta del controllo negativo (bianco di reazione) seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento.
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITE InGenius® permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto. **Esame e approvazione dei risultati** Al termine della corsa è visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione/controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento ELITE InGenius®.

Il sistema ELITE InGenius® genera i risultati con **Duplica^{RealTime} Mix & Match MTHFR C677T Kit** attraverso questa procedura:

- Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Wild Type, del Positivo Mutato e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati del campione,
- Refertazione dei risultati del campione.

I risultati dell'amplificazione del Controllo Wild Type, del Controllo Mutato e del Controllo Negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono **dopo 15 giorni**. I risultati dell'amplificazione Controllo Wild Type, del Controllo Mutato e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal software dello strumento per impostare i "grafici di controllo" che monitorano le prestazioni della fase di amplificazione. Quando il Controllo Wild Type e/o il Controllo Mutato e/o il Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Wild Type e/o del Controllo Mutato e/o del Controllo Negativo deve essere ripetuta. Se il Controllo Wild Type e/o il Controllo Mutato e/o il Controllo Negativo sono processati insieme ai campioni da analizzare ed il loro risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

Per ciascun campione, il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITE InGenius® software** e dai parametri dell'Assay Protocol del saggio. I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati come "Sample Report" e "Track Report". Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i campioni selezionati (SID). Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i Track selezionati. I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

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



CLONIT S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano

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

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

www.clonit.it - info@clonit.it



for in vitro diagnostic use