

Istruzioni d'uso

ver. 6 - 04/04/2022

Biologia Molecolare

SCREENING TROMBOFILICO 3 MUTAZIONI

REF

AC082

CE



25 TEST

CND

W01060102

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 **AC082** fornisce il materiale necessario per l'identificazione delle mutazioni coinvolte nelle patologie trombofiliche (Fattore V G1691A, Fattore II G20210A e MTHFR C677T) 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 e con i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici.
- b) gli strumenti per PCR PTC 100 (MJ Research); AB2720 (Applied Biosystems); Mastercycler (Eppendorf); MyCycler, T100™ (BioRad).

INTRODUZIONE

Le trombosi venose sono tra le tre malattie cardiovascolari più comuni, coinvolgendo circa 1 individuo su 1000 ogni anno. Il rischio trombotico è determinato sia da fattori ambientali (età, interventi chirurgici, gravidanza, contraccezione orale) sia da una predisposizione genetica. Mentre la maggior parte dei difetti genetici conosciuti nella cascata coagulativa (proteina S, proteina C, antitrombina III) è rara, la mutazione G>A in posizione 1691 nel gene per il fattore di coagulazione V (FV Leiden – R506Q) è stata trovata con un'alta frequenza (20-60%) nei pazienti affetti da trombosi.

Altre due mutazioni puntiformi, una a carico della metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR C677T) e una a carico della regione 3' non tradotta del gene della protrombina (Fattore II G20210A) sono state associate rispettivamente ad una riduzione dell'attività enzimatica della MTHFR e ad un elevato livello di protrombina nel plasma. Ciascuna di queste varianti, in associazione alla variante Leiden del Fattore V, determina un aumento del rischio relativo al tromboembolismo venoso.

BIBLIOGRAFIA

- Bernardi F. et al. Blood 1997 Aug 15; 90(4): 1552-7
- Bertina et al. Nature 1994(369): 64-67
- Castaman G. et al. Br J Haematol 1997 Nov; 99(2): 257-61
- Castoldi E. et al. Blood 2000 Aug 15; 96(4): 1443-8
- Cattaneo et al. Art, Thromb and Vasc Biology 1997 (17): 1662-1666
- De Stefano et al. Blood 1998 (91): 3562-3565
- Doggen et al. Circulation 1998 (97): 1037-1041
- Faioni E.M. et al. Blood 1999 Nov 1; 94(9): 3062-6
- Finan et al. Am. J. Hematol. 2002 (71-4): 300-305
- Gemmati et al. Haematologica 1999 (84): 824-828
- Poort et al. Blood 1996 (88): 3698-3703
- Wald et al. BMJ 2002 (325): 1202-1208

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 (fare riferimento al paragrafo *Isolamento del DNA*);
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 3 mutazioni nell'ordine riportato:

- FATTORE V Leiden G1691A (R506Q)
- FATTORE II G20210A (PROTROMBINA)
- MTHFR C677T

COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

⇒ BOX A (conservazione a -25/-15°C)

Reagenti	Codice NLM	Quantità	N° Vial
PCR Mix Soluzione contenente oligonucleotidi	KA819	1600 µl	1

⇒ BOX B (conservazione a +2/+8°C)

Reagenti		Codice NLM	Quantità	N° Vial	
Strisce Membrana di nitrocellulosa rivestita con oligonucleotidi		-	KC012	25	1
DNAT Soluzione denaturante contenente NaOH	 PERICOLO	H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107	1 ml	1
Ibridazione (*) Soluzione salina contenente conservanti	 ATTENZIONE	H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102	60 ml	1
Lavaggio A Soluzione salina contenente detergenti e conservanti	-	-	KA103	170 ml	1
Coniugato Soluzione contenente streptavidina marcata con fosfatasi alcalina, stabilizzanti e conservanti	-	-	KA574	60 ml	1
Lavaggio B Soluzione salina contenente conservanti	-	EUH208	KA105-x	170 ml	1
Sviluppatore di colore Soluzione contenente 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e 4-nitro blu di tetrazolio	-	-	AA564	60 ml	1
Mascherina interpretativa Foglio utilizzato per individuare le bande positive su una striscia	-	-		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:** 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 45°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 T100TM (BioRad) utilizzare una velocità di rampa pari a $2,5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$.

PROCEDIMENTO

ISOLAMENTO DEL DNA

Estrazione manuale: cod. NLM AA1001.

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

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

Usare solo EDTA o citrato come anticoagulanti, non eparina. 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.

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

Reagenti	Volume per campione
PCR Mix	47,25 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 **47,5 µl** di Master Mix nelle provette da 0,2 ml precedentemente contrassegnate. Scartare la Master Mix avanzata.
- Aggiungere in ciascuna provetta **2,5 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
95°C	30 sec	1
95°C	15 sec	35
60°C	30 sec	
72°C	45 sec	
72°C	2 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.

Mutazione	Lunghezza amplificato (bp)
Fattore V G1691A	146
Fattore II G20210A	207
MTHFR C677T	182

RIVELAZIONE IN AUTOMATICO

La rivelazione può essere eseguita in automatico (ProfiBlot T30/T48 o strumento equivalente), richiamando il programma “**COAGUL 5**”: in questo caso prevedere l'utilizzo di **30 µl di amplificato + 30 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 **45°C** e verificare che rientri nell'intervallo indicato ($45 \pm 0,5^\circ\text{C}$) utilizzando un termometro calibrato.
- Preriscaldare l'Ibridazione ed il Lavaggio A a **45°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 una matita (non usare penne a sfera, etc).

Attenzione: non far seccare le strisce durante l'intera procedura.

Ibridazione (45°C)

- Dispensare in ciascuna posizione della vaschetta **20 µl di DNAT**.
Attenzione: non utilizzare il DNAT se non si presenta di colore blu.
- Per ciascun campione aggiungere **20 µl di amplificato** e miscelare bene con la pipetta: la soluzione rimarrà blu.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml di Ibridazione** (preriscaldata a 45°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 **30 minuti a 45°C** nel bagnomaria mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa). Tenere il bagnomaria chiuso con un coperchio per evitare variazioni di temperatura.

Lavaggio A (45°C)

- Rimuovere la vaschetta dal bagnomaria; inclinarla 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 A** (preriscaldato a 45°C) ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio A** (preriscaldato a 45°C).
- Incubare per **10 minuti a 45°C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
Attenzione: riporre il Lavaggio A nel bagnomaria durante l'incubazione.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml di Lavaggio A** (preriscaldato a 45°C).
- Incubare per **10 minuti a 45°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 45 °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.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Lo schema qui di seguito illustra la posizione delle diverse sonde sulla striscia.

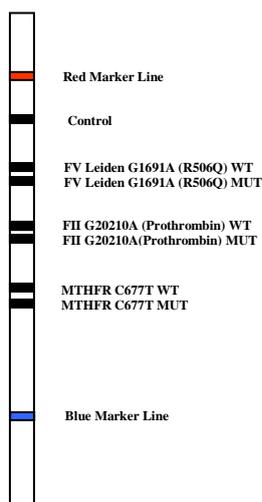
Una banda viene considerata positiva quando si colora di viola alla fine della procedura.

Per determinare il genotipo di un campione, analizzare ogni striscia con l'aiuto della mascherina interpretativa. Le linee colorate (marker lines) servono da guida per il corretto allineamento tra striscia e mascherina interpretativa.

Attenzione:

- le intensità di colorazione delle diverse bande positive presenti sulla stessa striscia possono essere diverse. Questo non influisce sull'interpretazione dei risultati.
- Una reazione positiva della banda di controllo indica il corretto funzionamento del coniugato e dello sviluppatore del colore. Questa banda deve **sempre** essere positiva.

Schema striscia:



N.B.: l'intensità di colorazione delle diverse bande presenti sulla stessa striscia può differire. Questo non influisce sull'interpretazione dei risultati.

Per ogni mutazione si può ottenere uno dei seguenti modelli di reattività:

- solo la sonda wild type genotipo normale (**omozigote wild type**)
- sonda wild type e sonda mutata genotipo **eterozigote**
- solo la sonda mutata genotipo **omozigote mutato**

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 A.

Controllare attentamente la temperatura del bagno termostato.

- L'ibridazione ed il Lavaggio A 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 A è troppo bassa.

Controllare attentamente la temperatura del bagno termostato.

- L'ibridazione ed il Lavaggio A 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 A non è alla corretta temperatura: ricordarsi di riporre il Lavaggio A nel bagnomaria durante le incubazioni a **45°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 "Screening Trombofilico 3 Mutazioni", espressa come la quantità minima di marcatore bersaglio che può essere esattamente rilevata, è pari a 5 ng/μl di DNA.

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit "Screening Trombofilico 3 Mutazioni" è stata valutata analizzando 61 campioni di DNA positivi per le mutazioni indagate dal kit.

Il kit ha permesso di discriminarli in maniera corretta, pertanto la sensibilità diagnostica è pari al 100%.

Specificità diagnostica

La specificità del kit "Screening Trombofilico 3 Mutazioni" è stata determinata analizzando 61 campioni. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi. In accordo con tali dati la specificità del kit è pari al 100%.

Riproducibilità:

INTRASAGGIO:

La riproducibilità intrasaggio è stata valutata analizzando 1 campione in 31 replicati nella stessa seduta e 5 campioni in 20 replicati in una seconda seduta. Due diversi operatori testano i replicati usando due diversi lotti.

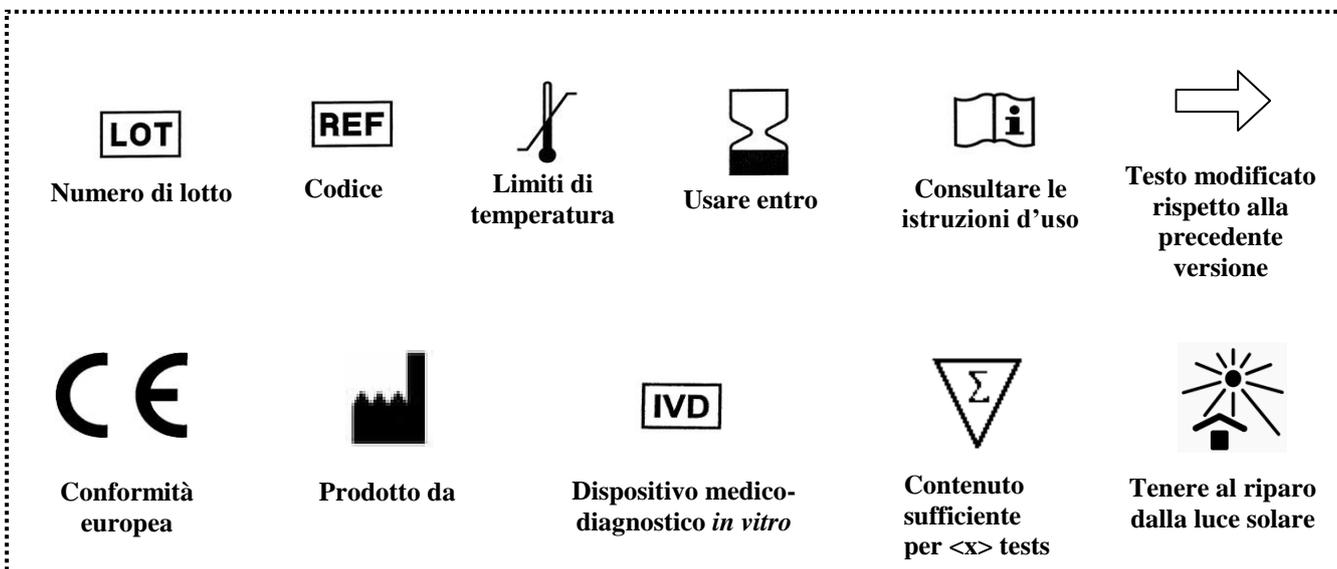
INTERSAGGIO:

La riproducibilità intersaggio è stata testata analizzando 3 campioni in 4 replicati in sedute indipendenti tra loro. La rivelazione è stata fatta in automatico e in manuale.

I test sono stati eseguiti secondo quanto descritto in metodica e la riproducibilità è stata del 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.



Instructions for Use

ver.6 - 04/04/2022

Molecular Biology

SCREENING TEST FOR THROMBOPHILIC DISEASE 3 MUTATIONS

	AC082	
	25 TEST	
GMDN	59586	



 **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 **AC082** device provides reagents for the identification of gene mutations involved in thrombophilic diseases (Factor V G1691A, Factor II G20210A; MTHFR C677T) 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 and with the most common automatic systems for nucleic acids purification.
- b) PTC 100 (MJ Research); 2720 (Applied Biosystems), Mastercycler (Eppendorf); T100TM and Mycycler (BioRad) thermal cycler instruments.

INTRODUCTION

Venous thrombosis is among the most common cardiovascular diseases, affecting about 1 in every 1000 people each year. Thrombotic risk is determined both by environmental factors (age, surgery, pregnancy, oral contraception) and genetic predisposition. While most of known genetic defects within the blood coagulation cascade (protein S, protein C, antithrombin III) is rare, a G>A mutation at nucleotide position 1691 in the gene for coagulation factor V (FV Leiden – R506Q) is found frequently (20-60%) in patients affected by thrombosis. Two further point mutations in methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR C677T) and 3'-untranslated region of the prothrombin gene (Factor II G20210A) have been reported to be associated respectively to a decreased enzymatic activity of the MTHFR protein and a higher plasma prothrombin level. Each of these variants, in association with Factor V Leiden R506Q, can lead to increased risk of venous thrombosis.

REFERENCES

- Bernardi F. et al. Blood 1997 Aug 15; 90(4): 1552-7
- Bertina et al. Nature 1994(369): 64-67
- Castaman G. et al. Br J Haematol 1997 Nov; 99(2): 257-61
- Castoldi E. et al. Blood 2000 Aug 15; 96(4): 1443-8
- Cattaneo et al. Art, Thromb and Vasc Biology 1997 (17): 1662-1666
- De Stefano et al. Blood 1998 (91): 3562-3565
- Doggen et al. Circulation 1998 (97): 1037-1041
- Faioni E.M. et al. Blood 1999 Nov 1; 94(9): 3062-6
- Finan et al. Am. J. Hematol. 2002 (71-4): 300-305
- Gemmati et al. Haematologica 1999 (84): 824-828
- Poort et al. Blood 1996 (88): 3698-3703
- Wald et al. BMJ 2002 (325): 1202-1208

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 (see the procedure in the following *Extraction* paragraph)
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 3 mutations in the following order:

- FACTOR V Leiden G1691A (R506Q)
- FACTOR II G20210A (PROTHROMBIN)
- MTHFR C677T

PRODUCT COMPOSITION

⇒ BOX A (store at -25/-15°C)

Reagents	NLM Code	Quantity	N° Vial
PCR Mix Solution containing oligonucleotides	KA819	1600 µl	1

⇒ BOX B (store at +2/+8°C)

Reagents	NLM Code	Quantity	N° Vial		
Strips Nitrocellulose membrane coated with oligonucleotides	 -	KC012	25	1	
DNAT Denaturation solution containing NaOH	 DANGER H314, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338	KA107	1 ml	1	
Hybridization (*) Saline Solution containing preservatives	 WARNING H319, EUH208, P280, P305+P351+P338, P337+P313	KA102	60 ml	1	
Wash Solution A Saline solution containing detergent ad preservatives	-	-	KA103	170 ml	1
Conjugate Solution containing streptavidin labeled with alkaline phosphatase, stabilizers and preservatives	-	-	KA574	60 ml	1
Wash Solution B Saline Solution containing preservatives	-	EUH208	KA105-x	170 ml	1

Color developer Solution containing 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and 4-Nitroblue tetrazolium	-	-	AA564	60 ml	1
Transparent interpretation card	-	-		1	
Collector sheet For strip storage, not suitable for results interpretation and/or as medical report	-	-		1	

(*) The exemption from the requirements for labeling and packaging is determined by quantity and severity of danger reagent. The criteria are: **amounts <125 ml and categories not serious (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 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 (45°C ± 0,5 °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 T100TM (BioRad) the ramp rate is 2,5^o C/sec.

PROCEDURE

DNA EXTRACTION

Manual purification: NLM code AA1001.

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

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

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

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

Reagents	Volume/sample
PCR Mix	47,25 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 **47,5 µl** of Master Mix in the previously marked 0,2 ml test tubes. Discard the remaining Master Mix.
- Add **2,5 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
95°C	30 sec	1
95°C	15 sec	35
60°C	30 sec	
72°C	45 sec	
72°C	2 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 an intercalating DNA agent.

Mutation	Amplicon Length (bp)
Factor V G1691A	146
Factor II G20210A	207
MTHFR C677T	182

AUTOMATIC DETECTION

Detection can be performed by using automatic instrument (ProfiBlot T30/T48 or similar instrument): select the **“COAGUL 5”** program. In this case **30 µl PCR product + 30 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 45°C and check the temperature (45 ± 0,5°C) using a calibrated thermometer.
- Pre-warm the Hybridization and A Wash Solution to 45°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 (45°C)

- Pipette **20 µl** of **DNAT** into each lane of the Plastic Tray
Warning: do not use DNAT if is not blue.
- For each sample add **20 µl** of **amplification** product to the corresponding drop of DNAT. Mix thoroughly with a pipette (solution will remain blue).
- Incubate **5 min** at room temperature.
- Add **1 ml** of **Hybridization** (pre-warmed to 45°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 **30 min** at **45°C** in the shaking water bath (about 50 rpm). Keep the water bath closed to avoid temperature variations.

A Wash solution (45°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 **A Wash solution** (pre-warmed at 45°C) to each lane and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **A Wash solution** (pre-warmed at 45 °C).
- Incubate **10 min** at **45°C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
Warning: put A Wash solution back in the water bath during incubation
- Remove the solution and add **1 ml** of **A Wash solution** (pre-warmed at 45°C).
- Incubate **10 min** at **45°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.

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 A Wash Solution steps.

Check carefully water bath temperature

- Hybridization and A 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 A Wash Solution step

Check carefully water bath temperature

- Hybridization and A 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 A Wash Solution, keep it closed.
- Keep A Wash Solution in the water bath during the incubation steps at **45°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 " Screening test for thrombophilic disease 3 Mutations ", expressed as the minimum quantity of the target that can be detected, is 5 ng/µl of DNA.

Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the kit " Screening test for thrombophilic disease 3 Mutations ", was assessed by analyzing 61 DNA sample positive for the mutations investigated by the kit. All samples were correctly genotyped, resulting in a diagnostic sensitivity of 100%.

Diagnostic specificity

The diagnostic specificity was determined by analyzing 61 samples. No false positive results were obtained. In agreement with these data, the kit specificity is 100%.

Reproducibility

INTRA-ASSAY

The intra-assay reproducibility was evaluated using 1 sample in 31 replicates in the same run and 5 samples in 20 replicates in a second run. Two different operators tested the replicates using two batch lots.

INTER-ASSAY

The inter-assay reproducibility was tested using 3 samples in 4 replicates independent seats between them. For strips development both manual and automatic system were used.

Tests were performed as described in the instruction for use 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.

