

Istruzioni d'uso

ver. 8 - 04/04/2022

Biologia Molecolare

FIBROSI CISTICA

REF

AC023/25

CE



25 TEST

CND

W0106010101

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

SEDE LEGALE: Via Cascina Conighetto - UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALIA

Tel.: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

Organizzazione con Sistema di gestione qualità certificata ISO 9001 e Sistema di gestione qualità settore medicale certificato ISO 13485 (organismo di certificazione IMQ - Certificazione CSQ).

⇒ UTILIZZO

Il kit **AC023/25** fornisce il materiale necessario per l'identificazione di varianti del gene della proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) mediante amplificazione delle sequenze bersaglio, ibridazione inversa su striscia e successiva rivelazione colorimetrica.

Il kit è da utilizzare in abbinamento all'enzima di amplificazione con tappo di colore **arancione** ed identificato dal cod. NLM BA092, a cui fa seguito l'indicazione della pezzatura che può variare in funzione delle quantità di enzima fornito (es.: BA092/50, BA092/60, etc).

Il presente dispositivo è stato validato con:

- a) i kit di estrazione manuale su colonnina (cod. NLM AA1001) a partire da sangue intero, spot e tampone buccale e con i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici.
- b) gli strumenti per PCR PTC 100 (MJ Research); AB2720 e SimpliAmp (Applied Biosystems); Mastercycler (Eppendorf); MyCycler e T100 (BioRad) e strumenti equivalenti.

INTRODUZIONE

La fibrosi cistica (FC) è la malattia congenita, cronica, evolutiva, trasmessa con meccanismo autosomico recessivo più frequente nella popolazione caucasica: ne è affetto un neonato ogni 2500-2700 nati vivi. La fibrosi cistica è secondaria ad un'anomalia della **proteina** chiamata **CFTR** (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) localizzata nella membrana apicale delle cellule degli epitelii; la sua funzione è quella di regolare gli scambi idroelettrolitici.

Il gene che codifica questa proteina è stato localizzato nel 1989 sul braccio lungo del cromosoma 7. All'alterazione della proteina consegue un'anomalia del trasporto di sali che determina principalmente una produzione di secrezioni per così dire "disidratate": il sudore è molto ricco in sodio e cloro, il muco è denso e vischioso e tende ad ostruire i dotti nei quali viene a trovarsi.

La malattia coinvolge numerosi organi ed apparati: l'apparato respiratorio, dalle prime vie aeree al tessuto polmonare, il pancreas nella produzione di enzimi digestivi, il fegato, l'intestino e l'apparato riproduttivo, soprattutto nei maschi.

La malattia può manifestarsi precocemente, in età neonatale o nelle prime settimane o mesi di vita, con gravità diversa, in alcuni casi in correlazione a particolari mutazioni geniche.

Più raramente la malattia può evidenziarsi nell'età adolescenziale o adulta con quadri clinici meno gravi.

BIBLIOGRAFIA

- Cremonesi L. et al. Hum. Mutat. 1992; 1 (4):314-9
- Bonizzato A. et al. Hum. Genet. 1995; 95 (4): 397-402
- Bombieri C. et al Hum. Genet. 1998; 103 (6): 718-22
- D'Apice M.R. et al. BMC Med. Genet. 2004; 5 (1): 8
- Chillon M. et al. N. Engl. J. Med. 1995; 332: 1475-80
- Cuppens H. et al. J. Clin. Invest. 1998; 101: 487-96
- Bobadilla JL et al. Hum. Mutat. 2002; 19:575-606
- Saba L. et al. Hum Molec Genetics 1993;2 (10):1739-1740

⇒ PRINCIPIO DEL TEST

Il test si basa sul principio dell'ibridazione inversa su striscia, in base al quale sonde oligonucleotidiche specifiche immobilizzate su strisce di nitrocellulosa ibridano con amplificati biotinilati. La perfetta complementarità tra amplificati e sonda genera un segnale specifico, in seguito a rivelazione colorimetrica.

L'analisi comprende tre fasi successive:

1. isolamento del DNA da sangue non coagulato, da spot o da tampone buccale.
2. amplificazione simultanea ("multiplex") delle regioni target del DNA mediante primers biotinilati.
3. ibridazione su striscia degli amplificati biotinilati con sonde oligonucleotidiche allele-specifiche. Gli ibridi biotinilati sono successivamente rivelati sfruttando il legame biotina-streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina ed un appropriato substrato.

Il kit rileva le seguenti varianti:



F508del, I507del, F508C, I502T, 1706del17, 1677del TA, G542X, 1717-1G>A, R553X, Q552X, G551D, S549R A>C, N1303K, 4016insT, R1162X, R1158X, W1282X, G1244E, 2789+5G>A, 2183AA>G, 711+5G>A, 711+1G>T, G85E, 3849+10kbC>T, 621+1G>T, R117H, D1152H, L1065P, R1066H, L1077P, 4382delA, 1259insA, 852del22, R347P, T338I, S912X, I148T, 3199del6, Allele 5T-7T-9T.

COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

⇒ BOX A (conservazione a -25/-15°C)

Reagenti	Codice NLM	Quantità	N° Vial
PCR Mix CF 22 Mut (tappo trasparente) Soluzione contenente oligonucleotidi	KA890	1500 µl	1
PCR Mix CF16 Mut+Tn (tappo viola) Soluzione contenente oligonucleotidi	KA889	1500 µl	1

⇒ BOX B (conservazione a +2/+8°C)

Reagenti	Codice NLM	Quantità	N° Vial		
Strisce CF 22 Mut Strisce CF 16 Mut + Tn Membrane di nitrocellulosa rivestita con oligonucleotidi	-	25 25	1 1		
DNAT Soluzione denaturante contenente NaOH	 PERICOLO	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107	1,3 ml	2
Ibridazione (*) Soluzione salina contenente conservanti	 ATTENZIONE	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102	120 ml	1
Lavaggio Stringente Soluzione salina contenente detersivi e conservanti	-	-	KA928	175 ml	2
Coniugato Soluzione contenente streptavidina marcata con fosfatasi alcalina, stabilizzanti e conservanti	-	-	KA574	120 ml	1

Lavaggio B Soluzione salina contenente conservanti	-	EUH208	KA105-x	350 ml	1
Sviluppatore di colore Soluzione contenente 5-bromo-4-cloro3-indolil-fosfato e 4-nitro blu di tetrazolio	-	-	AA564	120 ml	1
Mascherina interpretativa Foglio utilizzato per individuare le bande positive su una striscia	-	-		1+1	
Collector sheet Fogli da usare per l'archiviazione delle strisce; non adatto all'interpretazione dei risultati e/o alla refertazione	-	-		1	

(*) L'esenzione dalle prescrizioni in materia di etichettatura e imballaggio è stabilita per quantità e gravità di pericolo del reagente. I criteri sono: **quantità <125 ml e categorie non gravi (rif. Regolamento (CE) N°1272/2008 - elenco 1.5.2.1.1).**

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti chiusi o aperti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati alla temperatura indicata (**BOX A -25/-15°C; BOX B +2/+8°C**).
- Alla fine di ogni seduta riporre i reagenti alla corretta temperatura.
- Tenere il kit lontano da fonti di contaminazione quali DNA amplificato.
- Le strisce sviluppate devono essere protette dall'esposizione alla luce solare e tenute a temperatura ambiente (+15/+30°C).
- La DNAT deve essere chiusa immediatamente dopo l'uso.

PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente, utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale.
- In presenza di campioni di DNA o prodotti di PCR utilizzare puntali con filtro per evitare la contaminazione delle pipette.
- Eliminare il materiale monouso utilizzato, i guanti indossati e tutti i reattivi come rifiuti speciali.
- Le vaschette possono essere riutilizzate al massimo 2 volte, se ben lavate con acqua, al termine della rivelazione.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test.
- Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Le strisce non utilizzate sono stabili fino alla data di scadenza se tenute a +2/+8°C e protette dall'esposizione alla luce.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Tenere i reagenti separati da possibili acidi nucleici contaminanti (campioni e prodotti di amplificazione).
- Si consiglia di eseguire l'analisi in tre aree separate:
 - Area 1: pre-PCR (manipolazione dei campioni ed estrazione)
 - Area 2: preparazione della Master Mix
 - Area 3: post PCR (PCR e rivelazione)
- Non utilizzare il kit se la scatola è danneggiata; contattare il fornitore.
- **E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento.**
- **Utilizzare la mascherina interpretativa inserita nel lotto specifico.**
- **Indicazioni di pericolo**
 - **H314:** Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
 - **H319:** Provoca grave irritazione oculare.
- **Consigli di prudenza**
 - **P280:** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.
 - **P301+P330+P331:** IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.
 - **P303+P361+P353:** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
 - **P305+P351+P338:** IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare
 - **P337+P313:** Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
- **Informazioni supplementari di pericolo**
 - **EUH208:** EUH208: Contiene CMIT/MIT. Può provocare una reazione allergica (pelle).



MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

AREA 1

- Kit di estrazione per DNA
- Cappa a flusso laminare verticale
- Set dedicato di pipette a volume variabile
- Provette da 1,5 ml e puntali con filtro monouso

AREA 2

- Cappa a flusso laminare verticale
- Set dedicato di pipette a volume variabile
- Puntali con filtro monouso
- Provette da 0,2 ml per PCR
- DNA polimerasi, tappo colore arancione

AREA 3

- Termociclatore validato o strumento equivalente*
- Equipaggiamento elettroforetico per gel di agarosio (opzionale)
- Bagnomaria con coperchio inclinato, agitazione (50-100 rpm) e programmabile a 41°C ± 0,5°C
- Supporti in plastica (vaschette o vassoi) per la rivelazione in manuale o automatico.
- Termometro
- Sistema di aspirazione
- Puntali e pipette dedicate
- Acqua distillata o deionizzata
- Timer
- Pinzette pulite per maneggiare le strisce

***ATTENZIONE:** in caso di utilizzo di termociclatori differenti da quelli indicati, verificare che la velocità di rampa (riscaldamento/raffreddamento) sia $\leq 3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. Per il termociclatore T100 (BioRad) utilizzare la rampa di default ($4^{\circ}\text{C}/\text{sec}$).

PROCEDIMENTO



ISOLAMENTO DEL DNA

Estrazione manuale: cod. NLM AA1001.

È possibile utilizzare qualunque altro tipo di estrazione che dia risultati analoghi di concentrazione e purificazione del DNA.

Per l'estrazione con sistemi automatici seguire le indicazioni del fornitore.

- Sangue intero

E' possibile utilizzare sangue fresco o conservato a +2/+8°C per non più di 2 giorni oppure conservato a -25/-15°C. E' raccomandato l'uso di sangue congelato poiché il congelamento e lo scongelamento facilitano la lisi delle cellule rosse del sangue.

Usare solo EDTA o citrato come anticoagulanti, non eparina.

- Spot

In alternativa è possibile eseguire l'estrazione partendo da spot di sangue su carta assorbente: prelevare dal paziente **30-50 µl** di sangue fresco facendolo assorbire sulla carta assorbente e lasciarlo essiccare (conservare i campioni spottati a +2/+8°C).

Prima di procedere con l'estrazione, stemperare con cura il bollino di sangue spottato in 400 µl di PBS in una provetta da 1,5 ml, incubare per 15 minuti a temperatura ambiente, quindi stemperare bene i tondini con un puntale per fare fuoriuscire il campione; vortexare per 15 secondi e quindi procedere all'estrazione come da metodica cod. NLM AA1001 aggiungendo di seguito i vari reattivi previsti per la lisi nella stessa provetta contenente il bollino di sangue. Al termine dell'estrazione, eluire il campione con **50 µl** di tampone AE.

In alternativa al metodo su colonnina è possibile eseguire un'estrazione rapida a partire da spot, seguendo il protocollo riportato:

- Ritagliare dallo spot 3 tondini del diametro di 5 mm ca. e metterli in una provetta da 1,5 ml
- Aggiungere 200 µl di soluzione fisiologica fresca, lasciare incubare e temperatura ambiente per 20-30 minuti e quindi stemperare bene i tondini con un puntale per fare fuoriuscire il campione; vortexare per 15 secondi.
- Incubare a 98°C per 10 min (vortexare i campioni dopo i primi 5 minuti e rimetterli subito a incubare per altri 5 minuti)
- Centrifugare a 12000 rpm per 2 min.
- Prelevare il surnatante e trasferirlo in una nuova provetta, metterlo a +2/+8°C per un uso immediato (in giornata) altrimenti conservare a -25/-15°C per un successivo utilizzo. Non scongelare e ricongelare troppe volte il campione; piuttosto suddividerlo in piccole aliquote da scongelare quando necessario.

- Tampone buccale

In alternativa è possibile eseguire l'isolamento del DNA partendo da tamponi buccali (es. Isohelix) utilizzando il cod. NLM AA1001, secondo il seguente protocollo.

Raccolta campione:

- Aprire la confezione ed estrarre il tampone buccale dalla custodia cilindrica in plastica, avendo cura di non toccare con le mani la parte terminale bianca.
- Strofinare vigorosamente la parte terminale bianca sull'interno guancia, per circa 30 secondi.
- Riporre il tampone nella custodia cilindrica in plastica e spezzare l'asta del tampone in corrispondenza dell'incisione. Qualora il campione non dovesse essere estratto in giornata, inserire all'interno della custodia cilindrica la capsula deumidificante

arancione (Isohelix): in tal modo il tampone potrà essere conservato e spedito a temperatura ambiente e la stabilità è garantita fino a 3 anni.

Estrazione:

- Stemperare il tampone in 400 µl di PBS, vortexare vigorosamente, trasferire il contenuto della provetta di partenza (ad eccezione del tampone) in una provetta da 2 ml.
- Aggiungere 25 µl di proteinasi K, vortexare per 10 secondi e incubare 10 minuti a 56°C. (NB: mettere subito il blocchetto a 70°C)
- Aggiungere 400 µl di tampone di lisi B3, vortexare vigorosamente ed incubare a 70°C per 10 minuti (nel tempo impiegato dal blocchetto per arrivare a 70°C è possibile porre direttamente le provette nel blocchetto stesso facendo partire i 10 minuti quando la temperatura è arrivata attorno a 65°C), agitando un paio di volte durante l'incubazione.
- Aggiungere 400 µl di etanolo (96-100%) ed agitare immediatamente sul vortex.
- Trasferire 600 µl di lisato sulla rispettiva colonnina precedentemente marcata, centrifugare a 11000 x g per 1 minuto ed eliminare il materiale filtrato. Riporre quindi la colonnina all'interno della stessa provetta di raccolta e ripetere la procedura fino a che tutto il lisato non è stato filtrato nella colonnina.
- Procedere con l'estrazione come da metodica NLM AA1001 (partire dal punto 9 della medesima).
- Eluire in **50 µl**.

AMPLIFICAZIONE

Mantenere le provette e tutti i reagenti per l'amplificazione in ghiaccio durante l'esecuzione dell'intera procedura.

Evitare ripetuti scongelamenti della PCR Mix.

Preparazione Master Mix

- Preparare **2 provette** da termociclatore (una per ogni PCR Mix) **per campione** e tenere le provette in ghiaccio.
- Per ogni campione preparare

Reagenti	Volume per campione
PCR Mix CF 22 MUT	44,75 µl
DNA polimerasi (5U/µl), tappo arancione	0,25 µl
Reagenti	Volume per campione
PCR Mix CF 16 MUT+Tn	44,75 µl
DNA polimerasi (5U/µl), tappo arancione	0,25 µl

- Preparare la Master Mix per il numero di campioni estratti + 1 volume (per $n \leq 10$) o + 2 volumi (per $n > 10$).
- Miscelare delicatamente e dispensare **45 µl** di Master Mix nelle provette da 0,2 ml precedentemente contrassegnate. Scartare la Master Mix avanzata.
- Aggiungere in ciascuna provetta **5 µl** del rispettivo DNA (**la concentrazione del DNA estratto da analizzare deve essere di circa 30-40 ng/µl**).

Profilo termico

- Preriscaldare il coperchio del termociclatore prima di inserire le provette.
- Posizionare le provette nel termociclatore ed impostare il seguente profilo termico:

Temperatura	Tempo	Cicli
94°C	30 sec	1
94°C	30 sec	35
54°C	30 sec	
72°C	40 sec	
72°C	10 min	1
10°C	∞	-

Mantenere gli amplificati a +2/+8°C se utilizzati in giornata, altrimenti conservarli a -25/-15°C.

Opzionale: analizzare i prodotti di amplificazione su gel di agarosio al 2% contenente un intercalante del DNA.

Mix CF 22 Mut:

ESONE		MUTAZIONE		LUNGHEZZA AMPLIFICATO
“Legacy exon”	“Exon”	Vecchia nomenclatura	Nuova nomenclatura*	
13	14	2183 AA>G	c.2051_2052delAAinsG	400 bp
Introne 19	Introne 22	3849+10kb C>T	c.3718-2477C>T**	343 bp
3	3	G85E	c.254G>A	311 bp
14b	Introne 16	2789+5 G>A	c.2657+5G>A	310 bp
20	23	W1282X	c.3846G>A	291 bp
		G1244E	c.3731G>A	
5	Introne 5	711+5 G>A	c.579+5G>A	262 bp
		711+1 G>T	c.579+1G>T	
21	24	N1303K	c.3909C>G	239 bp
		4016 insT	c.3889dupT ***	
11	12	G542X	c.1624G>T	199 bp
		1717-1 G>A	c.1585-1G>A	
		R553X	c.1657C>T	
		Q552X	c.1654C>T	
		G551D	c.1652G>A	
10	11	S549R (A>C)	c.1645A>C	171 bp
		F508 del	c.1521_1523del	
		I507del	c.1519_1521del	
		F508C	c.1523T>G	
		I502T	c.1505T>C	
		1706del17	c.1574_1590del	
1677delTA	c.1545_1546delTA			

*Human Genome Variation Society; sequenza di riferimento: NM_000492.3

** Questa mutazione è così chiamata nel CFTR Mutation Database: c.3717+12191C>T

*** Questa mutazione è così chiamata nel CFTR Mutation Database: c.3884_3885insT

Mix CF 16 Mut+Tn

ESONE		MUTAZIONE		LUNGHEZZA AMPLIFICATO
“Legacy exon”	“Exon”	Vecchia nomenclatura	Nuova nomenclatura*	
4	4	621+1 G>T	c.489+1G>T	292 bp
		R117H	c.350G>A	
		I148T	c.443T>C	
18	21	D1152H	c.3454G>C	334 bp
17b	20	L1065P	c.3194T>C	143 bp
		R1066H	c.3197G>A	
		L1077P	c.3230T>C	
24	27	4382delA	c.4251delA	240 bp
19	22	R1162X	c.3484C>T	213 bp
		R1158X	c.3472C>T	
8	9	1259insA	c.1130dupA**	270 bp
6a	6	852del22	c.720_741del	159 bp
7	8	R347P	c.1040G>C	188 bp
		T338I	c.1013C>T	
Intr 8/Es 9	Introne 9	Allele 5T	c.1210-12T[5]	270 bp
		Allele 7T	c.1210-12T[7]	
		Allele 9T	c.1210-12T[9]	
15	17	S912X	c.2735C>A	184 bp
17a	19	3199del6	c.3067_3072del	239 bp

*Human Genome Variation Society; sequenza di riferimento: NM_000492.3

** Questa mutazione è così chiamata nel CFTR Mutation Database: c.1127_1128insA

RIVELAZIONE IN AUTOMATICO

La rivelazione può essere eseguita in automatico (ProfiBlot T30/T48 o strumento equivalente), richiamando il programma **FIBROSI CISTICA**: in questo caso prevedere l'utilizzo di **25 µl di amplificato + 25 µl di DNAT** e 1,5 ml di ciascun reagente per ogni campione.

RIVELAZIONE IN MANUALE

- Regolare il livello dell'acqua nel bagnomaria in modo che raggiunga circa 2/3 dell'altezza della vaschetta.
- Impostare la temperatura a **41°C** e verificare che rientri nell'intervallo indicato ($41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) utilizzando un termometro calibrato.
- Preriscaldare l'Ibridazione ed il Lavaggio Stringente a **41°C**; assicurarsi che il precipitato eventualmente presente sia completamente sciolto prima dell'utilizzo.
- Lasciar equilibrare a temperatura ambiente il DNAT, il Coniugato, il Lavaggio B e lo Sviluppatore di colore.
- Prelevare una striscia per ciascun campione utilizzando le pinzette (non toccare mai le strip senza guanti) e contrassegnarla utilizzando la matita (non usare penne a sfera, etc).
Attenzione: non far seccare le strisce durante l'intera procedura.

Ibridazione (41°C)

- Dispensare in ciascuna vaschetta del vassoio **15 µl di DNAT**.
Attenzione: non utilizzare il DNAT se non si presenta di colore blu.
- Per ciascun campione aggiungere **15 µl di amplificato** e miscelare bene con la pipetta: la soluzione rimarrà blu.

N.B.: Per gli amplificati ottenuti con la PCR Mix CF 22 Mut devono essere utilizzate le strip CF 22 Mut, mentre con gli amplificati ottenuti con la PCR Mix CF16 Mut+Tn devono essere utilizzate le strip CF16 Mut+Tn.

- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml di Ibridazione** (preriscaldato a 41°C) ed agitare leggermente: il colore blu scompare.
- Immergere completamente ciascuna striscia nella lane della vaschetta contenente il rispettivo amplificato. Fare attenzione a mettere le strisce con le marker lines rivolte verso l'alto.
- Incubare per **45 minuti a 41 °C** nel bagnomaria mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa). Tenere il bagnomaria chiuso con un coperchio per evitare variazioni di temperatura.

Lavaggio Stringente (41°C)

- Rimuovere il vassoio dal bagnomaria; inclinarlo leggermente ed aspirare l'Ibridazione utilizzando una pipetta o un sistema di aspirazione a vuoto. Aspirare il liquido cercando di non danneggiare le strisce.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml di Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 41°C) ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 41°C).
- Incubare per **10 minuti a 41°C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
Attenzione: riporre il Lavaggio Stringente nel bagnomaria durante l'incubazione.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 41°C).
- Incubare per **10 minuti a 41°C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare la soluzione.

Sviluppo del colore (temperatura ambiente)

Tutte le successive incubazioni vengono effettuate a temperatura ambiente e con agitazione. Poiché l'acqua del bagnomaria impiega troppo tempo a scendere da 41°C alla temperatura ambiente, utilizzare la sola funzione di agitazione isolando le vaschette dall'acqua ad esempio adagiando una tavoletta di polistirolo sul coperchio del bagnomaria.

- Aggiungere **1 ml** di **Coniugato**.
- Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare il liquido, aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B** ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Sviluppatore di colore**.
- Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa) al riparo dalla luce.
- Aspirare e lavare le strisce diverse volte con acqua distillata.
- Lasciare asciugare bene le strisce su carta assorbente al riparo dalla luce prima di procedere con l'interpretazione dei risultati.

bilaterale, dei vasi deferenti. Pertanto in presenza di mutazione R117H, è opportuno valutare lo stato degli alleli Tn.

E' possibile escludere dai risultati le sonde Tn (Poly T):

- in fase di rivelazione, tagliando la striscia CF 16Mut+Tn in corrispondenza del Marker Blu, posto al disotto delle sonde wild type.
- in fase di analisi automatica, in caso di utilizzo del software cod. NLM DO018.
- In presenza di un polimorfismo diverso da quelli indagati dal dispositivo ma situato in prossimità di uno di questi, può verificarsi l'assenza di segnale sulla corrispondente sonda wild type.
- In presenza di due polimorfismi vicini tra loro sulla sequenza genica ed assenza dei due rispettivi segnali wild type, è probabile che il campione sia doppio eterozigote in trans piuttosto che omozigote per entrambe le mutazioni.

POSSIBILI PROBLEMI

SEGNALI FALSI NEGATIVI O ECCESSIVAMENTE DEBOLI

- Può essere stata aggiunta una quantità inadeguata di amplificato. La concentrazione dell'amplificato può essere troppo bassa in seguito ad un'amplificazione inefficiente.
- Segnali più deboli (tranne la banda del controllo di rivelazione) e reazioni falsamente negative possono essere causate da temperature troppo alte durante la fase di ibridazione e/o lavaggio stringente.

Controllare attentamente la temperatura del bagno termostato.

- L'ibridazione ed il Lavaggio Stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. In questo caso le soluzioni rimanenti nei flaconi devono essere eliminate. Ripetere il test usando soluzioni nuove.

SEGNALI FALSI POSITIVI

- Si possono ottenere segnali aspecifici sulla striscia se la temperatura durante la fase di ibridazione e/o Lavaggio Stringente è troppo bassa.

Controllare attentamente la temperatura del bagno termostato.

- L'ibridazione ed il Lavaggio Stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. In questo caso le soluzioni rimanenti nei flaconi devono essere eliminate. Ripetere il test usando soluzioni nuove.
- Il livello dell'acqua nel bagnomaria è troppo basso: assicurarsi che tale livello raggiunga 2/3 dell'altezza della vaschetta.
- Il coperchio del bagnomaria non è stato tenuto chiuso adeguatamente. Assicurarsi della corretta chiusura del coperchio durante le fasi a temperatura controllata
- Il Lavaggio Stringente non è alla corretta temperatura: ricordarsi di riporre il Lavaggio Stringente nel bagnomaria durante le incubazioni a **41°C**.

COLORAZIONE DISOMOGENEA DELLA SINGOLA BANDA

La velocità di agitazione durante la rivelazione è troppo bassa. Assicurarsi che le strisce siano completamente immerse nel liquido.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit “FIBROSI CISTICA”, espressa come la quantità minima di marcatore bersaglio che può essere esattamente rilevata (probabilità > 99%), è pari a 5 ng/μl di DNA.

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit “FIBROSI CISTICA” è stata valutata analizzando 70 campioni di DNA positivi per le mutazioni indagate. Per le mutazioni rare, di cui non si era in possesso di campioni umani, sono stati utilizzati campioni sintetici specifici. Il kit ha permesso di discriminarli tutti in maniera corretta, pertanto la sua sensibilità diagnostica è pari al 100%.

Specificità diagnostica

La specificità diagnostica del kit “FIBROSI CISTICA” è stata determinata analizzando 70 campioni di DNA. Non sono stati ottenuti falsi positivi. In accordo con tali dati, la specificità diagnostica del kit è pari al 100%.

Riproducibilità

INTRASAGGIO

La riproducibilità intrasaggio è stata valutata analizzando 1 campione in 40 replicati in una prima seduta e in 25 replicati in una seconda seduta per la strip a 22 mutazioni; per la strip a 16 mutazioni 1 campione è stato analizzato in 26 replicati in una prima seduta e in 25 replicati in una seconda seduta. Le diverse sedute sono state eseguite da due operatori usando due lotti distinti.












INTERSAGGIO

La riproducibilità intersaggio è stata valutata analizzando 5 campioni in 3 replicati. I replicati sono stati eseguiti da due operatori in giorni e sedute differenti, utilizzando tre diversi lotti di reagenti. La rivelazione è stata effettuata in automatico e in manuale.

I test sono stati eseguiti secondo quanto descritto in metodica e in accordo con tali dati la riproducibilità del test è pari al 100%.

ATTENZIONE

Come per ogni sistema basato su amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici è possibile che la presenza di varianti ignote nelle sequenze geniche della regione in cui sono stati disegnati i primer e/o le sonde specifiche possa dare risultati inattesi.


					
Numero di lotto	Codice	Limiti di temperatura	Usare entro	Consultare le istruzioni d'uso	Testo modificato rispetto alla precedente versione
					
Conformità europea	Prodotto da	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	Contenuto sufficiente per <x> tests	Tenere al riparo dalla luce solare	

Instructions for Use

ver. 8 - 04/04/2022

Molecular Biology

CYSTIC FIBROSIS

	AC023/25	
	25 TEST	
GMDN	59366	



 **NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.**

HEADQUARTER: Via Cascina Conighetto – BUSINESS OFFICES: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALY
Phone: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

ISO 9001 Quality Management System Organization certified and ISO 13485 Medical Sector Quality Management System certified (IMQ certification body - CSQ certification).

⇒ INTENDED USE

The **AC023/25** device provides reagents for the identification of variants in the gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), through the amplification of target sequences, reverse-hybridization and color development.

Amplification enzyme assigned: **orange** cap NLM code BA092, followed by size indication, which could change depending on enzyme quantity supplied (i.e.: BA092/50, BA092/60, etc).

This device has been validated with:

- a) manual column-based extraction (NLM code AA1001) starting from fresh blood or dried blood-spot or buccal swab and with the most common automatic systems for nucleic acids purification.
- b) PTC 100 (MJ Research); AB2720 and SimpliAmp (Applied Biosystems); Mastercycler (Eppendorf); T100 and Mycycler (BioRad) and equivalent thermal cycler instruments.

INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (FC) is the most common congenital, chronic disease that is transmitted with an autosomal-recessive mechanism in the Caucasian population: disease occurs in 1/2500-2700 among newborn alive.

Cystic Fibrosis is due to an anomaly in the CFTR protein (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) placed in the apical membrane of epithelial cells. Its function is related to the regulation of electrolytic exchange.

In 1989 the gene coding for CFTR protein was mapped on 7q chromosome (long-arm).

Alterations in the protein structure lead to problems in the salt-transport pathways with the production of dehydrated secretions.

Sweat is very rich in Na and Cl, mucus is dense and sticky and tends to obstruct ducts.

Cystic Fibrosis affects lots of organs and apparatus: respiratory apparatus, pancreas, liver and gut. In males reproductive apparatus is very often affected.

The disease could manifest very early, in neonatal age or in the first weeks/months of life with different levels of severity and, in some cases, related to particular genetic mutations.

The disease may seldom manifest in the adolescent or adult life with mild clinical profile.

REFERENCES

- Cremonesi L. et al. Hum. Mutat. 1992; 1 (4):314-9
- Bonizzato A. et al. Hum. Genet. 1995; 95 (4): 397-402
- Bombieri C. et al Hum. Genet. 1998; 103 (6): 718-22
- D'Apice M.R. et al. BMC Med. Genet. 2004; 5 (1): 8
- Chillon M. et al. N. Engl. J. Med. 1995; 332: 1475-80
- Cuppens H. et al. J. Clin. Invest. 1998; 101: 487-96
- Bobadilla JL et al. Hum. Mutat. 2002; 19:575-606
- Saba L. et al. Hum Molec Genetics 1993;2 (10):1739-1740

⇒ PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The test is based on the reverse-hybridization principle, where specific oligonucleotide probes immobilized as parallel lines on membrane-based strips hybridize with biotinylated PCR products. The exact match between probes and amplified product generates a signal exploiting the bond between biotin and streptavidin conjugated with alkaline phosphatase and a subsequent color developer.

The analysis consists of three steps:

1. DNA extraction from non-coagulated blood, from dried blood-spot or buccal swab.
2. PCR of target DNA sequences using biotinylated primers.
3. Hybridization of the amplification products with the oligonucleotide probes and colorimetric detection.

The device allows simultaneous detection of the following gene variants:




F508del, I507del, F508C, I502T, 1706del17, 1677del TA, G542X, 1717-1G>A, R553X, Q552X, G551D, S549R A>C, N1303K, 4016insT, R1162X, R1158X, W1282X, G1244E, 2789+5G>A, 2183AA>G, 711+5G>A, 711+1G>T, G85E, 3849+10kbC>T, 621+1G>T, R117H, D1152H, L1065P, R1066H, L1077P, 4382delA, 1259insA, 852del22, R347P, T338I, S912X, I148T, 3199del6, Allele 5T-7T-9T.

PRODUCT COMPOSITION

⇒ BOX A (store at -25/-15°C)

Reagents	NLM Code	Quantity	N° Vial
PCR Mix CF 22 Mut (transparent cap) Solution containing oligonucleotides	KA890	1500 µl	1
PCR Mix CF 16 Mut+Tn (violet cap) Solution containing oligonucleotides	KA889	1500 µl	1

⇒ BOX B (store at +2/+8°C)

Reagents		NLM Code	Quantity	N° Vial
Strips CF 22 Mut Strips CF 16 Mut + Tn Nitrocellulose membranes coated with oligonucleotides		-	25 25	1 1
DNAT Denaturation solution containing NaOH	 DANGER	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	1,3 ml	2
Hybridization (*) Saline Solution containing preservatives	 WARNING	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	120 ml	1
Stringent Wash Solution Saline solution containing detergent ad preservatives	-	-	175 ml	2
Conjugate Solution containing streptavidin labeled with alkaline phosphatase, stabilizers and preservatives	-	-	120 ml	1
Wash Solution B Saline Solution containing preservatives	-	EUH208	350 ml	1

Color developer Solution containing 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and 4-Nitroblue tetrazolium	-	-	AA564	120 ml	1
Transparent interpretation card	-	-		1+1	
Collector sheet For strip storage, not suitable for results interpretation and/or as medical report	-	-		1	

(*) The exemption from the requirements for labeling of packages is determined by quantity and severity of hazardous reagent. The criteria are: **amounts <125 ml and not serious hazard categories (ref. Regulation (EC) N° 1272/2008 - list 1.5.2.1.1).**

STABILITY AND STORAGE

- All opened or unopened reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at the correct temperature (**BOX A -25/-15°C; BOX B +2/+8°C**).
- At the end of each assay store reagents at the appropriate temperature.
- The kit should be kept isolated from any source of contaminating DNA, especially amplified products.
- Developed dry strips should be stored in the dark at room temperature (+15/+30°C).
- The vial containing the DNAT should be closed immediately after use.

PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should use this kit. Handle this product according to established good laboratory practices and universal precautions; wear personal protective apparel.
- When handling DNA samples or amplification products, use aerosol-resistant pipette tips to avoid pipettes contamination.
- Discard used materials as bio hazardous waste.
- Plastic trays can be reused maximum twice, if washed with water at the end of detection.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled.
- If skin or mucous membrane exposure occurs, immediately wash the area with copious amount of water. Seek medical advice.
- Do not use components beyond the expiration date.
- Test strips stored at +2/+8°C in the dark are stable until the expiry date.
- Do not mix reagents from different lots.
- Reagents have to be preserved separated from possible contaminants (as DNA samples and amplification products).
- It is recommended to work in three separated areas:
 - Area 1: pre-PCR (samples handling and extraction)
 - Area 2: Master Mix preparation
 - Area 3: post-PCR (amplification and detection)
- Don't use the device if the box is damaged; contact the supplier.
- **It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the correct working.**
- **Use the transparent interpretation card of the specific lot.**
- **Hazard statements**
 - **H314:** Causes severe skin burns and eye damage.
 - **H319:** Causes serious eye irritation.
- **Precautionary statements**
 - **P280:** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 - **P301+P330+P331:** IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
 - **P303+P361+P353:** IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.
 - **P305+P351+P338:** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing
 - **P337+P313:** If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
- **Supplemental hazard informations**
 - **EUH208:** It Contains CMIT/MIT. May cause allergic reaction (skin).



MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

AREA 1

- DNA Extraction Kit
- Vertical downflow air box
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Aerosol-resistant pipettes tips and disposable 1,5 ml tubes

AREA 2

- Vertical downflow air box
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Aerosol-resistant pipettes tips
- 0,2 ml PCR tubes
- DNA polymerase with orange cap

AREA 3

- Validated thermal cycler or equivalent instrument*
- Agarose gel electrophoresis equipment (optional)
- Water bath with inclined lid, shaking platform (50-100 rpm) and adjustable temperature ($41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$)
- Plastic supports (trays) for manual or automatic detection
- Thermometer
- Vacuum aspiration apparatus
- Dedicated adjustable volume pipettes set and tips
- Deionized or distilled water
- Timer
- Clean tweezers to handle strips

* **WARNING:** if thermal cyclers different from those mentioned above are used, verify that the ramp rate (heating/cooling) is $\leq 3^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. For T100 (BioRad) use default ramp setting ($4^{\circ}\text{C}/\text{sec}$).

PROCEDURE

⇒ DNA EXTRACTION

Manual purification: NLM code AA1001.

Any other type of DNA extraction with similar results of concentration and purification can be used.

For extraction with automatic systems follow the specific manufacturer's IFUs.

- Blood

It is possible to use fresh blood, blood stored at +2/+8°C for no more than 2 days or stored at -25/-15°C for longer storage periods. The use of frozen blood is recommended since freezing and thawing enhance blood cells lysis.

Use EDTA or citrate only as anticoagulant, do not use heparin.

- Spot

It is possible to extract DNA from **dried blood-spot**: deposit **30-50 µl** of fresh blood on absorbent-paper sheet. Let dry up the spot and store at +2/+8°C.

Dissolve accurately the dried blood spot in 400 µl of PBS in a 1.5 ml tube and incubate for 15 min at room temperature; squeeze it well with a tip and vortex for 15 sec; then proceed with the extraction protocol of NLM code AA1001 in the same tube with the spot. Perform the elution step with **50 µl** Buffer AE.

It is possible to execute a rapid extraction from dried blood spot, following this protocol:

- Place three 5 mm punched-out circles from a dried blood spot into a 1,5ml microcentrifuge tube.
- Add 200µl of fresh physiologic solution; incubate at room temperature for 20-30 min and squeeze it well with a tip; mix by vortexing for 15 sec
- Incubate at 98°C for 10 min. (after 5 minutes incubation time mix once by vortexing)
- Centrifuge at 12000 rpm for 2 min.
- Put the supernatant in a clean tube and store at +2/+8°C for an immediate use or at -25/-15°C for longer periods. Do not freeze and thaw the sample too many times; it is advisable to divide the sample into smaller aliquots for repetitive uses.

- Buccal swab

Alternatively, DNA isolation can be performed starting from buccal swab (Isohelix), using the NLM code AA1001 device, according to the following protocol.

Sample collection

- Open the package and remove the buccal swab from the cylindrical plastic case, taking care not to touch the white end part with your hands.
- To collect buccal cells, vigorously scrape the inside of each cheek for about 30 seconds.
- Place the swab in the cylindrical plastic case and break off the swab at the incision. If the sample is not processed within the same day, insert the orange dehumidifying capsule (Isohelix) inside the collection tube: in this way the swab can be stored and shipped at room temperature and stability is guaranteed for up to 3 years.

DNA purification

- To proceed with the extraction add 400 µl of PBS to the collection tube, vortex vigorously and transfer all the liquid phase in a 2 ml tube.
- Add 25 µl of proteinase K, vortex for 10 seconds and incubate 10 minutes at 56°C. Immediately put the incubator at 70°C)
- Add 400 µl of Lysis Buffer B3, vortex vigorously and incubate at 70°C for 10 minutes, vortex twice during the incubation (in the time taken by the block to reach 70°C, it is

possible to put the tubes directly in the block itself, starting to count 10 minutes of incubation when the temperature reaches at least 65°C).

- Add 400 µl of ethanol (96-100%) and vortex immediately.
- Transfer 600 µl of lysate to the respective previously marked spin column (AA1001). Centrifuge at 11000 xg for 1 minute and discard the filtered material.
- Place the spin column into the same collecting tube and repeat the procedure until all the lysate has been filtered through the column.
- Proceed with the DNA purification according to NLM code AA1001 method, starting from point 9 of the procedure.
- Elution volume: **50 µl**.

AMPLIFICATION

Keep all the reagents for the amplification on ice during the execution of the whole procedure.

Avoid repeated freeze-thaw cycles of the PCR Mix

Master Mix preparation

- Prepare **2 reaction tubes** (one tube for each PCR Mix) for each sample to be amplified.
- For each sample prepare 2 final PCR reaction mix on ice as follows :

Reagents	Volume/sample
PCR Mix CF 22Mut	44,75 µl
DNA polymerase (5U/µl), orange cap	0,25 µl
Reagents	Volume/sample
PCR Mix CF 16Mut+Tn	44,75 µl
DNA polymerase (5U/µl), orange cap	0,25 µl

- Prepare the Master Mix for the number of samples extracted + 1 more volume (if “n” ≤ 10) or + 2 more volumes (if “n” >10).
- Mix gently and dispense **45 µl** of Master Mix in the previously marked 0,2 ml test tubes.
- Add **5 µl** of extracted DNA to each tube and mix pipetting up and down (**DNA concentration to be used should be 30-40 ng/µl**).

Amplification program

- Preheat the thermal cycler lid.
- Put reaction tubes in the thermal cycler and run the following amplification program:

Temperature	Time	Cycles
94°C	30 sec	1
94°C	30 sec	35
54°C	30 sec	
72°C	40 sec	
72°C	10 min	1
10°C	∞	-

Keep PCR products at + 2/+8°C if detection is done in the same day, or store them at -25/-15°C.

Optional: analyze amplification products by 2% agarose gel containing a DNA intercalating agent.

Mix CF 22 Mut:

EXON		MUTATION		AMPLIFICATION LENGTH
“Legacy exon”	“Exon”	Old nomenclature	New nomenclature*	
13	14	2183 AA>G	c.2051_2052delAAinsG	400 bp
Introne 19	Introne 22	3849 +10kb C>T	c.3718-2477C>T**	343 bp
3	3	G85E	c.254G>A	311 bp
14b	Introne 16	2789+5 G>A	c.2657+5G>A	310 bp
20	23	W1282X	c.3846G>A	291 bp
		G1244E	c.3731G>A	
5	Introne 5	711+5 G>A	c.579+5G>A	262 bp
		711+1 G>T	c.579+1G>T	
21	24	N1303K	c.3909C>G	239 bp
		4016insT	c.3889dupT ***	
11	12	G542X	c.1624G>T	199 bp
		1717-1 G>A	c.1585-1G>A	
		R553X	c.1657C>T	
		Q552X	c.1654C>T	
		G551D	c.1652G>A	
		S549R (A>C)	c.1645A>C	
10	11	F508del	c.1521_1523del	171 bp
		I507del	c.1519_1521del	
		F508C	c.1523T>G	
		I502T	c.1505T>C	
		1706del17	c.1574_1590del	
		1677delTA	c.1545_1546del	

*Human Genome Variation Society; reference sequence: NM_000492.3

** This mutation is mentioned in this way in CFTR Mutation Database: c.3717+12191C>T

*** This mutation is mentioned in this way in CFTR Mutation Database: c.3884_3885insT

Mix CF 16Mut+Tn

EXON		MUTATION		AMPLIFICATION LENGTH
“Legacy exon”	“Exon”	Old nomenclature	New nomenclature*	
4	4	621+1 G>T	c.489+1G>T	292 bp
		R117H	c.350G>A	
		I148T	c.443T>C	
18	21	D1152H	c.3454G>C	334 bp
17b	20	L1065P	c.3194T>C	143 bp
		R1066H	c.3197G>A	
		L1077P	c.3230T>C	
24	27	4382delA	c.4251delA	240 bp
19	22	R1162X	c.3484C>T	213 bp
		R1158X	c.3472C>T	
8	9	1259insA	c.1130dupA**	270 bp
6a	6	852del22	c.720_741del	159 bp
7	8	R347P	c.1040G>C	188 bp
		T338I	c.1013C>T	
Intr8/Ex9	Intron 9	Allele 5T	c.1210-12T[5]	270 bp
		Allele 7T	c.1210-12T[7]	
		Allele 9T	c.1210-12T[9]	
15	17	S912X	c.2735C>A	184 bp
17a	19	3199del6	c.3067_3072del	239 bp

*Human Genome Variation Society; reference sequence: NM_000492.3

** This mutation is mentioned in this way in CFTR Mutation Database: c.1127_1128insA

AUTOMATIC DETECTION

Detection can be performed by using automatic instrument (ProfiBlot T30/T48 or similar instrument): select the **Cystic Fibrosis** program. In this case **25 µl PCR product + 25 µl DNAT** and 1,5 ml of each reagent should be used for each sample.

MANUAL DETECTION

- Adjust the water level of the shaking bath to approx. 2/3 of the height of the Plastic Tray.
- Heat the water bath to **41°C** and check the temperature ($41 \pm 0,5^\circ\text{C}$) using a calibrated thermometer.
- Pre-warm the Hybridization and Stringent Wash Solution to **41°C**; all crystals should be completely dissolved.
- Allow DNAT, Conjugate, Wash Solution B and Color developer to reach room temperature.
- Remove one strip for each sample using clean tweezers (touch strips with gloves only). Label strips with a pencil (do not use ballpoint pen, markers, etc).
Warning: do not allow the strips to dry during the whole procedure.

Hybridization (41 °C)

- Pipette **15 µl** of **DNAT** into each lane of the Plastic Tray
Warning: do not use DNAT if is not blue.
- For each sample add **15 µl** of **amplification** product to the corresponding drop of DNAT. Mix thoroughly with a pipette (solution will remain blue).

Note: Strips CF 22 Mut have to be used with amplification products obtained with PCR Mix CF 22 MUT and Strips CF 16 Mut+Tn with amplification products obtained with PCR Mix CF 16 Mut+Tn.

- Incubate **5 min** at room temperature.
- Add **1 ml** of **Hybridization** (pre-warmed to 41°C) to each sample and mix gently: blue color disappears.
- Place strips into the respective lanes with marker lines facing up. Submerge completely.
- Incubate for **45 min** at **41°C** in the shaking water bath (about 50 rpm). Keep the water bath closed to avoid temperature variations.

Stringent Wash solution (41°C)

- After hybridization step remove the tray from the water bath; angle the tray upwards and aspirate the solution from each lane using a pipette or a vacuum aspiration apparatus, without touching the strip surface to avoid its damage.
- Add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 41°C) to each lane and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 41°C).
- Incubate **10 min** at **41°C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
Warning: put Stringent Wash solution back in the water bath during incubation
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 41°C).
- Incubate **10 min** at **41°C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
- Remove the solution from each lane.

Color development (room temperature)

All the next steps have to be performed at room temperature with shaking. Since water takes too much time to reach room temperature, place a tray (for example of polystyrene) on the lid of the water bath to isolate the Plastic Trays from the hot water and use the agitation function of the water bath only.

- Add **1 ml** of **Conjugate**.
- Incubate **20 minutes** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution, add **1 ml** of **Wash solution B** and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Color developer**.
- Incubate for **20 min** in the dark, while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove color developer and wash strips with distilled water.
- Let strips dry in the dark on absorbent paper before proceeding with the interpretation of results.

RESULTS INTERPRETATION

The strip scheme below shows the position of the different probes on the strip. A line is considered positive when a purple band appears at the end of the detection. To identify the genotype of a sample analyze each strip with the help of the transparent interpretation card. In order to correctly align strip and transparent interpretation card, colored marker lines on the top and on the bottom have to be used.

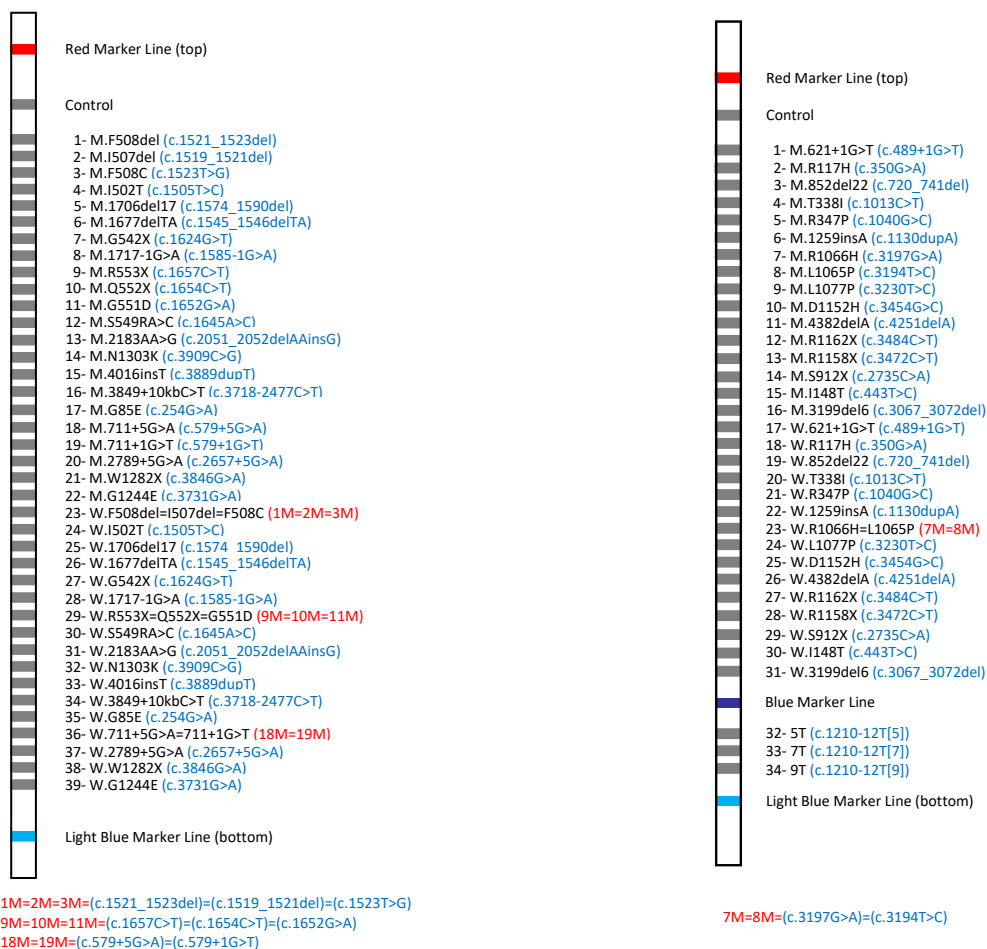
For each mutation (**except Tn**) one of the following patterns should be obtained:

- Only wild type line Normal genotype (**homozygous wild type**)
- Wild Type and Mutant lines **Heterozigous** genotype
- Only mutant line **Homozygous mutant** genotype

STRIPS SCHEME

Strip 1: CF 22Mut

Strip 2: CF 16Mut+Tn



Warning:

- the colour intensity could be different between different bands on the same strip but this doesn't affect the interpretation of the results.
- The detection control line (the upper one) indicates the correct reaction of both conjugate and colour developer: it **always** has to stain positive.
- **Tn**: the last 3 bands located on the strip 2 recognize 5T, 7T and 9T alleles (poly-T sequence). Nomenclature derives by the number of thymine-residues present in the sequence.
7T and 9T alleles generate a normal-transcript, while 5T allele is responsible for an abnormal transcript. The 5T allele with R117H is related to CBAVD (Congenital Bilateral

Absence Vas Deferens), resulting in risk factor for male infertility. If R117H is detected, combinations with the alleles Tn results should also be considered.

Tn probes (Poly-T) can be excluded from the results:

- during detection step, cutting CF 16Mut + Tn strip at the Blue Marker line placed below the wild type probes.
- during automatic analysis process, using software NLM code DO018.
- In case of a polymorphism different from those investigated by the device but located close to one of these, the absence of signal on the corresponding wild-type probe may occur.
- In case of two polymorphisms close together on the gene sequence and the absence of the two respective wild type signals, the sample could be considered as double heterozygote arranged in the trans configuration rather than homozygous for both mutations.

TROUBLESHOOTING

FALSE NEGATIVE OR LOW SIGNALS

- A wrong amount of amplification product has been used. PCR products concentration could be too low due to an inefficient amplification.
- Low signals (except Control Line) and false negative results could be caused by too high temperature during hybridization and/or Stringent Wash Solution steps.

Check carefully water bath temperature

- Hybridization and Stringent Wash Solution have not been well pre-warmed or mixed. Discard remaining reagents and repeat tests with new solutions.

FALSE POSITIVE SIGNALS

- Non-specific signals could be caused by too low temperature during hybridization and/or Stringent Wash Solution step.

Check carefully water bath temperature

- Hybridization and Stringent Wash Solution have not been well pre-warmed or mixed. Discard remaining reagents and repeat tests with new solutions.
- Water level of the water bath is too low: be sure that level reaches approximately 2/3 of the height of the Plastic Tray.
- Check carefully the water bath lid during the Hybridization or Stringent Wash Solution, keep it closed.
- Keep Stringent Wash Solution in the water bath during the incubation steps at **41°C**

SINGLE LINE UNHOMOGENEOUS COLORATION

Shaking rate during detection steps is too low. Check that strips are totally submerged.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the kit "CYSTIC FIBROSIS", expressed as the minimum quantity of the target that can be detected (Probability > 99%), is 5 ng/μl of DNA.

Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the kit "CYSTIC FIBROSIS" was assessed by analyzing 70 DNA sample positive for the mutations investigated by the kit. For rare mutations, in case of lack of human samples, a specific synthetic DNA was used.

All samples were correctly genotyped, resulting in a diagnostic sensitivity of 100%.

Diagnostic specificity

The diagnostic specificity was determined by analyzing 70 samples. No false positive results were obtained. In agreement with these data, the diagnostic specificity is 100%.

Reproducibility

INTRA-ASSAY

The intra-assay reproducibility was evaluated by using 1 sample in 40 replicates in the first run and in 25 replicates in a second run for 22 Mut strip; for 16 Mut strip 1 sample was evaluated in 26 replicates in the first run and in 25 replicates in a second run. Two different operators tested the replicates using two batch lots.

INTER-ASSAY

The inter-assay reproducibility was evaluated by using 5 samples in 3 replicates. Two different operators tested several replicates in different runs and days, using three lots of reagents. For strips development both manual and automatic systems were used.

Tests were performed as described in the method and the reproducibility was 100%.

WARNING

As every system based on amplification and detection of nucleic acids, it is possible to have unexpected results in the presence of unknown genetic mutation in the primer and/or probe specific target regions.

