

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit
REV: EBR161100_IFU_REV.01D_ENITA

REF: EBR161100- 100 tests

Instructions For Use

INTENDED USE

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit is a multiplex Real Time PCR test for the qualitative detection of *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis* (TV) and *Mycoplasma genitalium* (MG) in the urogenital swabs, urine, prostatic liquid and other biological materials.

INTRODUCTION

STDs (Sexually Transmitted Diseases) refer to a variety of bacterial, viral and parasitic infections that are acquired through sexual activity. Some STDs, such as syphilis and gonorrhea, have been known for centuries while others, such as HIV, have been identified only in the past few decades. STDs are caused by more than 25 infectious organisms. As more organisms are identified, the number of STDs continues to expand. Common STDs include: chlamydia, gonorrhea, herpes, HIV, HPV, syphilis, mycoplasma, gardnerella and trichomoniasis.

The development of tests based on nucleic acid amplification technology has been the most important advance in the field of STD diagnosis. Because nucleic acid amplification is exquisitely sensitive and highly specific, it offers the opportunity to use noninvasive sampling techniques to screen for infections in asymptomatic individuals who would not ordinarily seek clinical care.

PRINCIPLE OF THE TEST

Bacterial DNA is extracted from the specimens, amplified and detected by Real Time PCR using fluorescent reporter dye probes specific for *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *T.vaginalis* and *M.genitalium*.

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit is a qualitative test that takes advantage of Hot Start PCR, in order to reduce frequency of non specifically primed reaction, and contains the Extraction Amplification Control (EAC). EAC must be used in the extraction procedure in order to control the extraction process of each individual sample and to identify possible reaction inhibition.

REAGENTS PROVIDED

Reagent	Box	Storage (Range, °C)	Volume (ml)	Quantity (tubes)
Amplification Mix (AM)	A	-30 ÷ -16	0,6	1
Taq polymerase (TAQ)	A	-30 ÷ -16	0,06	1
Oligo Mix (OM)*	B	2 ÷ 8	1,1	1
Positive Control (C+)	B	2 ÷ 8	0,2	1
Reaction Blank (BM)	B	2 ÷ 8	0,5	1
Extraction Negative Control (ENC)**	B	2 ÷ 8	1,2	1
Extraction Amplification Control (EAC)***	B	2 ÷ 8	1,0	1

* **store the tube far from light**

** *must be used in the extraction procedure as Negative Control of Extraction and treated as a sample.*

*** *add 10µl of Extraction Amplification Control (EAC) during the DNA extraction procedure directly to the sample/lysis buffer mixture (see herein at the paragraph "DNA purification" and refer to specific kit's protocol).*

STORAGE AND HANDLING

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit can be shipped at **2 ÷ 8°C**.

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit components are to be stored as follow:

BOX A (AM, TAQ) at **-30 ÷ -16 °C**

BOX B (OM, ENC, BM, EAC, C+) at **2 ÷ 8°C**

The shelf life of reagents before and after the first use is the same, unless otherwise stated.

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit is stable up to the expiry date indicated on the kit label. Exposure to light, heat or humidity may affect the shelf life of some components of the kit and should be avoided. Avoid repeated thawing and freezing, as this may reduce the sensitivity of the kit.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Extraction kit for DNA purification (refer to specific handbook's section)
- Transport medium
- Disposable powder-free gloves and laboratory coat
- Variable volumes pipettes (5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Disposable DNase/RNase-free tips with aerosol barriers
- Tube racks
- Vortex mixer/desktop centrifuge
- PCR box
- Disposable optical polypropylene tubes for Real Time PCR
- Refrigerator
- Deep-freezer
- Thermal cycler for Real Time PCR Rotor-Gene[®] 6000/Q (Corbett Research, Qiagen)

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

QUALITY CONTROL

In accordance with EuroClone Diagnostica's ISO-9001 and ISO-13485-Certified Quality Management System, each lot is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

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, Euroclone Diagnostica 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 part of the 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 of the product (MSDS, available on request)
- The kit reagents, individual protective equipments, used materials, biological samples and test residuals must be disposed of according to local regulations
- Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis

OPERATING PROCEDURE

a) Sample collection, storage and transport

Sampling of biological materials for PCR analysis, transportation, and storage are described in details in the handbook of the manufacturer. It is recommended that this handbook is read before beginning of the work.

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit can analyze DNA extracted from:

- *cervical, conjunctival and urethral swabs*: insert the swab into the DNase/RNase-free 1,5 ml tube and add 0,2 ml of Transport medium. Vigorously agitate swabs in medium for 15-20 sec;
- *urine sediment*: collect 10-20 ml of first-catch urine in a sterile container. Centrifuge for 30 min at 3000 x g, carefully discard the supernatant and leave about 200 µl of solution. Resuspend the sediment. Use the suspension for the DNA extraction;

- *prostatic liquid* stored in "Eppendorf" tube;
- *seminal liquid*: transfer about 30 µl of seminal liquid to a polypropylene tube (1,5 ml) and add 70 µl of sterile saline solution.

It is recommended to process samples immediately after collection. Store samples at 2 ÷ 8°C for no longer than 24 hours, or freeze at -30 ÷ -16 C. Transportation of clinical specimens must comply with country, federal, state and local regulations for the transport of etiologic agents.

b) DNA purification

EuroClone Diagnostica recommends to use Duplicα EasyBind DNA1 kit (ref. EDR005050) for manual purification. Other extraction reagents and methods should be fully tested and evaluated for optimal performance by the user before reporting results.

Add **10 µl** of **Extraction Amplification Control** (EAC) during the DNA isolation procedure directly to the sample/lysis buffer mixture.

c) Thermal Cycler setup

Refer to the specific handbook of the equipment used to set the Thermal Profile.

We recommend to switch on the instrument, and to set the thermal profile before preparing the reaction mix.

Thermal Profile

Step	Temperature, °C	Time	Repeats
Hold	95	15 min	1
Cycling 1	95	5 s	5
	60	20 s	
	72	15 s	
Cycling 2	95	5 s	40
	60	20 s <i>Fluorescence acquisition</i>	
	72	15 s	

Fluorescence is detected at the second step of Cycling 2 stage (60°C) in Green, Yellow, Orange, Crimson and Red fluorescence channels

d) Preparation of PCR mix

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

Thaw Amplification Mix (AM) before mixing.

For each experiment prepare a Reaction Mix considering 2 controls (**ENC** and **C+**), 1 Reaction Blank (**BM**) and **n+1** samples.

The reagents have to be mixed as indicated in the table below:

REAGENT	VOLUME (µl)
Oligo Mix (OM)	10
Amplification Mix (AM)	5
Taq Polymerase (TAQ)	0,5

The PCR Mix has to be freshly prepared every time

Vortex and centrifuge for 2-3 sec.

After its preparation, aliquot **15 µl** of **Reaction Mix** in the tubes, then add **10 µl** of **extracted DNA** (or **ENC, BM, C+**) sample to appropriate tube. Mix by pipetting. Place the tubes in the instrument and start the program of amplification.

e) Instrument settings

Rotor-Gene® 6000/Q

Make the adjustment of the fluorescence channel sensitivity:

1. *Channel Setup* → *Gain Optimisation* → *Auto Gain Optimisation Setup* → *Optimise Acquiring* and select *Perform Optimisation Before 1st Acquisition*
2. For *Green* channel indicate *Min Reading 5, Max Reading 10*
3. For *Yellow, Orange, Red, Crimson* channels *Min Reading 4, Max Reading 8*
4. In the column *Tube position* program position of the tubes in the carousel of the Rotor-Gene
The first position must contains reaction tube with reagents
5. Close the window *Auto Gain Calibration Setup*

f) ANALYSIS and INTERPRETATION of RESULTS

- **Neisseria gonorrhoeae** DNA is detected on the **Green** channel,
- **Chlamydia trachomatis** DNA is detected on the **Yellow** channel,
- **Mycoplasma genitalium** DNA is detected on the **Orange** channel,
- **Trichomonas vaginalis** DNA is detected on the **Crimson** channel,
- **Extraction Amplification Control (EAC)** is detected on the **Red** channel.

The results are interpreted with the software of **Rotor-Gene®** through the presence of crossing of fluorescence curve with the threshold line:

1. Press *Analysis* then select button *Quantitation*.
2. Perform the operation for the channel **Green** (*Cycling A.Green*), then refer to the **Settings Table** for the channels **Yellow** (*Cycling A.Yellow*), **Orange** (*Cycling A.Orange*), **Red** (*Cycling A.Red*) and **Crimson** (*Cycling A.Crimson*)

2.1. Data analysis of *Neisseria gonorrhoeae* DNA

- Select **Green** channel window.
- Select the **Dynamic tube** in the main window menu.
- In **CT Calculation** menu set **Threshold = 0,1**.
- Select **Outlier Removal** button and type **0** in the text field.
- The C_T (Threshold cycle) values for each sample in channel will be shown in the results grid.

Settings Table

	<i>C.trachomatis</i> DNA	<i>M.genitalium</i> DNA	<i>T.vaginalis</i> DNA	Extraction/Amplification Control (EAC)
Channel Window	<i>Yellow</i>	<i>Orange</i>	<i>Crimson</i>	<i>Red</i>
Dynamic Tube	<i>On</i>	<i>On</i>	<i>On</i>	<i>On</i>
Threshold in CT calculation	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,07</i>
Outlier Removal	<i>5</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>5</i>

The results of the analysis are reliable only if the results obtained for both Positive and Negative Controls are correct. Refer to the here below **Run Validation** table.

Run Validation

Control	Stage for control	C_T Green	C_T Yellow	C_T Orange	C_T Crimson	C_T Red	Interpretation
ENC	DNA isolation	Neg	Neg	Neg	Neg	<33	Valid result
BM	Amplification	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Valid result
C+	Amplification	<35	<35	<35	<35	<33	Valid result

If the above conditions have been met the run is valid and it is possible to analyze the data, refer to following instructions:

1. The sample is considered to be **positive** for ***Neisseria gonorrhoeae*** if its C_T value is defined (the fluorescence curve crosses the threshold line) in the **Green** channel.
2. The sample is considered to be **positive** for ***Chlamydia trachomatis*** if its C_T value is defined (the fluorescence curve crosses the threshold line) in the **Yellow** channel.
3. The sample is considered to be **positive** for ***Mycoplasma genitalium*** if its C_T value is defined (the fluorescence curve crosses the threshold line) in the **Orange** channel.
4. The sample is considered to be **positive** for ***Trichomonas vaginalis*** if its C_T value is defined (the fluorescence curve crosses the threshold line) in the **Crimson** channel.
5. The sample is considered to be **negative** for ***Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*** if its C_T value is not defined (the fluorescence curve does not cross the threshold line) in Green, Yellow, Orange and Crimson channels and the C_T value does not exceed the boundary value in the Red channel ($C_t < 33$).

QUALITY CONTROL PROCEDURE

A defined quantity of Extraction Amplification Control (EAC) is introduced at the beginning of sample preparation procedure in order to control the extraction process of each individual sample and to identify possible reaction inhibition.

Extraction Negative Control (ENC), Reaction Blank (BM), Positive Control (C+) are required for every run to verify that the specimen preparation, the amplification and the detection steps are performed correctly.

If the controls are out of their expected range (see **Run Validation** table), all specimens and controls from that run must be processed again beginning from the sample preparation step.

PERFORMANCE

Sensitivity

The analytical sensitivity for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Trichomonas vaginalis* DNA is not less than 5×10^2 Genome Equivalents per 1 ml of sample (GE/ml).

The analytical sensitivity of each microorganism does not change even if three other microorganisms are present at high concentrations.

Specificity

The analytical specificity of **Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit** is ensured by selection of specific primers and probes as well as stringent reaction conditions. The primers and probes were checked for possible homologies to all sequences published in gene banks by sequence comparison analysis. The clinical specificity of **Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit** was confirmed in laboratory clinical trials.

TROUBLESHOOTING

Problem 1: Weak or no signal of the Extraction Amplification Control (EAC) in the Red channel.

1. The PCR was inhibited:
 - Make sure that you use a recommended DNA extraction method and follow to the manufacturer's instructions
 - Centrifuge for 2 min at maximum speed the extracted DNA and take carefully the supernatant for the PCR; sorbent present in the pellet inhibits the PCR reaction.
2. The reagents storage conditions didn't comply with the instructions:
 - Check the storage conditions.
3. Improper DNA extraction:
 - Repeat analysis starting from the DNA extraction stage.
4. The PCR conditions didn't comply with the instructions:
 - Check the PCR conditions and select for the the Extraction Amplification Control detection the fluorescence channel reported in the protocol.
5. The Extraction Amplification Control was not added to the sample during the pipetting of reagents:
 - Make attention during the DNA extraction procedure.

Problem 2: Weak or no signal of the Positive Control (C+).

1. The PCR conditions didn't comply with the instructions:
 - Check the amplification protocol and select the fluorescence channel reported in the manual.

Problem 3: Any signal with Extraction Negative Control (ENC) except for Red channel.

1. Contamination during DNA extraction procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate all surfaces and instruments with sodium hypochlorite (0,5%) and ethanol (70%) or special DNA decontamination reagents
 - Use only filter tips during the extraction procedure. Change tips between tubes
 - Repeat the DNA extraction with the new set of reagents.

Problem 4: Any signal with Reaction Blank (BM).

1. Contamination during PCR preparation procedure. All samples results are INVALID:
 - Decontaminate all surfaces and instruments with sodium hypochlorite (0,5%) and ethanol (70%) or special DNA decontamination reagents
 - Pipette the Positive control at last
 - Repeat the PCR preparation with the new set of reagents.

Problem 5: Fluorescence intensity varies.

1. The PCR Master Mix is not well prepared:
 - Carefully repeat the PCR preparation procedure
2. Air bubbles trapped in the PCR tubes:
 - Check the presence of air bubbles before starting a new run.

Problem 6: Absence of any fluorescent signal.

1. Verify the performance of the thermalcycler:
 - Calibrate the equipment.
2. Deterioration of dyes and/or primers. The storage conditions didn't comply with the instructions:
 - Check the storage conditions

- Check the expiry date of the kit.

Problem 7: The thermalcycler gives an error message.

1. Refer to the Real Time PCR instrument user manual or contact the local technical support.

REFERENCES (see pag. 12/12)

"THE PURCHASE OF THIS PRODUCT GRANTS THE PURCHASER RIGHTS UNDER CERTAIN ROCHE PATENTS TO USE IT SOLELY FOR PROVIDING HUMAN IN VITRO DIAGNOSTIC SERVICES. NO GENERAL PATENT OR OTHER LICENSE OF ANY KIND OTHER THAN THIS SPECIFIC RIGHT OF USE FROM PURCHASE IS GRANTED HEREBY"



Istruzioni Per l'Uso

FINALITA' D'USO

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit è un test multiplex basato sulla Real Time PCR per la rilevazione qualitativa del DNA batterico di *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Chlamydia trachomatis* (GC), *Trichomonas vaginalis* (TV) e *Mycoplasma genitalium* (MG) in tamponi urogenitali, urine, liquido prostatico e altri campioni clinici.

INTRODUZIONE

Le STD (Sexually Transmitted Diseases - malattie sessualmente trasmissibili) comprendono una vasta gamma di infezioni batteriche, virali e parassitarie che possono essere acquisite durante l'attività sessuale. Alcune malattie a trasmissione sessuale, come la sifilide e la gonorrea, sono note da secoli, mentre altre, come l'HIV, sono state individuate solo negli ultimi decenni. Le STD sono causate da più di 25 microrganismi infettivi. Il numero delle STD è in continua espansione e ciò è dovuto all'identificazione di nuovi patogeni. Tra le malattie sessualmente trasmissibili le più comuni troviamo: clamidia, gonorrea, herpes, HIV, HPV, sifilide, micoplasma, gardnerella e le tricomoniasi.

Lo sviluppo di test basati sulla tecnologia PCR ha permesso un importante avanzamento nel campo della diagnosi STD. L'amplificazione degli acidi nucleici è un processo altamente sensibile e specifico e offre quindi la possibilità di utilizzare tecniche di campionamento non invasive per lo screening di infezioni a carico di individui asintomatici normalmente non in cura.

PRINCIPIO DEL TEST

Il DNA batterico viene estratto dai campioni biologici, amplificato e rilevato mediante Real Time PCR sfruttando sonde fluorescenti specifiche per *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, *T.vaginalis* e *M.genitalium*.

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit è un test qualitativo che sfrutta la Hot Start PCR, in modo da ridurre la possibilità di amplificazioni non specifiche, e include un Controllo di Estrazione/Amplificazione (Extraction Amplification Control, EAC). EAC deve essere usato in fase di estrazione in modo da controllare il processo estrattivo di ogni campione e individuare eventuali inibitori della PCR.

COMPOSIZIONE DEL KIT

Reagente	Box	Conservazione (Range, °C)	Volume (ml)	Quantità (tubes)
Amplification Mix (AM)	A	-30 ÷ -16	0,6	1
Taq polymerase (TAQ)	A	-30 ÷ -16	0,06	1
Oligo Mix (OM)*	B	2 ÷ 8	1,1	1
Controllo Positivo (C+)	B	2 ÷ 8	0,2	1
Bianco di Reazione (BM)	B	2 ÷ 8	0,5	1
Controllo Negativo di Estrazione (ENC)**	B	2 ÷ 8	1,2	1
Controllo Estrazione/Amplificazione (EAC)***	B	2 ÷ 8	1,0	1

* **tenere al riparo dalla luce**

** *deve essere utilizzato nella procedura di estrazione come controllo negativo di estrazione e trattato come un campione.*

*** *aggiungere 10µl di Controllo di Estrazione/Amplificazione (EAC) durante la procedura di estrazione del DNA direttamente alla mix campione/tampone di lisi (per i dettagli consultare il paragrafo "Estrazione del DNA" e fare riferimento al protocollo relativo al kit specifico).*

CONSERVAZIONE E STABILITA'

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit è spedito a **2÷8°C**.

I reagenti presenti nel **Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit** devono essere così conservati:

BOX A (AM, TAQ) a **-30 ÷ -16°C**

BOX B (OM, ENC, BM, EAC, C+) a **2÷ 8°C**

Se non diversamente indicato, la durata di conservazione dei reagenti prima o dopo l'uso è la medesima.

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. L'esposizione alla luce, calore o umidità può influenzare la durata di alcuni componenti del kit e deve essere quindi evitata. Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento di questi reagenti dovrebbero essere evitati per non ridurre la sensibilità.

MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO

- Kit per estrazione del DNA (fare riferimento alla sezione specifica del relativo manuale d'uso)
- Liquido di trasporto (transport medium)
- Guanti senza polvere usa e getta e camice da laboratorio
- Micropipette (5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali con filtro DNase/RNase-free
- Rack per tubi
- Vortex mixer/Centrifuga da banco
- PCR box
- Tubi in polipropilene per Real Time PCR
- Frigorifero
- Congelatore
- Termociclatore per Real Time PCR Rotor-Gene[®] 6000/Q (Corbett Research, Qiagen).

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

CONTROLLO DI QUALITA'

In conformità con le norme ISO-9001 e ISO-13485 secondo cui il Sistema di Gestione della Qualità di Euroclone Diagnostica è certificato, ogni lotto è testato verso specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto.

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
- Euroclone Diagnostica 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%
- Usare guanti senza talco ed evitare di lasciare impronte sulle parti ottiche dei tubi
- 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) Raccolta, stoccaggio e trasporto dei campioni

La manipolazione di materiali biologici per l'analisi di PCR, il trasporto e lo stoccaggio sono descritti in dettaglio nei manuali del produttore. Si raccomanda di leggere i manuali prima di iniziare.

Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit è in grado di analizzare il DNA isolato da:

- *Tamponi uretrali, congiuntivali e cervicali*: inserire il tampone nei tubi DNase/RNase free da 1,5 ml e aggiungere 0,2 ml di transport medium. Agitare il tampone energicamente per circa 15-20 sec;
- *Sedimento urinario*: raccogliere 10-20 ml del primo mitto in un contenitore sterile. Centrifugare per 30 min a 3000xg, eliminare con attenzione il supernatante lasciandone circa 200µl in cui risiede il sedimento. Utilizzare la sospensione così ottenuta per l'estrazione del DNA;

- *Liquido prostatico* conservato in un tubo tipo "Eppendorf";
- *Liquido seminale*: trasferire circa 30µl di liquido seminale in un tubo di polipropilene (1,5 ml) e aggiungere 70µl di soluzione salina sterile.

Si raccomanda di trattare i campioni immediatamente dopo il prelievo. Conservare i campioni a 2÷8°C per non più di 24 ore, o congelare a -30 ÷ -16°C. Il trasporto dei campioni clinici deve essere conforme alle normative nazionali e locali per il trasporto di agenti eziologici.

b) Purificazione del DNA

EuroClone Diagnostica raccomanda di usare il kit DUPLIC α EasyBind DNA1 kit (ref. EDR005050) per la purificazione manuale. Altri reagenti e metodi di estrazione dovrebbero essere pienamente testati e valutati per prestazioni ottimali da parte dell'utente prima di refertare i risultati.

Aggiungere **10µl** del **Controllo di Estrazione/Amplificazione (EAC)** durante la procedura di purificazione del DNA direttamente nella mix tampone di lisi/campione.

c) Programmazione del termociclatore

Si raccomanda di consultare il manuale specifico dello strumento per impostare il Profilo Termico.

Si consiglia di accendere lo strumento e impostare il profilo termico prima di preparare la miscela di reazione.

Profilo Termico

Step	Temperatura °C	Tempo	Ripetizioni
Hold	95	15 min	1
Cycling 1	95	5 s	5
	60	20 s	
	72	15 s	
Cycling 2	95	5 s	40
	60	20 s <i>Acquisizione fluorescenza</i>	
	72	15 s	

La fluorescenza viene acquisita a livello del secondo step dello stadio Cycling 2 (60°C) nei canali di fluorescenza Green, Yellow, Orange, Crimson e Red.

d) Preparazione della mix di PCR

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

Scongela accuratamente la Amplification Mix (AM) prima di preparare la miscela di reazione.

Per ogni esperimento preparare la Miscela di Reazione considerando 2 controlli (**ENC** e **C+**), 1 Bianco di Reazione (**BM**) e **n+1** campioni.

I reagenti devono essere miscelati come indicato in tabella:

REAGENTE	VOLUME (µl)
Oligo Mix (OM)	10
Amplification Mix (AM)	5
Taq Polymerase (TAQ)	0,5

Non conservare le Mix di PCR ma prepararle fresche ogni volta

Vortexare e centrifugare per 2-3 sec.

Terminata la preparazione della mix, aliquotare **15 µl** di **Miscela di Reazione** nelle provette, aggiungere poi **10 µl** di **DNA estratto dai campioni** (oppure **ENC, BM, C+**) alla provetta corrispondente. Mescolare bene. Mettere i tubi nel termociclatore e avviare il programma.

e) Impostazione del termociclatore

Rotor-Gene® 6000/Q

Impostare le regolazioni della sensibilità dei canali di fluorescenza:

1. *Channel Setup* → *Gain Optimisation* → *Auto Gain Optimisation Setup* → *Optimise Acquiring* e selezionare *Perform Optimisation Before 1st Acquisition*
2. Per il canale *Green* indicare *Min Reading 5*, *Max Reading 10*
3. Per i canali *Yellow, Orange, Red, Crimson* indicare *Min Reading 4*, *Max Reading 8*.
4. Nella colonna *Tube position* indicare le posizioni dei tubi nel rotore del Rotor-Gene
Nella prima posizione deve essere posto un tubo contenente i reagenti
5. Chiudere la finestra *Auto Gain Calibration Setup*

f) ANALISI e INTERPRETAZIONE dei RISULTATI

- Il DNA di ***Neisseria gonorrhoeae*** è rilevato nel canale **Green**
- Il DNA di ***Chlamydia trachomatis*** è rilevato nel canale **Yellow**
- Il DNA di ***Mycoplasma genitalium*** è rilevato nel canale **Orange**
- Il DNA di ***Trichomonas vaginalis*** è rilevato nel canale **Crimson**
- Il **Controllo di Estrazione/Amplificazione (EAC)** è rilevato nel canale **Red**.

I risultati vengono interpretati dal software del **Rotor-Gene®** in base alla presenza o assenza di intersecazione delle curve di fluorescenza con la linea di threshold:

1. Premere *Analysis*, poi selezionare *Quantitation*.
2. Effettuare le seguenti operazioni per il canale **Green** (*Cycling A.Green*), poi riferirsi alla **Tabella dei Settings** per i canali **Yellow** (*Cycling A.Yellow*), **Orange** (*Cycling A.Orange*), **Red** (*Cycling A.Red*) e **Crimson** (*Cycling A.Crimson*)

2.1. Analisi dei dati per *Neisseria gonorrhoeae* DNA

- Selezionare la finestra del canale **Green**.
- Attivare le funzioni **Dynamic tube** nel menu principale della finestra.
- Nel menù **CT Calculation** impostare **Threshold = 0,1**.
- Selezionare la funzione **Outlier Removal** e scrivere **0** nel campo %.
- Nella tabella dei risultati per questo canale è mostrato il valore di C_T (Threshold cycle) per ogni campione.

Tabella dei Settings

	<i>C.trachomatis</i> DNA	<i>M.genitalium</i> DNA	<i>T.vaginalis</i> DNA	Extraction/Amplification Control (EAC)
Channel Window	<i>Yellow</i>	<i>Orange</i>	<i>Crimson</i>	<i>Red</i>
Dynamic Tube	<i>On</i>	<i>On</i>	<i>On</i>	<i>On</i>
Threshold in CT calculation	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,07</i>
Outlier Removal	<i>5</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>5</i>

I risultati delle analisi sono da ritenersi affidabili soltanto se i segnali dei Controlli Positivo e Negativo sono corretti. Fare riferimento alla tabella **Validazione della Corsa**

Validazione della Corsa

Controllo	Passaggio per il controllo	C_T Green	C_T Yellow	C_T Orange	C_T Crimson	C_T Red	Interpretazione
ENC	Estrazione DNA	Neg	Neg	Neg	Neg	<33	Risultato Valido
BM	Amplificazione	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Risultato Valido
C+	Amplificazione	<35	<35	<35	<35	<33	Risultato Valido

Se le condizioni di cui sopra vengono soddisfatte, la corsa è valida ed è possibile analizzare i dati seguendo le istruzioni riportate di seguito:

1. Il campione è considerato **positivo** per ***Neisseria gonorrhoeae*** se nel canale **Green** è assegnato un valore di C_T (la curva di fluorescenza attraversa la linea di threshold nella sua fase esponenziale).
2. Il campione è considerato **positivo** per ***Chlamydia trachomatis*** se nel canale **Yellow** è assegnato un valore di C_T (la curva di fluorescenza attraversa la linea di threshold nella sua fase esponenziale).
3. Il campione è considerato **positivo** per ***Mycoplasma genitalium*** se nel canale **Orange** è assegnato un valore di C_T (la curva di fluorescenza attraversa la linea di threshold nella sua fase esponenziale).
4. Il campione è considerato **positivo** per ***Trichomonas vaginalis*** se nel canale **Crimson** è assegnato un valore di C_T (la curva di fluorescenza attraversa la linea di threshold nella sua fase esponenziale).
5. Il campione è considerato **negativo** per ***Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* e *Trichomonas vaginalis*** se non è definito un valore di C_T (la curva di fluorescenza non attraversa la linea di threshold nella sua fase esponenziale) nei canali Green, Yellow, Orange e Crimson e il valore di C_T definito nel canale **Red** ($C_t < 33$).

PROCEDURA DI CONTROLLO DI QUALITÀ

Una quantità definita di Controllo di Estrazione/Amplificazione (EAC) viene aggiunta a ciascun campione all'inizio della procedura di preparazione del campione al fine di controllarne il processo di estrazione singolarmente e identificare possibili inibitori della reazione di PCR.

Il Controllo Negativo di Estrazione/Amplificazione (ENC), il Bianco di Reazione (BM) e il Controllo Positivo (C+) sono necessari in ogni corsa per verificare che la corretta esecuzione di tutte le fasi (preparazione del campione, l'amplificazione e rilevamento).

Se i controlli sono fuori dal range previsto (vedi tabella **Validazione della Corsa**), tutti i campioni e i controlli devono essere preparati nuovamente.

PRESTAZIONI

Sensibilità

La sensibilità analitica per il DNA di *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e *Mycoplasma genitalium* è non meno di 5×10^2 Genomi Equivalenti per 1 ml di campione (GE/ml).

La sensibilità analitica per ogni microorganismo non varia anche se altri tre microrganismi sono presenti in alta concentrazione.

Specificità

La specificità analitica di **Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit** è assicurata dalla selezione dei primer e sonde specifiche nonché dalla rigorose condizioni di reazione. I primer e le sonde sono stati analizzati per escludere possibili omologie tramite sequence comparison partendo da diverse banche di geni con sequenze pubblicate.

La specificità analitica di **Duplica^{RealTime} GC/CT/TV/MG Kit** è stata confermata tramite sperimentazione clinica in laboratorio.

TROUBLESHOOTING

Problema 1: Segnale debole o assente del Controllo di Estrazione/Amplificazione (EAC) nel canale Red.

1. La PCR è stata inibita:
 - Assicurarsi di utilizzare un metodo di estrazione del DNA validato e seguire le istruzioni del produttore
 - Centrifugare per 2 min alla massima velocità il DNA estratto e prelevare con attenzione il supernatante per la PCR; il sorbent presente nel pellet inibisce la reazione di PCR
2. Le condizioni di stoccaggio dei reagenti non sono conformi alle istruzioni:
 - Verificare le condizioni di conservazione.
3. Estrazione del DNA impropria:
 - Ripetere l'analisi a partire dall'estrazione del DNA.
4. Le condizioni di PCR non rispecchiano le istruzioni riportate:
 - Verificare le condizioni di PCR e selezionare per il Controllo EAC il canale di fluorescenza riportato nel protocollo.
5. Il Controllo EAC non è stato aggiunto al campione durante la preparazione della mix:
 - Fare maggior attenzione durante la procedura di estrazione del DNA.

Problema 2: Segnale debole o assente del Controllo Positivo (C+).

1. Le condizioni di PCR non rispecchiano le istruzioni riportate:
 - Verificare il protocollo di amplificazione e selezionare il canale di fluorescenza riportato nel manuale.

Problema 3: Qualsiasi segnale presente nel Controllo Negativo di Estrazione (ENC), salvo il canale Red.

1. Contaminazione durante la procedura di estrazione del DNA. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare tutte le superfici e gli strumenti con ipoclorito di sodio (0,5%) e etanolo (70%) o reagenti specifici per la decontaminazione di DNA
 - Usare solo puntali con filtro durante la procedura di estrazione. Cambiare puntali per ogni tubo
 - Ripetere l'estrazione del DNA utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 4: Qualsiasi segnale nel Bianco di Reazione (BM).

1. Contaminazione durante la procedura di preparazione della PCR. Tutti i risultati sono da considerarsi INVALIDI:
 - Decontaminare tutte le superfici e gli strumenti con ipoclorito di sodio (0,5%) e etanolo (70%) o reagenti specifici per la decontaminazione di DNA
 - Manipolare il Controllo Positivo solo alla fine
 - Ripetere l'estrazione del DNA utilizzando un nuovo set di reagenti.

Problema 5: Intensità di fluorescenza variabile.

1. La Master Mix di PCR non è stata miscelata bene:
 - Ripetere attentamente la procedura di preparazione della PCR
2. Presenza di bolle d'aria nei tubi 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 fluoro fori/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 d'uso dello strumento o contattare il supporto tecnico locale.

"L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO ASSICURA ALL'ACQUIRENTE I DIRITTI COPERTI DA ALCUNI BREVETTI ROCHE ALLO SCOPO UNICO DI OFFRIRE SERVIZI DI DIAGNOSTICA UMANA IN VITRO. L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO NON CONCEDE NESSUN ALTRO BREVETTO GENERALE, DIRITTO O LICENZA DI ALCUN TIPO, AL DI FUORI DELLO SPECIFICO DIRITTO DI UTILIZZO"

REFERENCES/BIBLIOGRAFIA.

- Role of Chlamydia trachomatis in Miscarriage. Baud D, Goy G, Jatou K, Osterheld MC, Blumer S, Borel N, Vial Y, Hohlfeld P, Pospischil A, Greub G. Emerg Infect Dis. 2011 Sep;17(9):1630-5.
- Molecular Diagnosis of Genital Chlamydia trachomatis Infection by Polymerase Chain Reaction. Khan ER, Hossain MA, Paul SK, Mahmud MC, Rahman MM, Alam MA, Hasan MM, Mahmud NU, Nahar K. Mymensingh Med J. 2011 Jul;20(3):362-5.
- Chlamydia trachomatis prevalence in unselected infertile couples. Salmeri M, Santanocita A, Toscano MA, Morello A, Valenti D, La Vignera S, Bellanca S, Vicari E, Calogero AE. Syst Biol Reprod Med. 2010 Dec;56(6):450-6. Epub 2010 Sep 17.
- Urine-based testing for Chlamydia trachomatis among young adults in a population-based survey in Croatia: feasibility and prevalence. Božičević I, Grgić I, Židovec-Lepej S, Čakalo JI, Belak-Kovačević S, Štulhofer A, Begovac J. BMC Public Health. 2011 Apr 14;11:230.
- Frequency of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis and Ureaplasma species in cervical samples. Rodrigues MM, Fernandes PÁ, Haddad JP, Paiva MC, Souza Mdo C, Andrade TC, Fernandes AP. J Obstet Gynaecol. 2011;31(3):237-41.
- Prevalence of Chlamydia trachomatis: results from the first national population-based survey in France. Goulet V, de Barbeyrac B, Raherison S, Prudhomme M, Semaille C, Warszawski J; CSF group. Sex Transm Infect. 2010 Aug;86(4):263
- Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, Crucitti T, Reijans M, Mulders B, Simons G, Temmerman M, Claeys G, Padalko E. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 Sep;71(1):29-37. Epub 2011 Jul 27
- Urine-based testing for Chlamydia trachomatis among young adults in a population-based survey in Croatia: feasibility and prevalence. Božičević I, Grgić I, Židovec-Lepej S, Čakalo JI, Belak-Kovačević S, Štulhofer A, Begovac J. BMC Public Health. 2011 Apr 14;11:230.

Legenda dei Simboli Utilizzati Key to symbols used			
	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>

EuroClone[®]
diagnostica s.r.l.

EuroClone Diagnostica Srl

Via Lombardia 12 - 27010 Siziano (PV) Italy



+ 39.02.38195.1



+39.02.38101465



info@euroclone.it

www.euroclone.it