



Duplica^{RealTime} *M. tuberculosis* Complex Kit

REV: EBR019032_IFU_REV.04D_ENITA

REF: EBR019032 -32 tests

Instructions For Use

INTENDED USE

Duplica^{RealTime} *Mycobacterium tuberculosis* Complex Kit is an *in vitro* nucleic acid amplification test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* and *M. microti*) in clinical specimens. The system is validated for the following clinical samples: Pulmonary Samples (BAL, sputum, endotracheal aspirate); Body Fluids (cerebrospinal fluid, seminal fluid, urine, pleural fluid); Biopsy (liver, femoral biopsy, placenta); Lymphonodes; Pus; Stool.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is caused by gram-positive bacteria known as the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). MTBC includes the typical human-associated pathogens *M. tuberculosis* and *M. africanum*; *M. canettii* and other so-called "smooth TB bacilli", the actual host range of which remains unknown; and several lineages adapted to different mammal species that include *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. orygis*, and *M. pinnipedii* (4–6). Because of the wider host range of animal-associated MTBC, the common view until a decade ago was that human TB strains had evolved from *M. bovis*, the typical agent of bovine TB. Recent comparative genomic analyses have challenged this view by showing that animal MTBC strains nest within the genetically more diverse human MTBC strains. These results not only contradict the hypothesis of an animal origin for human MTBC but also promote an alternative scenario for a human origin of animal MTBC.

PRINCIPLE OF THE TEST

Duplica^{RealTime} *M. tuberculosis* Complex Detection Kit is an assay for the DNA-based detection of the *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium microti*. The kit is designed to amplify a portion of 16S-23S rRNA gene sequences. The reagents for the amplification are ready-to-use and provided in 3 separate tubes:

- **AMPLIFICATION MIX:** with Hot Start Taq DNA polymerase, nucleotides, MgCl₂ and buffer.
- **OLIGO MIX:** with primers and fluorogenic probes.
- **INTERNAL CONTROL OF AMPLIFICATION:** to check the successful of amplification reaction.

Duplica^{RealTime} *M. tuberculosis* Complex Detection 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. The probe designed to detect the target carries the fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) at the 5' end, while the probe detecting the internal control (IC), is labelled with the fluorophore HEX (hexa-chloro-fluorescein). Both the probes have a non fluorescent quencher at the 3' end. If excited, the whole probe doesn't 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 6 **samples**, 1 **Positive Control of Amplification (Control 1, C1)**, and 1 **Reaction Blank (BM)** each.

Kit Components

Reagent	Color Code	Storage (range, °C)	Volume (µl)	Quantity (tubes)
Oligo Mix (OM)*	Green Cap	-22÷-18	200	1
Amplification Mix (AM)	Blue Cap	-22÷-18	400	1
Control 1 (C1, Positive C.)	Red Cap	-22÷-18	>50	1
Control 2 (C2, Internal C.)	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 developed to be used on SmartCycler® (Cepheid), Rotor-Gene® Q (Qiagen) and DX®/CFX (Bio-Rad) 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 accurate PCR cycling and 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 section of Smart Tubes.
- 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.

OPERATING PROCEDURE

a) DNA purification

For genomic DNA purification Clonit recommends to use:

- Duplica®Prep NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) with Duplica® PREP Automatic Extractor (ref. EDI001).
- Bact Extra Pure Kit (ref. EDR004050) for manual extraction

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

b) Thermalcycler Setup

Important points before starting: 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.

N.B.: before starting the run is recommended to save the file as "M. tuberculosis Complex Test"; this way it is possible to save the Thermal Profile and settings and recall them in subsequent runs.

SmartCycler® platform

- Open the SmartCycler® software and click "Define Protocols".
- Click "New Protocol" (bottom left).
- Enter Name " **M. tuberculosis Complex Test** ".
- Enter the parameters for the **M. tuberculosis Complex Test** outlined in Table below
- When ready click "Save Protocol".

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*

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 and as *Fluorophores* and define the sample name.

Thermal Profile Table (common for all the supported platforms)

TIME	TEMPERATURE	CYCLES
10 min	95°C	1
15 sec	95°C	55
60 sec	62°C	Fluorescence Acquisition

c) PCR mix preparation

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

For each experiment prepare a PCR mix for the positive control (**C1**), the **Reaction Blank (BM)** and **n+1** samples. The internal control of amplification (**C2**) should be added directly to the PCR MIX, prior the aliquotation. The reagents of the PCR mix have to be mixed as indicated in the table below:

REAGENT	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	5
Internal Control (C2)	1
Extracted DNA	9

The PCR mix has to be freshly prepared every time

After its preparation, aliquot **16 µl of Master Mix** in the tubes or in the microplates well for PCR then add in each tube/well **9 µl** from the **extracted DNA** or **Control 1 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 thermalcycler.

d) ANALYSIS and INTERPRETATION of RESULTS

Important points before starting: For a detailed description on how to analyze data, refer to *System User's manuals*. **Always visually inspect the amplification plot for each sample tested versus C_T values obtained with the software.**

Results interpretation

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 target specific probes:

- **Channel 1** for **FAM/Green= Target probe**
- **Channel 2** for **HEX/Cy3/Yellow= Internal Control probe**.
- If a sample shows a fluorescence in **FAM/Green (C_T>0)**, the sample is surely positive and the signal detected by **HEX/Cy3/Yellow** fluorophore (**C_T≥0**) is not relevant.
- When no signal at fluorophore **FAM/Green (C_T=0)** is detected, to confirm the negative result, the completed amplification of internal control and therefore the appearance of a fluorescent signal at **HEX/Cy3/Yellow (C_T>0)** fluorophore level, must be verified. Only in this case we can state that the sample is definitely negative.
- Condition in which no signal is detected indicates PCR inhibition. The sample must to be repeated and a dilution 1:10 of the target DNA is suggested.

Please be aware that:

- The Blank is positive in the **HEX/Cy3/Yellow** channel, but negative in the **FAM/Green** channel.
- The Positive Control is positive in both the **FAM/Green** and the **HEX/Cy3/Yellow** channels. The **HEX/Cy3/Yellow** signal, due to competition with **FAM/Green** probe, may arise later or be absent. In this case the **HEX/Cy3/Yellow** signal is not relevant and the run is valid.

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

Results Interpretation Table

FAM/Green	HEX/CY3/Yellow	Results
$C_T > 0$	Not relevant ($C_T \geq 0$)	POSITIVE
$C_T = 0$	$C_T > 0$	NEGATIVE
$C_T = 0$	$C_T = 0$	INHIBITION

TROUBLESHOOTING

Problem 1: Weak or no signal of Positive Control, C1.

1. The PCR conditions did not comply with the instructions. All sample results are INVALID:
 - 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 2: Weak or no signal of the Internal Control, C2 in unknown samples AND Reaction Blank BM.

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 3: FAM signal in 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: No FAM and HEX signals in unknown sample.

1. The PCR was inhibited:
 - Make sure to use a recommended DNA purification method and carefully follow the manufacturer's instructions.

Problem 5: Wide Fluctuations in fluorescence values.

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^αRealTime *M. tuberculosis* Complex Detection Kit

REV: EBR019032_IFU_REV.04D_ENITA

REF: EBR019032- 32 test

Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' D'USO

Duplica^αRealTime *M. tuberculosis* Complex Detection Kit è un test di amplificazione di acidi nucleici *in vitro* per la ricerca del DNA batterico di *M. tuberculosis* Complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* and *M. microti*) in campioni clinici. I materiali biologici per i quali il sistema è stato validato includono: campioni respiratori (broncolavaggio, espettorato indotto, espettorato e broncoaspirato); liquidi biologici (liquido pleurico, liquido seminale, urine, liquido cefalorachidiano); biopsie da tessuti od organi a fresco (biopsia epatica, biopsia femorale, materiale da forame in formalina, placenta); agoaspirato da linfonodo; pus da biopsia polmonare; feci.

INTRODUZIONE

La tubercolosi (TB) è causata da batteri gram-positivi noti come Complesso *Mycobacterium Tuberculosis* (MTBC). Il Complesso MTBC comprende i tipici patogeni a trasmissione umana associati a *M. tuberculosis* e *M. africanum*; *M. canettii* e gli altri cosiddetti "bacilli TB lisci"; d'altra parte l'attuale gamma di infezioni rimane sconosciuta: esistono ulteriori patogeni associati ad infezioni di altre specie animali, tra i quali *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. orygis*, e *M. pinnipedii*. A causa della grande moltitudine di infezioni di MTBC associate a diverse tipologie di animali, la visione comune fino a un decennio fa era che i ceppi di TBC umani si fossero evoluti da *M. bovis*, il tipico agente della tubercolosi bovina. Recenti analisi genomiche di comparazione hanno messo in discussione questa tesi, dimostrando che i ceppi animali di MTBC risultano essere geneticamente differenti dai ceppi MTBC umani. Questi risultati non solo contraddicono l'ipotesi di un'origine animale per MTBC umano, ma promuovono anche uno scenario alternativo per l'insorgenza umana di MTBC da animale.

PRINCIPIO DEL TEST

Duplica^αRealTime *M. tuberculosis* Complex Detection Kit è un test molecolare basato sul riconoscimento del DNA di *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium microti*. È stato sviluppato per amplificare una porzione delle sequenze geniche dell'rRNA 16S-23S. I reagenti per la reazione di amplificazione sono pronti all'uso e suddivisi in tre mix di reazione:

- **AMPLIFICATION MIX**: contenente Hot Start Taq DNA polimerasi, nucleotidi, MgCl₂ e buffer.
- **OLIGO MIX**: contenente i primers e le sonde fluorogeniche.
- **CONTROLLO INTERNO**: permette di verificare l'avvenuta reazione di amplificazione.

Duplica^αRealTime *M. tuberculosis* Complex Detection Kit è basato sul riconoscimento specifico e amplificazione di sequenze target di PCR e sulla rilevazione simultanea dei prodotti di PCR tramite sonde fluorescenti. Vengono usate due sonde marcate con un differente fluoroforo per ogni sequenza investigata; in particolare la sonda per il target specifico porta all'estremità 5' il fluoroforo FAM (6-carbossi-fluoresceina) mentre l'altra sonda, che va a rilevare il controllo interno, ha legato il fluoroforo HEX (esa-cloro-fluoresceina). Entrambe le sonde hanno all'estremità 3' un quencher non fluorescente. In seguito ad eccitazione, 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 6 **campioni**, 1 **Controllo Positivo (Controllo 1, C1)**, 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	200	1
Amplification Mix (AM)	Tappo Blu	-22÷-18	400	1
Controllo 1 (C1, C. Positivo)	Tappo Rosso	-22÷-18	>50	1
Controllo 2 (C2, C. Interno)	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 validato per le piattaforme di Real time PCR: SmartCycler® (Cepheid) e RotorGene® Q (Qiagen) e DX®/CFX (Bio-Rad). 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 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 e evitare di lasciare impronte sui tappi ottici Smart.
- 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.

PROTOCOLLO OPERATIVO

a) Purificazione del DNA

Per la purificazione del DNA genomico Clonit raccomanda:

- Duplica®Prep NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) per Duplica®PREP Automatic Extractor (ref. EDI001).
- Bact Extra Pure Kit (ref. EDR004050) per estrazione manuale.

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

b) Programmazione del termociclatore

Importante prima dell'allestimento della corsa: Riferirsi al Manuale Utente per istruzioni dettagliate sul funzionamento del sistema e per verificare la versione del software. Si consiglia di accendere lo strumento e di impostare il profilo termico prima di preparare la miscela di reazione.

NB: prima di iniziare la corsa si consiglia di salvare il file come "M. tuberculosis Complex Test" in questo modo è possibile salvare il profilo termico con le relative impostazioni e di richiamarle in esecuzioni successive.

Piattaforma SmartCycler®

- Aprire il software SmartCycler® e fare clic su "Define Protocols".
- Fare clic su (in basso a sinistra) "New Protocol".
- Inserire " **M. tuberculosis Complex Test** ".
- Inserire i parametri per il protocollo **M. tuberculosis Complex Test** come indicato nella tabella sotto.
- Concludere la procedura cliccando su "Save Protocol".

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 in tabella
- 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*.

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 e HEX nel menu *Plate Editor*.

Tabella: Profilo Termico (comune per le piatteforme)

TEMPO	TEMPERATURA	CICLI
10 min	95°C	1
15 sec	95°C	55
60 sec	62°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 il controllo positivo (**C1**), il **Bianco di Reazione (BM)** e **n+1** campioni. Il controllo interno di amplificazione (**C2**) deve essere aggiunto direttamente alla mix di PCR, prima che questa venga ali quotata. La mix deve essere preparata miscelando i reagenti come indicato in tabella:

REAGENTI	VOLUME (µl)
Amplification mix	10
Oligo mix	5
Controllo Interno C2	1
DNA Estratto	9

Non conservare la mix di PCR ma prepararla fresca ogni volta

Terminata la preparazione della mix, aliquotare **16 µl** della **Master Mix** nelle provette o nei pozzetti della micropiastra per PCR e aggiungere in ogni provetta/pozzetto **9 µl** di **DNA estratto** o **Controllo Positivo**; disporre le provette o la piastra all'interno dello strumento e avviare il programma di amplificazione precedentemente impostato. Al termine del protocollo di amplificazione, rimuovere le provette o la piastra dal termociclatore.

d) ANALISI ed INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

Importante prima dell'analisi della corsa: Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, riferirsi al Manuale Utente. **Valutare sempre visivamente, per ciascun campione testato, le curve di amplificazione rispetto ai valori di C_T ottenuti con il software d'analisi.**

Interpretazione dei Risultati

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 target:

- **Canale 1** per **FAM/Green**= **sonda associata al Target**
- **Canale 2** per **HEX/Cy3/Yellow**= **sonda associata al Controllo Interno**.
- Quando si registra un segnale a livello del fluoroforo FAM/Green ($C_T > 0$), il campione è sicuramente positivo, ed il segnale rilevato dal fluoroforo **HEX/Cy3/Yellow** ($C_T \geq 0$) non è rilevante.
- Quando non si registra segnale a livello di Fluoroforo **FAM/Green** ($C_T = 0$), per confermare la negatività del risultato, si deve verificare la corretta amplificazione del controllo interno e quindi la comparsa di un segnale di fluorescenza a livello del Fluoroforo **HEX/Cy3/Yellow** ($C_T > 0$). Solo in questo caso si può refertare il campione come negativo.
- Se nessun segnale viene rilevato, la PCR è stata inibita. Il campione deve essere ripetuto, si suggerisce di effettuare una diluizione 1:10 del DNA target.

È importante verificare che:

- Il Bianco deve essere positivo nel canale **HEX/Cy3/Yellow** e negativo nel canale **FAM/Green**.
- Il Controllo Positivo deve essere positivo sia nel canale **FAM/Green** che nel canale **HEX/Cy3/Yellow**. Il segnale **HEX/Cy3/Yellow** può uscire tardivamente o non uscire affatto per competizione. Solo in questo caso la presenza del segnale **HEX/Cy3/Yellow** non è rilevante e la corsa comunque valida.

Se si verificano tutte queste 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/Cy3 /Yellow	Risultato
$C_T > 0$	Non rilevante ($C_T \geq 0$)	POSITIVO
$C_T = 0$	$C_T > 0$	NEGATIVO
$C_T = 0$	$C_T = 0$	INIBIZIONE

TROUBLESHOOTING

Problema 1: Segnale debole o assente nel controllo nel Controllo Positivo (C1).

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.

Problema 2: Segnale debole o assente nel Controllo Interno (C2) in campioni ignoti e nel bianco di Reazione (BM).

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 3: Presenza di segnale FAM 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: Nessun segnale di FAM e HEX in campioni ignoti

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.

Problema 5: Ampie fluttuazioni nei valori di fluorescenza.

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 <i>Key to symbols used</i>			
	Codice del prodotto <i>Catalogue number</i>		Limitazioni di temperatura <i>Temperature limitation</i>
	Dispositivo medico diagnostico in vitro <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i>		Revisione <i>Revision</i>
	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>		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: Viale Lombardia, 6 - 27010 Siziano (PV)

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

www.clonit.it - info@clonit.it

