

For Professional Use Only



Duplica^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* Kit

REV. EBR027032_IFU_REV.03D_ENITA

REF EBR027032 -32 tests

Instructions For Use

INTENDED USE

Duplica^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* Kit is an *in vitro* nucleic acid amplification test for the detection of *Mycoplasma genitalium* (MG) DNA, extracted from clinical specimens (such as urine and swab).

INTRODUCTION

Mycoplasma genitalium (MG) is a member of genital mycoplasmas, which is emerging as an important causative agent of sexually transmitted infections both in males and females. The advent of polymerase chain reaction and other molecular methods have made studies on *M. genitalium* more feasible, which is otherwise a difficult organism to isolate. Besides *Chlamydia trachomatis*, *M. genitalium* is now an important and established cause of non gonococcal urethritis (NGU) in men, more so in persistent and recurrent NGU. Multiple studies have also shown a positive association of *M. genitalium* with mucopurulent cervicitis and vaginal discharge in females as well. The evidence for *M. genitalium* pelvic inflammatory diseases and infertility are quite convincing and indicate that this organism has potential to cause ascending infection. Lack of clear association with *M. genitalium* has been reported for bacterial vaginosis and adverse pregnancy outcomes. Diagnosis of *M. genitalium* infections is performed exclusively using nucleic acid amplification tests (NAATs), owing to poor or slow growth of bacterium in culture.

PRINCIPLE OF THE TEST

Duplica^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* Kit is an assay for the DNA-based detection of the *Mycoplasma genitalium*. The kit is designed to amplify a portion of MgPa and 16S genes. 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 extraction and/or amplification process.

Duplica^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* 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 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 6 **samples** and 2 **controls** each or 5 **samples** and 3 **controls** 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, Positive C.)	Red Cap	-22÷-18	>50	1
Control 2 (C2, Internal C.)**	Yellow Cap	-22÷-18	400	1
Reaction Blank (BM)***	White Cap	-22÷-18	1500	1

***protect the tube from direct light**

**** The Internal Control (C2) can be used as an Extraction/Amplification control (EAC) by adding it directly to the sample/lysis buffer mix during the DNA extraction procedure (for details see the paragraph "a) DNA purification" and refer to the specific protocol of the extraction kit) or as an Amplification Control by adding it directly to the PCR Mix (for details see the paragraph "c) PCR mix preparation")**

***** Used both in the extraction procedure as an extraction negative control (ENC, see paragraph "a) DNA purification"), and in amplification as reaction blank (see the paragraph "c) Preparation of the PCR mix").**

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 μ l, 20-200 μ l and 100-1000 μ l)
- Disposable RNase/DNase-free tips with aerosol barriers
- Tube racks
- Vortex
- 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), DX®/CFX (Bio-Rad) and Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies™) thermal cyclers.

Other makes and models should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

The equipments 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) Specimens handling

- Collect the first morning urine into a clean, sealed container with no preservative.
- The specimens should be stored between 2 ÷ 8°C and ideally tested immediately or within 24 hours. Alternatively, the specimens should be frozen immediately upon receipt and stored up to ten days at -20°C or colder. A single freeze thaw cycle should not affect the results.

b) DNA purification

- Vortex the tube containing the swab for 5-10 seconds until the solution becomes homogeneous or resuspend the urine. Collect 200 µL of the transport media or urine.
- Samples should be purified on the same day of the collection.

For genomic DNA purification Clonit recommends to use:

- Duplica®Prep NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) with Duplica® PREP Automatic Extractor (ref. EDI001).
- GXT NA Extraction kit (BKR120802) with the GenoXtract® system (ref. DS083101)
- 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.

For **Duplica®Prep Body Fluid kit** and **Bact Extra Pure kit**, use **200µl** of the biological sample. If using the Internal Control (C2) as an Extraction/Amplification Control add **10µl** of the **C2** during the DNA purification procedure directly into the sample/lysis buffer mix. Elute in **50µl** of elution buffer.

For GXT NA Extraction kit, use **250µl** of the biological sample. If using the Internal Control (C2) as an Extraction/Amplification Control add **10µl** of the **C2** during the DNA purification procedure directly to the sample together with Proteinase K (not supplied). The use of polyA (not supplied) is optional. Elute in **50µl** of elution buffer. For all extraction methods, if using the C2 as an Extraction/Amplification Control, prepare an **Extraction Negative Control (ENC)** by using the supplied Reaction Blank (**BM**), to which the **C2** should be added similarly to all samples to be extracted. In all cases, avoid mixing the C2 directly with the sample prior to the lysis step.

The Positive Control (**C1**) does not require an extraction step and must be used directly during the amplification phase

c) Thermal cycler 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 "**Advanced Mycoplasma Genitalium Test**"; in this way 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 "**Advanced Mycoplasma Genitalium Test**".
- 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 HEX 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 internal control (C2) and FAM to the positive control (C1). 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

Thermal Profile Table (common for all the supported platforms)

TIME	TEMPERATURE	CYCLES
5 min	95 °C	1
15 sec	95 °C	X 10 Fluorescent Acquisition off
60 sec	62 °C	
15 sec	95 °C	X 45 Fluorescent Acquisition on
60 sec	52 °C	

d) PCR mix preparation

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

For each experiment prepare a PCR mix for the required number of controls and **n+1** samples. If using the C2 as an Extraction/Amplification Control (EAC), these controls include 1 Extraction Negative Control (**ENC**) and 1 Positive Control (C1). Clonit also recommends to include 1 Reaction Blank (**BM**) in every session to evaluate the presence of any contamination; in this case use directly 5µl of Reaction Blank (**BM**) provided, considering it as an extracted sample.

The mix must be prepared by mixing the reagents as indicated in the table:

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

The PCR mix has to be freshly prepared every time

After its preparation, aliquot **20µl of Master Mix** in the tubes or in the microplates well for PCR then add in each tube/well **5µl** from the **extracted DNA (or ENC)** or from **amplification controls (C+ and BM)**, 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.

Alternatively, the Internal Control (C2) can also be used as a control in the amplification phase only. In this case, extract the samples according to the specific protocol of the kit in use, as described in the paragraph "a) DNA purification", excluding the step of the addition of the C2. The internal control (C2) should be added directly to the PCR MIX, prior to the aliquotation. The reagents of the PCR mix have to be mixed as indicated in the following table:

REAGENT	VOLUME (μ l)
Amplification mix	10
Oligo mix	10
Internal Control (C2)	1
Extracted DNA without EAC	4

After its preparation, aliquot **21 μ l of Master Mix** in the tubes or in the microplates well for PCR then add in each tube/well **4 μ l** from the **extracted DNA** or from **amplification controls (C+ and BM)**, 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.

e) 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 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 positive and the signal detected by **HEX/Cy3/Yellow** fluorophore ($C_T \geq 0$) 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 negative.
- Condition in which no signal is detected indicates no DNA extraction or PCR inhibition. The sample must be repeated; a dilution 1:10 of the target DNA or complete DNA extraction is suggested.

In case the Internal Control (C2) has been used as an Extraction/Amplification Control (EAC), please be aware that:

- The Reaction Blank (**BM**) must be negative in both the **FAM/Green** and the **HEX/Cy3/Yellow** channel.
- The Positive Control (**C1**) must be positive in the **FAM/Green** channel.
- The Extraction Negative Control (**ENC**) must be negative in the **FAM/Green** channel, but positive in the **HEX/Cy3/Yellow** channel.

In case the Internal Control (C2) has been used only during amplification, adding it to the reaction mix, the signal of the HEX/Cy3/Yellow channel will also be present in the Positive Control (C1) and in the Reaction Blank (BM). For the Positive Control (C1), 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 anyway.

If all 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.

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 or in Extraction Negative Control (ENC).

Contamination during DNA Extraction and/or PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:

1. Decontaminate the working area and all instruments.
2. Pipette the controls C1 at last.
3. Repeat the DNA Extraction and 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^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* Kit

REV. EBR027032_IFU_REV.03D_ENITA

REF EBR027032- 32 test

Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' D'USO

Il **Duplica^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* Kit** è un test di amplificazione di acidi nucleici *in vitro* per la ricerca del DNA di *Mycoplasma genitalium* estratto da campioni clinici (come urina e tampone).

INTRODUZIONE

Mycoplasma genitalium (MG) è membro della famiglia dei mycoplasmi genitali, e sta emergendo come un importante agente eziologico delle infezioni a trasmissione sessuale, sia nei maschi che nelle femmine. L'avvento della reazione a catena della polimerasi e di altri metodi molecolari hanno reso gli studi su *M. genitalium* più fattibile, poiché diversamente, risulta essere un organismo difficilmente isolabile. Oltre *Chlamydia trachomatis*, *M. genitalium* è una causa importante e ormai consolidata di uretrite non gonococcica (NGU) negli uomini, ora più persistente e ricorrente che mai. Molteplici studi hanno anche dimostrato un'associazione positiva di *M. genitalium* con cervicite mucopurulento e perdite vaginali nelle donne. Dalle prove condotte emerge che *M. genitalium* sia convincente causa sia di malattie infiammatorie pelviche che di sterilità, ed inoltre da tali studi emerge che questo organismo ha il potenziale di causare infezioni crescenti. Ad oggi, in letteratura, manca la chiara associazione di vaginosi batterica causate da *M. genitalium* e gli esiti negativi della gravidanza. La diagnosi di infezioni da *M. genitalium* deve essere effettuata utilizzando esclusivamente i test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT), a causa della crescita scarsa o lenta di questi batteri in coltura.

PRINCIPIO DEL TEST

Il **Duplica^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* Kit** è un test molecolare basato sul riconoscimento del DNA di *Mycoplasma Genitalium*. Il Kit è stato disegnato per amplificare una porzione dei geni MgPa e 16S. I reagenti per la reazione di amplificazione sono pronti all'uso e suddivisi in tre mix di reazione:

- **AMPLIFICAZIONE 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 il processo di estrazione e/o di amplificazione.

Il **Duplica^{RealTime} Advanced *Mycoplasma Genitalium* 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** e 2 **controlli** oppure 5 **campioni** e 3 **controlli**.

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, Controllo positivo)	Tappo Rosso	-22÷-18	>50	1
Controllo 2 (C2, Controllo interno)**	Tappo Giallo	-22÷-18	400	1
Bianco di Reazione (BM) ***	Tappo Bianco	-22÷-18	1500	1

* la provetta deve essere conservata lontano dalla luce

** Il controllo interno (C2) può essere usato sia come controllo di estrazione/amplificazione (EAC) aggiungendolo direttamente alla miscela campione/tampone di lisi durante la procedura di estrazione del DNA (per i dettagli vedere il paragrafo "a) Purificazione del DNA" e fare riferimento al protocollo specifico del kit di estrazione) o come controllo di amplificazione aggiungendolo direttamente alla mix di PCR (per i dettagli vedere il paragrafo "c) Preparazione della PCR mix")

*** utilizzato sia nella procedura di estrazione come controllo negativo di estrazione (ENC, vedi paragrafo "a) Purificazione del DNA"), sia in amplificazione come Bianco di reazione (vedi il paragrafo "c) Preparazione della mix di PCR").

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 micropietra 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
- Vortex
- 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), RotorGene® Q (Qiagen), DX®/CFX (Bio-Rad) e Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies™).

Altre marche e modelli devono essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

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

PRECAUZIONI 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
- Scongelare 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) Gestione del campione

- Raccogliere la prima urina del mattino in un contenitore pulito e chiuso senza alcun conservante.
- I campioni devono essere conservati tra 2+8 °C e, preferibilmente, testati immediatamente o entro le 24 ore. In alternativa, i campioni devono essere congelati immediatamente dopo la ricezione e conservati fino a dieci giorni a -20 °C o a temperatura inferiore. Si consiglia un singolo ciclo di scongelamento.

b) Purificazione del DNA

- Vortexare la provetta contenente il tampone per 5-10 secondi fino a quando la soluzione diventa omogenea o risospendere l'urina. Utilizzare per l'estrazione 200 µL di terreno di trasporto o urina.
- I campioni devono essere purificati nello stesso giorno della raccolta.

Per la purificazione del DNA genomico Clonit raccomanda:

- Duplicα® Prep NA Body Fluid kit (ref. EDI004200) per Duplicα® Prep Automatic Extractor (ref. EDI001).
- GXT NA Extraction kit (BKR120802) con il sistema di estrazione GenoXtract® (ref. DS083101)
- Bact Extra Pure Kit (Ref. EDR004050) è raccomandato per l'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.

Per Duplicα NA Body Fluid kit e Bact Extra Pure kit, utilizzare 200µl del campione biologico. Se si usa il Controllo interno (C2) come controllo di estrazione/amplificazione, aggiungere 10µl di C2 durante la procedura di purificazione del DNA direttamente nella mix tampone di lisi/campione. Eluire in 50µl di tampone di eluizione.

Per GXT NA Extraction kit, utilizzare 250µl del campione biologico. Se si usa il Controllo interno (C2) come controllo di estrazione/amplificazione, aggiungere 10µl di C2 durante la procedura di purificazione del DNA direttamente al campione insieme alla Proteinasi K (non fornita). L'utilizzo del polyA (non fornito) è opzionale. Eluire in 50µl di tampone di eluizione.

Per tutti i metodi di estrazione, se si usa il C2 come controllo di estrazione/amplificazione, preparare un Controllo Negativo di Estrazione (ENC) sottoponendo a estrazione del DNA un'aliquota del Bianco di Reazione (BM) fornito, a cui va aggiunto il C2 analogamente a tutti i campioni da estrarre. In ogni caso, evitare di aggiungere il C2 direttamente nel campione prima della lisi.

Il Controllo Positivo (C1) non necessita di estrazione e va utilizzato direttamente in fase di amplificazione.

c) Programmazione del termociclatore

Importante prima dell'allestimento della corsa: Riferirsi al Manuale Utente per istruzioni dettagliate sul funzionamento del sistema e per inserire il profilo termico riportato nella tabella: **Profilo Termico**. 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 "Advanced Mycoplasma Genitalium 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 " **Advanced Mycoplasma Genitalium Test** ".
- 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*.

Piattaforma Applied Biosystems® 7500

- Selezionare *Create a New Experiment*
- Nella sezione *Experiment Properties* definire il nome e il tipo di esperimento (*Quantitation-Standard Curve*)
- Infine, impostare il tipo di tecnologia (*Taqman® Reagents*), la modalità di esecuzione (*Run Mode: 7500* o *7500 Fast*) e la velocità di ramping (*Ramp Speed: Standard*)
- Nel menu *Setup* selezionare *Run Method* e impostare il profilo termico come indicato in tabella
- Nel menu *Setup* selezionare *Plate Setup-Define Targets and Samples* per selezionare i campioni e assegnare il target VIC al controllo interno (C2) e FAM al controllo positivo (C1).
- 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*

Tabella: Profilo Termico (comune per le piattaforme)

TEMPO	TEMPERATURA	CICLI
	95 °C	1
15 sec	95 °C	X 10 Acquisizione fluorescenza off
60 sec	62 °C	
15 sec	95 °C	X 45 Acquisizione fluorescenza on
60 sec	52 °C	

d) Preparazione della PCR mix

Il volume totale della reazione è di **25 µl**.

Per ogni esperimento preparare una Mix di PCR per il numero di controlli richiesti e n+1 campioni. Se si usa il C2 come un controllo di Estrazione/Amplificazione, questi controlli includono 1 Controllo negativo di Estrazione (**ENC**) e 1 controllo positivo (**C1**). Clonit raccomanda di includere in ogni seduta anche 1 Bianco di Reazione (BM), per valutare la presenza di eventuali contaminazioni; in questo caso utilizzare 5µl di Bianco di Reazione (**BM**) fornito trattandolo come un campione estratto.

La mix deve essere preparata miscelando i reagenti come indicato in tabella:

REAGENT	VOLUME (µl)
Mix di Amplificazione	10
Oligo mix	10
DNA estratto con EAC	5

Non conservare la mix di PCR ma prepararla fresca ogni volta

Terminata la preparazione della mix, aliquotare 20µl della Master Mix nelle provette o nei pozzetti della micropiastre per PCR e aggiungere in ogni provetta/pozzetto 5µl di DNA estratto (o **ENC**) o dei controlli di amplificazione (C+ e BM); 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.

In alternativa, il Controllo interno (**C2**) può anche essere utilizzato come controllo nella sola fase di amplificazione. In tal caso, estrarre i campioni seguendo il protocollo specifico del kit in uso, come descritto nel paragrafo "a) Purificazione del DNA", con l'esclusione del passaggio dell'aggiunta del controllo interno (**C2**).

Quando si prepara la PCR Mix, il controllo interno (**C2**) deve essere aggiunto direttamente alla PCR MIX, prima dell'aliquotazione. I reagenti della mix di PCR devono essere miscelati come indicato nella tabella seguente:

REAGENT	VOLUME (µl)
Mix di Amplificazione	10
Oligo mix	10
Controllo Interno (C2)	1
DNA estratto con EAC	4

Dopo la preparazione, aliquotare 21µl di Master Mix nelle provette o nel pozzetto delle piastre per PCR, quindi aggiungere in ogni provetta/pozzetto 4 µl dal DNA estratto o dei controlli di amplificazione (**C1 e BM**), posizionare le provette o la piastra nello strumento e avviare il programma di amplificazione. Alla fine del programma rimuovere i tubi/piastra dal termociclatore.

e) 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 procedura di estrazione del DNA è fallita o la PCR è stata inibita. Il campione deve essere ripetuto; si suggerisce di effettuare una diluizione 1:10 del DNA target o di ripetere interamente la procedura di estrazione.

Se il controllo interno (C2) è stato utilizzato come Controllo di Estrazione/Amplificazione (EAC), è importante verificare che:

- Il Bianco di reazione (**BM**) deve essere negativo sia nel canale **FAM/Green** che nel canale **HEX/Cy3/Yellow**.
- Il Controllo Positivo (**C1**) deve essere positivo nel canale **FAM/Green**.
- Il Controllo Negativo di Estrazione (**ENC**) deve essere negativo nel canale **FAM/Green**, ma positivo nel canale **HEX/Cy3/Yellow**.

Nel caso in cui il Controllo interno (C2) sia stato utilizzato solo in fase di amplificazione addizionandolo alla mix di reazione, il segnale del fluoroforo HEX/Cy3/Yellow sarà presente anche nel Controllo Positivo (C1) e nel Bianco di Reazione (BM). Nel caso del controllo positivo (C1), il segnale **HEX/Cy3/Yellow** può uscire tardivamente o non uscire affatto per competizione. In questo caso la presenza del segnale **HEX/Cy3/Yellow** non è rilevante e la corsa è 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.

Tabella di 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 o nel Controllo Negativo di Estrazione (ENC).

1. Contaminazione durante la procedura di estrazione del DNA o di preparazione della mix di PCR. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare il piano di lavoro e tutti gli strumenti.
 - Manipolare il controllo positivo C1 solo alla fine.
 - Ripetere l'estrazione del DNA o 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

