



IVD

ThromboStrip

Test para el genotipado de mutaciones puntuales asociadas a riesgo de Trombosis

Test for the genotyping of point mutations associated with Thrombosis risk

Test per la genotipizzazione di mutazioni puntiformi associate al rischio di trombosi



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA

+ 34 976 503597

ThromboStrip

Test para la detección de mutaciones puntuales asociadas a riesgo de trombosis venosa

FINALIDAD PREVISTA

El test ThromboStrip es un test diseñado para la detección de tres mutaciones puntuales/variantes génicas asociadas al riesgo de padecer trombosis venosa profunda: la mutación G1691A del Factor V; la mutación G20210A de la Protrombina y el polimorfismo C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa.

Este test es solo una herramienta para ayudar a los profesionales en el diagnóstico de las patologías indicadas. No debe utilizarse como única herramienta de diagnóstico.

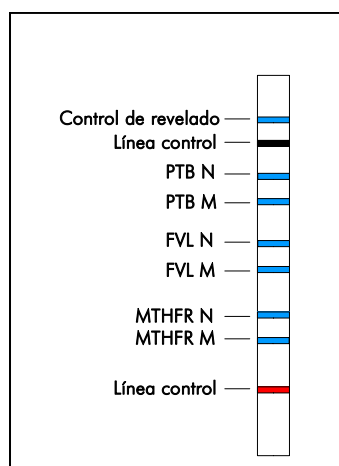
FUNDAMENTO

El kit ThromboStrip se basa en el principio de la hibridación reversa y permite la identificación de tres variantes génicas (las mutaciones G1691A del gen del Factor V y G20210A del gen de la protrombina y el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR).

El procedimiento consta de tres pasos: a) extracción de ADN (reactivos no incluidos en el kit), b) amplificación mediante PCR y c) hibridación/revelado.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa se amplifican de forma simultánea fragmentos de los genes del factor de coagulación V (FV), factor de coagulación II (protrombina, PTB) y metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que contienen las mutaciones/polimorfismo G1691A, G20210A y C677T, respectivamente. Durante esta PCR se añade a los fragmentos de ADN amplificados una marca (biotina).

Las membranas del test llevan unidas de forma covalente sondas de ADN que reconocen específicamente las secuencias amplificadas durante la PCR de cada uno de los genes. Por cada gen hay dos sondas: una para la secuencia normal y otra para la secuencia mutada. Se incluyen además una sonda control de revelado y unas líneas negra y roja para el control de la posición de la tira y como ayuda en la interpretación de los resultados.



Durante el proceso de hibridación las sondas se unen de forma específica con los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR.

Una vez hibridados los productos de PCR con las sondas de la membrana (y tras una serie de lavados para eliminar cualquier pegado inespecífico) se procede a la detección de la hibridación ("revelado"). Para ello se incuba la membrana con un conjugado estreptavidina-peroxidasa, que se unirá a todos aquellos sitios donde haya una biotina, y, posteriormente, se añade un sustrato de la peroxidasa (TMB) que genera un precipitado de color azul allí donde se haya producido la hibridación.

Como resultado final del test se obtiene un patrón de bandas que se interpreta con la ayuda de una tira control. Cada uno de los genes podrá presentar tres variantes (en función de si la mutación está presente y, en caso afirmativo, de si se encuentra en estado homocigoto o heterocigoto): N/N, N/M, M/M.

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

THROMBOSTRIP			Kit 16 tests
	Membranas	STRIPS	16
	Cubetas 8 canales	PL	2
Reactivos de PCR REAG PCR	Mezcla PCR	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primers	REAG PRIMER	0,11 ml
	Taq	REAG TAQ	0,030 ml
	Desnaturalizante	SOLN DN	1 ml
	Tampón de hibridación	BUF HYB	60 ml
	Tampón de lavado 1	BUF WASH 1	100 ml
	Conjugado	CONJ HRP	60 ml
	Tampón de lavado 2	BUF WASH 2	130 ml
	Substrato	SUBS TMB	30 ml
	Instrucciones de uso		1
	Plantilla de interpretación		1

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

Para el desarrollo del kit se requieren, además, los siguientes materiales:

1. Microtubos para PCR.
2. Micropipetas y puntas para micropipetas (estériles o irradiadas con UV e, idealmente, con filtro).
3. Pinzas y lápiz (opcional).
4. Cronómetro.
5. Termómetro.

EQUIPOS NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL KIT

1. Termoagitador para placas
El kit ha sido validado con los termoagitadores: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dy nex).
2. Termociclador
Se han probado con éxito los siguientes termocicladores: PTC-100 (MJ Research), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf) y S1000 Thermal Cycler (BioRad).
3. Escáner BLOTrix S1 o BLOTrix R2 (BioSciTec, opcional).

PRECAUCIONES

1. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
2. Seguir rigurosamente las instrucciones indicadas. La modificación de cualquiera de los **pasos o temperaturas** puede afectar gravemente a los resultados del test.
3. Es esencial que todos los materiales que se vayan a usar estén libres de DNAsas. Se recomienda usar puntas de pipeta con filtro en la preparación de PCRs, para evitar problemas de contaminación por formación de aerosoles. Siga todas las precauciones normales para la preparación de las amplificaciones. Utilice material autoclavado para el proceso de hibridación/revelado.
4. Almacenar los componentes del kit en las condiciones indicadas.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
7. Las tiras reactivas son de un único uso.
8. Las cubetas proporcionadas son de un único uso.
9. Cada canal de la cubeta es para una única tira.
10. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. Las muestras de pacientes deben considerarse siempre como potencialmente infecciosas. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad.
13. Es aconsejable que la tira, una vez utilizada se manipule teniendo las mismas consideraciones que con la muestra. Se recomienda gestionarla como material potencialmente peligroso.
14. La solución de desnaturalización contiene < 2 % de NaOH y es irritante para ojos y piel (H314 y P280, P305, P351, P338, P310).
15. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

ALMACENAMIENTO

Almacenar todos los reactivos a 2-8 °C. Debido al almacenamiento a 2-8 °C puede observarse la aparición de precipitados en alguna de las soluciones (tampón de hibridación, tampones de lavado 1 y 2, conjugado). Estos precipitados se redisuelven al atemperar (conjugado) o calentar a 42 °C (tampón de hibridación y tampones de lavado 1 y 2).

La fecha de caducidad de todos los reactivos está impresa en la etiqueta.

MUESTRAS

El material de partida para la realización del test es ADN de concentración conocida. Este ADN puede extraerse de sangre (con EDTA o citrato), saliva o tejidos y debe de ser de calidad suficiente para poder ser amplificado mediante PCR ($R_{260/280} > 1,5$).

Se han probado con ThromboStrip muestras de ADN extraídas de sangre con los siguientes procedimientos:

- a) Extracción de ADN mediante precipitación salina.
- b) Extracción de ADN con resinas y columnas de sílice.
- c) Extracción de ADN a partir de gota de sangre en papel FTA con Chélex (gotas de 8 mm extraídas con 25 µl de resina; 5 µl de extracto por PCR).
- d) Extracción de ADN a partir de gota de sangre en papel FTA mediante protocolo Whatmann (círculo de 2 mm por PCR).

Almacenar las muestras de ADN a 2-8 °C, si se van a analizar en un tiempo breve, o a -20 °C para almacenamientos más prolongados.

PROCEDIMIENTO DE THROMBOSTRIP

1.- Reacción en cadena de la polimerasa

Preparación de PCRs

Importante: antes de abrir los viales con los reactivos de PCR centrifugarlos brevemente. De este modo se asegurará de que todo el contenido de los mismos esté en el fondo del tubo.

- Preparar los tubos de PCR necesarios según el número de ADN que se vayan a amplificar.
- En cada tubo de PCR añadir: 39 μ l de premezcla de PCR + 5 μ l de primers + 1 μ l de Taq + 5 μ l de ADN (50 ng/ μ l). Si es posible, mantener los reactivos y las mezclas a 2-8 °C durante la preparación.

Si se van a amplificar varios ADN se recomienda preparar una mezcla común con todos los reactivos, de modo que finalmente se añadan 45 μ l de mezcla + 5 μ l de ADN (50 ng/ μ l).

Por ejemplo:

Nº de PCRs	Premezcla de PCR	Primers	Taq
1	39 μ l	5 μ l	1 μ l
3	136,5 μ l	17,5 μ l	3,5 μ l
5	214,5 μ l	27,5 μ l	5,5 μ l
8	351 μ l	45 μ l	9 μ l

* Las mezclas con todos los reactivos para la PCR deben prepararse siempre en exceso, para contrarrestar las pérdidas de volumen que se producen durante el proceso de pipeteo.

Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, el usuario debería amplificar también un control negativo (agua o tampón TE, por ejemplo) y, si fuera necesario, un control positivo (no incluido en el kit).

Amplificación

Debe tenerse en cuenta la importancia de conseguir una adecuada concentración de ADN para obtener los resultados esperados.

Introducir los tubos en el aparato de PCR (si se requiere, añadir 1 gota de aceite Nujol sobre cada reacción de PCR) y amplificar el ADN con el siguiente programa:

94 ° C, 5 min
30 ciclos de: 94 ° C, 1 min
54 ° C, 1 min
72 ° C, 1 min
72 ° C, 5 min
4 ° C

Comprobación de la PCR

Si se desea, puede comprobar el resultado de la PCR en un gel de agarosa al 3 %. Para ello, aplique directamente 5 μ l de la PCR en un pocillo del gel (la premezcla de PCR incluye tampón de carga y dos colorantes para el seguimiento de la electroforesis). Desarrolle la electroforesis a 100 V durante 1 h y observe al UV. Deben detectarse tres bandas de los siguientes tamaños: 245 pb, 234 pb y 206 pb (en función del tamaño y la resolución del gel empleado, las bandas de 245 y 234 pb pueden observarse como una única banda).

Una vez terminada la PCR continuar con el desarrollo de la tira. Si las muestras no se van a analizar en el momento, almacenarlas a 2-8 °C durante no más de 24 h. Para almacenamientos más prolongados, congelar a -20 °C.

→ Ver esquema de preparación de PCR en Anexo al documento

2.- Desarrollo de la tira

Bajo petición, Operon facilitará al usuario el procedimiento de trabajo según el instrumento que se vaya a utilizar para el desarrollo de las tiras (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO o Dynablot Heat). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

En el paso de desnaturalización, se dispensarán en la placa **12,5 µl de desnaturalizante + 12,5 µl de PCR**.

El producto se ha probado utilizando diferentes plataformas de trabajo. A modo informativo se especifican los nombres comerciales de las plataformas de trabajo utilizadas, lo que no implica un uso exclusivo y dependiente de dichas marcas comerciales, sino que se refieren de forma representativa al modo de trabajo utilizado. El producto funciona correctamente mientras se utilice una plataforma que asegure el programa de temperatura planteado para el producto.

→ Ver esquema básico del desarrollo de la tira en Anexo al documento

3.- Interpretación de la tira

La interpretación de las tiras puede hacerse de manera visual, con ayuda de la plantilla incluida en el kit (ver procedimientos de trabajo para cada instrumento) o de forma automática, mediante el uso de los escáneres BLOTrix R2 o BLOTrix S1 (BioSciTec).

Bajo petición, OPERON, S.A., S.A. facilitará al usuario las instrucciones para la interpretación automática de las tiras mediante escáner (DO-09053004 "Instrucciones de uso BLOTrix R2_S1"). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

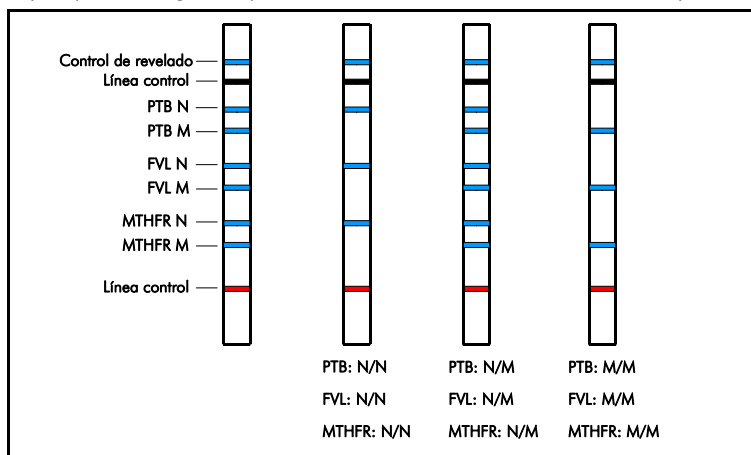
Importante: la interpretación automática de los resultados requiere siempre de una verificación visual de las tiras; bandas muy débiles podrían no ser detectadas por el instrumento.

RESULTADOS

Para cada uno de los genes se pueden obtener tres posibles resultados:

1. **Homozigoto normal:** aparece una única banda azul en la posición asociada a la secuencia normal del gen. Los dos cromosomas contienen la secuencia normal del gen (N/N).
2. **Heterozigoto normal/mutado:** aparecen dos bandas azules en las posiciones asociadas a las secuencias normal y mutada del gen. Uno de los cromosomas contiene un gen con la secuencia normal y el otro con la secuencia mutada (N/M).
3. **Homozigoto mutado:** aparece una única banda azul en la posición asociada a la secuencia mutada del gen. Los dos cromosomas contienen la secuencia mutada del gen (M/M).

Ejemplos de genotipado utilizando la tira ThromboStrip



CONTROL DE CALIDAD

La línea control de revelado debe aparecer siempre por encima de la línea negra superior. Su ausencia será indicativa de problemas en la fase de hibridación/revelado del producto.

La tira correspondiente al control de amplificación negativo mostrará únicamente la línea de control de revelado. En el caso de muestras de ADN, todas deben dar al menos una banda azul para cada gen (salvo en el caso de una posible delección génica), máximo dos. La ausencia de bandas asociadas a los genes es indicativo de un fallo en la PCR (comprobar calidad de ADN, comprobar PCR en gel de agarosa al 3 %) o en la hibridación (comprobar temperatura de hibridación).

PRESTACIONES/ EVALUACIONES INTERNAS Y EXTERNAS

La utilización de este test está limitada a profesionales cualificados y familiarizados con métodos de Biología Molecular.

Se ha evaluado el test con 156 muestras de ADN y los resultados han sido 100 % concordantes con los obtenidos por otros métodos habituales de genotipado (análisis de restricción, secuenciación).

POSIBLES PROBLEMAS

1. No aparece ninguna banda en la tira, incluida la banda control.

- No se han equilibrado a temperatura ambiente el conjugado y/o revelador.
- No se ha añadido el conjugado y/o revelador, o se han añadido en poca cantidad.

2. Sólo aparece la línea de la banda control.

- Fallo de amplificación de la PCR (comprobar en gel de agarosa).
- No se ha añadido la PCR, o se ha añadido en menor cantidad, en el paso de hibridación.
- Temperatura incorrecta del tampón de hibridación/lavado 1 (superior a la indicada).
- Temperatura incorrecta del incubador (superior a la indicada).

3. Fuerte color de fondo en la tira tras el revelado.

- Los pasos de lavado no se realizaron de manera adecuada (tiempo inadecuado, cantidad de tampón menor, tampones fríos).

4. Tinción no homogénea de la tira.

- Agitación inadecuada (revisar la programación del termoagitador para placas).
- Las tiras no quedaron sumergidas por completo durante las incubaciones.

5. Resultados inesperados

- Temperatura de incubación y/o de los tampones/reactivos inadecuadas.
- Contaminación en las PCRs (comprobar con un control negativo).
- Contaminación de canales adyacentes por paso de líquido de un canal a otro al añadir el tampón de hibridación.

En el siguiente gráfico se muestran en gris los rangos de temperatura de trabajo (hibridación/revelado; prueba realizada con el termoagitador PST-60HL) con los cuales se obtienen resultados adecuados en cada una de las bandas (buena intensidad de hibridación, sin reacción entrecruzada):

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
PTB N							
PTB M							
FVL N							
FVL M							
MTHFR N							
MTHFR M							

SENSIBILIDAD

Se evaluó con varios lotes la cantidad mínima de ADN puro que puede genotiparse adecuadamente con el kit ThromboStrip. Con los resultados obtenidos se concluyó que la mínima cantidad de ADN en la PCR con la que se pueden conseguir resultados perfectamente legibles es de 5-10 ng. Cantidades inferiores (hasta 2,5 ng) dan lugar a bandas muy débiles, en algunos casos difíciles de visualizar.

ESPECIFICIDAD

Se evaluó la especificidad del kit ThromboStrip mediante el análisis de 56 muestras de ADN, de genotipo conocido, con tres lotes diferentes de producto. En todos los lotes, la concordancia de especificidad de los resultados del kit con los del genotipado previo fue del 100 %.

Se evaluó la especificidad del kit ThromboStrip mediante el análisis de 100 muestras de ADN genotipadas mediante análisis de restricción, secuenciación o PCR a tiempo real con un lote de producto. La concordancia de especificidad con los otros métodos de genotipado fue del 100 %.

EFEECTO HOOK

Se evaluó el funcionamiento del kit ThromboStrip en presencia de cantidades crecientes de ADN (hasta 5000 ng). No se observó efecto de inhibición de la PCR, ni reducción de la intensidad de las bandas obtenidas, ni aparición de reacción entrecruzada. Con todas las cantidades de ADN probadas los resultados fueron satisfactorios.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se analizaron 5 réplicas de 3 ADN diferentes con 3 lotes de producto ThromboStrip. El análisis lo realizó una misma persona y los resultados de las réplicas fueron idénticos en todos los casos, demostrando la alta precisión intraensayo de ThromboStrip.

PRECISIÓN INTERDÍA

Se analizaron 3 muestras de ADN, cada una de ellas por duplicado, con 3 lotes de producto ThromboStrip a lo largo de 5 días consecutivos. El análisis lo realizó una misma persona y los resultados obtenidos para cada ADN fueron los mismos en todos los casos, demostrando la alta precisión interdía de ThromboStrip.

PRECISIÓN INTERLABORATORIO

Tres personas analizaron 3 muestras de ADN, por duplicado, con un lote de ThromboStrip. El análisis se hizo el mismo día y los resultados obtenidos fueron idénticos, demostrando la alta precisión interlaboratorio de ThromboStrip.

PRECISIÓN INTERLOTE

Se analizaron 3 muestras de ADN, por triplicado, con tres lotes de producto ThromboStrip. El análisis lo realizó una misma persona en el mismo día y los resultados obtenidos con todos los lotes fueron idénticos, demostrando la alta precisión interlote de ThromboStrip.

EN

ThromboStrip

Test for the detection of point mutations associated with venous thrombosis risk

INTENDED USE

ThromboStrip test is a test designed for the detection of three point mutations/genetic variants associated with the risk of suffering deep venous thrombosis: G1691A mutation in Factor V; G20210A mutation in prothrombin; and C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase.

This test is only a tool to help the professionals in the diagnosis of the indicated pathologies. This kit cannot be the only diagnosis tool.

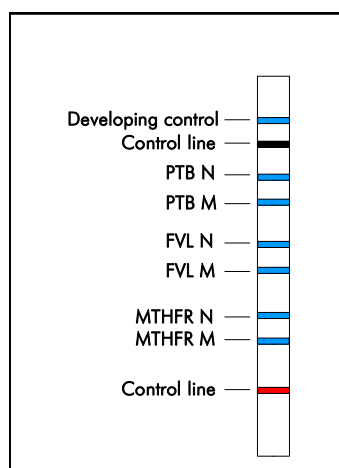
BASIS

ThromboStrip kit is based on reverse hybridization principle and allows for the identification of three genetic variants (G1691A mutation in Factor V gene and G20210A mutation in prothrombin gene, and C677T polymorphism of MTHFR gene).

The procedure consists of three steps: a) DNA extraction (reagents not included in the kit), b) PCR amplification, and c) hybridization/detection.

Fragments of coagulation factor V (FV) gene, coagulation factor II (prothrombin, PTB) gene, and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, containing G1691A, G20210A, and C677T mutations/polymorphism respectively, are simultaneously amplified by means of polymerase chain reaction. During this PCR, a label (biotin) is added to the amplified DNA fragments.

Test membranes bear covalently-linked DNA probes which specifically recognize each gene sequence amplified during the PCR. There are two probes for each gene: one for the normal sequence and one for the mutated sequence. A control probe of the developing process and a black and a red lines for the control of strip positioning and as a result interpretation aid are also included.



During hybridization process, the probes specifically bind to DNA fragments amplified during PCR.

Once PCR products are hybridized with membrane probes (and after several washes to eliminate any non-specific binding) the hybridization is detected ("developing"). With this aim the membrane is

incubated with a streptavidin-peroxidase conjugate, which will bind to every site with a biotin molecule; then, a peroxidase substrate (TMB) is added which will develop a blue precipitate in the site where hybridization has occurred.

As final result of the test, a band pattern is obtained which is interpreted with the aid of a control strip.

Each gene may present three situations (according to presence or not of the mutation, and, if present whether in homozygous or heterozygous status): N/N, N/M, M/M.

MATERIALS INCLUDED IN THE KIT

THROMBOSTRIP			16 tests kit
	Membranes	STRIPS	16
	8-channel plates	PL	2
PCR Reagents REAG PCR	PCR Mix	REAG PCR MIX	0.8 ml
	Primers	REAG PRIMER	0.11 ml
	Taq	REAG TAQ	0.030 ml
	Denaturant	SOLN DN	1 ml
	Hybridization buffer	BUF HYB	60 ml
	Wash buffer 1	BUF WASH 1	100 ml
	Conjugate	CONJ HRP	60 ml
	Wash buffer 2	BUF WASH 2	130 ml
	Substrate	SUBS TMB	30 ml
	Instructions of use		1
	Interpretation chart		1

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

The following additional material is required when using the kit:

1. Microtubes for PCR.
2. Micropipettes and micropipette tips (sterile or UV-irradiated and ideally with a filter).
3. Tweezers and a pencil (optional).
4. Chronometer.
5. Thermometer.

REQUIRED EQUIPMENTS FOR KIT DEVELOPMENT

1. Thermoshakers for plates
The kit has been validated with the following thermoshakers: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
2. Thermocycler
The following thermocyclers have been successfully used with the kit: PTC-100 (MJ Research), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf) and S1000 Thermal Cycler (BioRad).
3. BLOTrix S1 or BLOTrix R2 scanner (BioSciTec, optional).

PRECAUTIONS

1. Only use the reagents *in vitro*.
2. Strictly follow the instructions provided. Modifying any of the prescribed **steps or temperatures** may severely affect the test results.
3. All the materials and reagents used must be free of DNAses. The use of filtered pipette tips is recommended for PCR preparation to prevent aerosol contamination. Ensure that all the usual precautions are taken in the preparation of the amplifications. Use autoclaved material for the hybridization/development process.
4. Store the kit components as indicated in the instructions.
5. Do not exchange components from kits with different lot numbers.
6. Do not use kit components after the expiration dates.
7. Strips are for single-use.
8. Supplied trays are for single-use.
9. Each channel of the supplied trays is for just one strip.
10. If the package is broken, the product can still be used providing none of the components have been damaged.
11. The used product should be discarded in compliance with current legislation.
12. Patient samples must always be treated as potentially infectious. Environmental and safety standards must be adhered to.
13. Once it is used, it is advisable to manipulate the strip taking into account the same considerations as for the sample. The strips have to be manipulated with the proper precautions and should be managed as biohazardous material.
14. The denaturation solution contains < 2% NaOH and is an irritant to both eyes and skin (H314 and P280, P305, P351, P338, P310).
15. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the EC marking and component lots.

STORAGE

Store at 2-8°C. Precipitate formation may occur in some solutions (hybridization buffer, wash buffer 1 and 2, conjugate) due to storage at 2-8 °C. These precipitates will redissolve during temper (conjugate) or warming to 42 °C (hybridization and wash buffers).

Expiry date for all reagents is printed on the respective label.

SAMPLES

The base material for carrying out the test is DNA of a known concentration. This DNA can be extracted from blood (with EDTA or citrate), saliva or tissue and should be of sufficient quality for PCR amplification (R 260/280 >1,5).

DNA samples, obtained by several DNA extraction methods, have been tested on ThromboStrip. The extraction procedures were the following:

- a) Salting out (DNA extraction by saline precipitation).
- b) DNA extraction with silica and silica columns.
- c) DNA extraction of a drop of blood in FTA paper with Chelex (8 mm diameter circle extracted with 25 µl of 10 % Chelex solutions; 5 µl of DNA per PCR).
- d) DNA extraction of a drop of blood in FTA paper with Whatmann solutions (2 mm diameter circle per PCR).

Store the DNA samples at 2-8 °C if they are going to be used shortly after, or at -20 °C for longer periods of storage.

THROMBOSTRIP PROCEDURE

1.-Polymerase chain reaction

PCR preparation

Important: before opening the vials with the PCR reagents centrifuge them briefly. This will ensure that all the contents will be at the bottom of the tube.

- Prepare the required PCR tubes based on the number of DNAs to be amplified.
- Add to each PCR tube: 39 μl of PCR premix + 5 μl of primers + 1 μl of Taq + 5 μl of DNA (50 ng/ μl). Mix well. If possible, keep the reagents and the mixtures at 2-8 °C during the preparation.

If various DNA samples are to be amplified, preparing a common mixture with all the reagents is recommended to finally add 45 μl of mixture + 5 μl of DNA (50 ng/ μl). For example:

Nr. of PCRs	PCR premix	Primers	Taq
1	39 μl	5 μl	1 μl
3	136.5 μl	17.5 μl	3.5 μl
5	214.5 μl	27.5 μl	5.5 μl
8	351 μl	45 μl	9 μl

* Always prepare an excess of the mixtures containing all PCR reagents, to compensate volume loss during pipetting process.

Due to requirements of "good laboratory practice", the user should also include a negative control (e.g. water or TE buffer) to exclude contamination and, if required, a positive control (not included in the kit).

Amplification

Regard the importance of getting a suitable concentration of the DNA to get a proper result.

Place the microtubes into the thermocycler (if the apparatus requires the use of Nujol oil, add 1 drop on top of every PCR reaction) and amplify DNA by following program:

94 °C, 3 min
30 cycles of: 94 °C, 1 min
54 °C, 1 min
72 °C, 1 min
72 °C, 5 min
4 °C

3. Verification of PCR

If desired, the result of the PCR can be verified in a 3 % agarose gel. For this, apply 5 μl of each PCR reaction in each gel well (PCR premix includes loading buffer and two dyes for electrophoresis control). Run the electrophoresis at 100 V for 1 hr and examine under UV light. Three bands of the following sizes should be detected: 245 bp, 234 bp and 206 bp (according to the size of the gel used, 245 and 234 bp bands may appear as a single band).

Once the PCR is finished, continue with the developing of the strip. If the samples are not to be tested immediately, they must be stored at 2-8 °C for no more than 24 hrs. For longer storage, freeze at -20 °C.

→ See the PCR preparation diagram in the Annex of the document.

2.- Strip development

On request, Operon will provide the user with the working procedure for the specific instrument to be used for processing the strips (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO or Dynablot Heat). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

In the denaturing step, **12.5 µl of denaturation buffer + 12.5 µl of PCR** will be dispensed in the tray.

The product has been tested using different work platforms. For your information, the commercial names of the work platforms used are specified, which does not imply an exclusive use of such trademarks but the work protocol. The product works correctly as long as the platform used ensures the temperature program raised for the product.

→ See the Strip developing diagram in the Annex of the document.

3.- Strip interpretation

Strip interpretation can be done visually, using the evaluation chart included in the kit (see working procedures for each instrument) or automatically, with BLOTRix R2 or BLOTRix S1 scanners (BioSciTec).

On request, OPERON, S.A. will provide the user with the instructions for the automatic strip interpretation with the scanners (DO-09053004 "Instructions of use BLOTRix R2_S1"). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

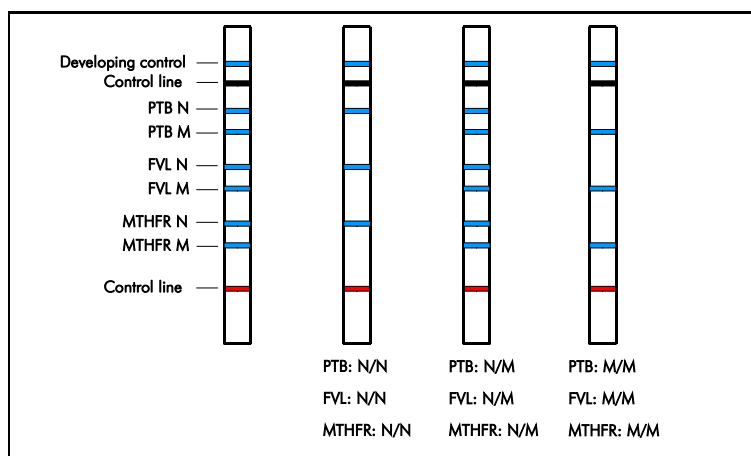
Important: results of strips interpretation with the scanners must always be visually verified; very faint bands could be not detected by the instruments.

RESULTS

For each gene, three potential results may be obtained:

1. **Normal homozygous:** a single blue band appears in the position associated to gene normal sequence. Both chromosomes contain the normal sequence of the gene (N/N).
2. **Normal/mutated heterozygous:** two blue bands appear in the positions associated with gene normal and mutated sequences. One chromosome contains a gene with the normal sequence, and the other chromosome contains a gene with the mutated sequence (N/M).
3. **Mutated homozygous:** a single blue band appears in the position associated to gene mutated sequence. Both chromosomes contain the mutated sequence of the gene (M/M).

Example of genotyping using ThromboStripquality control



QUALITY CONTROL

The development control line should always appear above the upper black line. Its absence will be indicative of issues encountered during the product hybridization/development stage.

The strip corresponding to the amplification negative control will show only the developing control band. Regarding to DNA samples, everyone must present at least one blue band for each gene (except in the case of a potential gene deletion), and two at the most. The absence of bands associated to the genes is indicative of a PCR failure (check DNA quality, verify PCR in a 3% agarose gel) or a hybridization failure (check the hybridization temperature).

PERFORMANCE

The use of this test is restricted to professional users that are familiar with the methods used in Molecular Biology.

The test has been evaluated with 156 DNA samples and the results have been 100 % consistent with those obtained by other genotyping standard methods (restriction assay, sequencing).

POTENTIAL ISSUES

1. No band appears on the strip, including the control band.

- Conjugate and/or developer have not been brought to room temperature.
- Conjugate and/or developer have not been added, or the amount added is insufficient.

2. Only the control band appears.

- PCR amplification failure (verify in agarose gel).
- PCR has not been added, or the amount added is insufficient, at the hybridization step.
- Improper Hybridization Buffer/Wash Buffer 1 temperature (above the indicated).
- Improper incubator temperature (above the indicated).

3. Strong background color on the strip following developing.

- Washing steps were not properly performed (inadequate time, insufficient buffer amount, cold buffers).

4. Irregular strip dyeing.

- Improper agitation (check the plate thermoshaker program).
- Strips were not completely immersed during the incubations.

5. Unexpected results.

- Improper incubation temperature and/or buffer/reagent temperature.
- PCR contamination (check using a negative control).
- Cross-contamination of adjacent channels due to fluid overflow from one channel to the other when adding hybridization buffer.

The following table shows in grey the appropriate temperature working ranges (hybridization/developing; only tested with PST-60HL thermoshaker) for each probe of ThromboStrip (good hybridization intensity, no cross reaction):

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
PTB N							
PTB M							
FVL N							
FVL M							
MTHFR N							
MTHFR M							

SENSITIVITY

The sensitivity of ThromboStrip was evaluated with several lots of product. The minimum DNA quantity per PCR that can be right genotyped is 5-10 ng (bands with good intensity). DNA quantities lower than 5 ng cause weak bands, in some cases difficult to see.

SPECIFICITY

ThromboStrip specificity was evaluated with 56 DNA samples, of a known genotype, with three different lots of product. In all of them, the results concordance with the previous genotype was of 100 %.

ThromboStrip specificity was evaluated with 100 DNA samples, of a known genotype, with one lot of product. In all of them, the results concordance with the previous genotype was of 100 %.

HOOK EFFECT

ThromboStrip results were evaluated with increased quantities of DNA in the PCR reaction (up to 5000 ng). Neither PCR inhibition nor intensity bands reduction nor crossreactions were observed. The results were right with all the DNA quantities tested.

INTRA-ASSAY PRECISION

5 replica of 3 different DNA samples were analyzed with three lots of ThromboStrip. The study was made by one person and the replica results were always the same, showing a high intra-assay precision result for ThromboStrip.

INTER-DAY PRECISION

Three different DNA samples were analyzed, in duplicate, with three lots of ThromboStrip for 5 consecutive days. The study was made by one person and the results for each one of the DNA samples were the same everyday, showing a high inter-day precision result for ThromboStrip.

INTER-LABORATORY PRECISION

Three DNA samples were analyzed, in duplicate, with the same lot of ThromboStrip by three people. The study was made in one day and the results were the same for all the DNA samples, showing a high inter-laboratory precision for ThromboStrip kit.

INTER-LOT PRECISION

Three different DNA samples were analyzed, in triplicate, with three lots of ThromboStrip. The study was made in one day by one person and the results were allways the same, showing a high inter-lot precision for ThromboStrip kit.

IT

ThromboStrip

Test per il rilevamento di mutazioni puntiformi associate al rischio di trombosi venosa

USO PREVISTO

Il test ThromboStrip è un test progettato per il rilevamento di tre mutazioni puntiformi/varianti geniche associate al rischio di trombosi venosa profonda: la mutazione G1691A del fattore V; la mutazione G20210 A della protrombina e il polimorfismo C677T della metilentetraidrofoloreduttasi.

Questo test deve essere utilizzato esclusivamente da persone qualificate nella diagnosi delle patologie correlate. Il risultato di questo test dovrebbe essere confermato con altri metodi diagnostici.

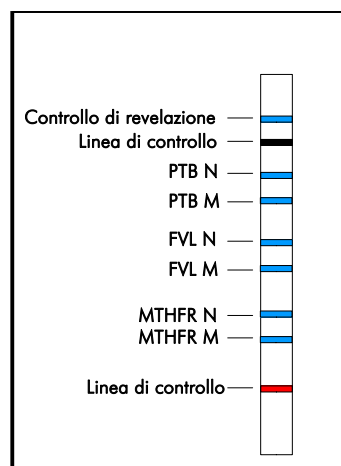
FONDAMENTO

Il kit ThromboStrip è basato sul principio dell'ibridazione inversa e permette l'identificazione di tre varianti geniche (le mutazioni G1691A del gene del fattore V e G20210A del gene della protrombina e il polimorfismo C677T del gene della MTHFR).

La procedura prevede tre fasi: a) estrazione del DNA (reagenti non inclusi nel kit), b) amplificazione tramite PCR e c) ibridazione/rivelazione.

Attraverso la reazione a catena della polimerasi vengono amplificati simultaneamente frammenti dei geni del fattore di coagulazione V (FV), del fattore di coagulazione II (protrombina, PTB) e della metilentetraidrofoloreduttasi (MTHFR), che contengono, rispettivamente, le mutazioni/il polimorfismo G1691A, G20210A e C677T. Nel corso della PCR viene eseguita una marcatura (biotina) dei frammenti di DNA amplificati.

Sulle membrane del test sono legate con legame covalente sonde di DNA che riconoscono specificamente le sequenze di ciascuno dei geni amplificati nella PCR. Per ogni gene vi sono due sonde: una per la sequenza normale e l'altra per la sequenza mutata. Inoltre, sono presenti una sonda di controllo della rivelazione e una linea nera e una rossa per il controllo del posizionamento della striscia e come ausilio per l'interpretazione del risultato.



Durante il processo di ibridazione le sonde si legano in maniera specifica ai frammenti di DNA amplificati nella PCR.

Una volta che i prodotti di PCR si sono ibridati con le sonde della membrana (e dopo una serie di lavaggi per eliminare eventuali legami aspecifici), si procede al rilevamento dell'ibridazione ("rivelazione"). A tal fine, la membrana viene incubata con un coniugato streptavidina-perossidasi, che si legherà a tutti i siti in cui è presente biotina, e, successivamente, viene aggiunto un substrato della perossidasi (TMB) che genera un precipitato di colore blu nei siti in cui è avvenuta l'ibridazione.

Come risultato finale del test si ottiene un pattern di bande da interpretare con l'ausilio della striscia di controllo. Ciascuno dei geni potrà presentare tre varianti (in funzione dell'eventuale presenza della mutazione e, se la mutazione è presente, dello stato omozigote o eterozigote della stessa): N/N, N/M, M/M.

MATERIALI INCLUSI NEL KIT

THROMBOSTRIP			Kit 16 tests
	Membrane	STRIPS	16
	Vaschetta 8 canali	PL	2
PCR Reagents REAG PCR	Mix di PCR	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primer	REAG PRIMER	0,1 ml
	Taq	REAG TAQ	0,030 ml
	Denaturante	SOLN DN	1 ml
	Tampone di ibridazione	BUF HYB	60 ml
	Tampone di lavaggio 1	BUF WASH 1	100 ml
	Coniugato	CONJ HRP	60 ml
	Tampone di lavaggio 2	BUF WASH 2	130 ml
	Substrato	SUBS TMB	30 ml
	Istruzioni d'uso		1
	Schema per l'interpretazione		1

MATERIALI NON INCLUSI NEL KIT

Per l'uso del kit sono necessari, inoltre, i seguenti materiali:

1. Microprovette per PCR.
2. Micropipette e punte per micropipette (sterili o irradiate con UV e, preferibilmente, con filtro).
3. Pinzette e matita (opzionale).
4. Cronometro.
5. Termometro.

APPARECCHI NECESSARI PER LO SVILUPPO DEL KIT

1. Termomixer per piastre
Il kit è stato validato con i termoagitatori: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dy nex).
2. Termociclatore
Sono stati testati con successo i termociclatori qui di seguito: PTC-100 (MJ Research), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf) e S1000 Thermal Cycler (BioRad).
3. BLOTrix S1 or BLOTrix R2 scanner (BioSciTec, opzionale).

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso *in vitro*.
2. Seguire rigorosamente le istruzioni fornite. La modifica di qualsiasi **punto della procedura o temperatura** può compromettere i risultati del test.
3. È essenziale che tutti i materiali utilizzati siano liberi di DNase. Si consiglia di utilizzare puntali di pipette con filtro nella preparazione di PCR, per evitare problemi di contaminazione per formazione di aerosol. Seguire tutte le normali precauzioni necessarie per l'amplificazione del DNA. Utilizzare materiali autoclavato per il processo di ibridazione / rilevazione.
4. Conservare i componenti del kit nelle condizioni indicate.
5. Non scambiare componenti di kit con diverso numero di lotto.
6. Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza.
7. Le strisce reattive sono monouso.
8. La vaschetta in dotazione sono monouso.
9. Ogni canale dei vassoi in dotazione è per una sola striscia.
10. In caso di rottura della confezione, è possibile utilizzare il prodotto sempreché nessuno dei componenti risulti danneggiato.
11. Il prodotto usato deve essere smaltito in conformità con la legislazione vigente.
12. I campioni dei pazienti devono sempre essere considerati come potenzialmente infettivi. Osservare tutte le norme ambientali e di sicurezza.
13. È opportuno che la striscia viene manipolato volta aver utilizzato le stesse considerazioni con il campione. Si raccomanda di gestirlo come materiale potenzialmente pericolosa.
14. La soluzione di denaturazione contiene < 2% di NaOH ed è irritante per gli occhi e per la pelle (H314 e P280, P305, P351, P338, P310).
15. Non gettare il box esterno del kit fino a quando il suo contenuto è stato completamente utilizzato. Il box esterno contiene le informazioni essenziali per la marcatura CE e per le lotti di componenti.

CONSERVAZIONE

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. A causa della conservazione a 2-8 °C, in alcune delle soluzioni (tampone di ibridazione, tamponi di lavaggio 1 e 2, coniugati) potrebbero formarsi dei precipitati. Tali precipitati si ridisciolgono durante il riscaldamento a temperatura ambiente (coniugato) o a 42 °C (tampone di ibridazione e tamponi di lavaggio 1 e 2).

La data di scadenza di tutti i reagenti è indicata sull'etichetta.

CAMPIONI

Il materiale di partenza per l'esecuzione del test è DNA a concentrazione nota, che può essere estratto da sangue (con EDTA o citrato), saliva o tessuti e deve essere di qualità sufficiente per l'amplificazione tramite PCR (R 260/280 > 1,5).

Sono stati provati con il test CeliacStrip campioni di DNA estratti da sangue con le seguenti procedure:

- a) Estrazione di DNA mediante precipitazione salina.
- b) Estrazione di DNA con resine e colonne di silice.
- c) Estrazione di DNA a partire da gocce di sangue su carta FTA con Chelex (gocce di 8 mm estratte con 25 µl di resina; 5 µl di estratto per PCR).
- d) Estrazione di DNA a partire da gocce di sangue su carta FTA mediante protocollo Whatman (cerchio di 2 mm per PCR).

Se i campioni di DNA verranno analizzati in breve tempo, conservarli a 2-8 °C; per una conservazione prolungata mantenerli a -20 °C.

PROCEDURA THROMBOSTRIP

1.- Reazione a catena della polimerasi

Preparazione delle PCR

Importante: prima di aprire i flaconi con i reagenti PCR, centrifugare brevemente. Questo assicurerà che tutto il contenuto sarà al fondo del flacone.

- Preparare le provette per PCR necessarie in base al numero di campioni di DNA da amplificare.
- Aggiungere in ciascuna provetta per PCR: 39 μl di premix di PCR + 5 μl di primer + 1 μl di Taq + 5 μl di DNA (50 ng/ μl). Se possibile, mantenere i reagenti e le mix a 2 - 8 °C durante la preparazione.

In caso di amplificazione di più campioni di DNA, si consiglia di preparare una mix comune contenente tutti i reagenti, in modo da aggiungere poi 45 μl di mix + 5 μl di DNA (50 ng/ μl).

Ad esempio:

N° di PCR	Premix di PCR	Primer	Taq
1	39 μl	5 μl	1 μl
3	136,5 μl	17,5 μl	3,5 μl
5	214,5 μl	27,5 μl	5,5 μl
8	351 μl	45 μl	9 μl

Le mix contenenti tutti i reagenti per la PCR devono essere preparate sempre in eccesso, per compensare le perdite di volume che si verificano durante la pipettatura.

Secondo la buona pratica di laboratorio, l'utente deve inoltre amplificare un controllo negativo (acqua o tampone TE, per esempio) e, se necessario, un controllo positivo (non incluso nel kit).

Amplificazione

Considerate l'importanza di ottenere una adeguata concentrazione del DNA per ottenere un risultato corretto.

Inserire le provette nell'apparecchio di PCR (se necessario, aggiungere 1 goccia di olio Nujol su ogni reazione di PCR) e amplificare il DNA con il seguente programma:

94 °C, 5 min
30 cicli de: 94 °C, 1 min
54 °C, 1 min
72 °C, 1 min
72 °C, 5 min
4 °C

Verifica della PCR

Se opportuno, è possibile verificare il risultato della PCR su gel di agarosio al 3%. A tal fine, applicare direttamente 5 μl della PCR in un pozzetto del gel (nella premix di PCR sono presenti il tampone di caricamento e due coloranti per seguire l'elettroforesi). Eseguire l'elettroforesi a 100 V per 1 ora e osservare agli UV. Devono essere presenti tre bande delle seguenti dimensioni: 245 pb, 234 pb e 206 pb (in funzione delle dimensioni e della risoluzione del gel utilizzato, le bande da 245 e 234 pb possono apparire come un'unica banda).

Una volta terminata la PCR, continuare con lo sviluppo della striscia. Se i campioni non vengono analizzati immediatamente, conservarli a 2-8 °C per non più di 24 ore. In caso di conservazione prolungata, congelarli a -20 °C.

→ Vedere le schema di preparazione della PCR nell'allegato

2.- Sviluppo della striscia

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente la procedura di lavoro dependendo dello strumento che verrà utilizzato per lo sviluppo delle strisce (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO o Dynablot Heat). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web:

<https://operon.es/products-protocols/>

Nel denaturazione fase, 12,5 µl di denaturazione buffer + 12,5 µl di PCR verrà erogata nel vassoio.

Il prodotto è stato testato con diverse piattaforme di lavoro. Per vostra informazione si specificano i nomi commerciali delle piattaforme di lavoro utilizzate ma non implica l'uso esclusivo e dipendente di tali marchi commerciale. Il prodotto funziona correttamente durante l'utilizzo di una piattaforma che garantisce il programma di temperatura sollevata per il prodotto.

→ Vedere il sviluppo della striscia nell'allegato

3.- Interpretazione della striscia

Interpretazione della striscia può essere fatta visivamente, usando il schema per l'interpretazione incluso nel kit (vedere la procedure per ogni strumento) o automaticamente, utilizzando gli scanner BLOTriX R2 o BLOTriX S1 (BioSciTec).

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente le istruzioni per l'interpretazione automatica delle strisce con scanner (DO-09053004 "Instructions of use BLOTriX R2_S1"). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web:

<https://operon.es/products-protocols/>

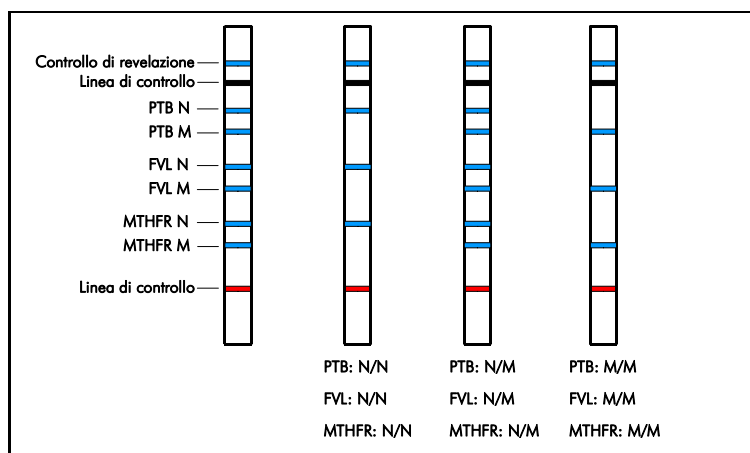
Importante: l'interpretazione automatica del risultato richiede sempre una verifica visiva delle strisce; bande molto deboli non potrebbero essere rilevate dallo strumento.

RISULTATI

Per ciascuno dei geni sono possibili tre risultati:

1. **Omozigote normale:** compare un'unica banda blu nella posizione associata alla sequenza normale del gene. I due cromosomi contengono la sequenza normale del gene (N/N).
2. **Eterozigote normale/mutato:** compaiono due bande blu nelle posizioni associate alla sequenza normale e a quella mutata del gene. Uno dei cromosomi contiene un gene con la sequenza normale e l'altro contiene un gene con la sequenza mutata (N/M).
3. **Omozigote mutato:** compare un'unica banda blu nella posizione associata alla sequenza mutata del gene. I due cromosomi contengono la sequenza mutata del gene (M/M).

Esempi di genotipizzazione utilizzando la striscia ThromboStrip



CONTROLLO DI QUALITÀ

La linea di controllo della rivelazione deve comparire sempre al di sopra della linea nera superiore. La sua eventuale assenza indicherà un problema nella fase di ibridazione/rivelazione del prodotto.

La striscia corrispondente al controllo di amplificazione negativo mostrerà soltanto la banda di controllo di rivelazione. Nel caso delle campioni di ADN, deve comparire in tutti i campioni almeno una banda blu per ciascun gene (a eccezione di eventuali casi di delezioni geniche) e al massimo due. L'assenza di bande associate ai geni indica un errore nella PCR (verificare la qualità del DNA controllando il prodotto di PCR su un gel di agarosio al 3%) o nell'ibridazione (verificare la temperatura di ibridazione).

PRESTAZIONI/ VALUTAZIONI INTERNE ED ESTERNE

Questo test deve essere utilizzato esclusivamente da professionisti qualificati e familiarizzati con i metodi di biologia molecolare.

Il test è stato saggiato su 156 campioni di DNA e i risultati sono 100 % coincisi con quelli ottenuti con altri metodi abituali di genotipizzazione (analisi di restrizione, sequenziamento).

POSSIBILI PROBLEMI

1. Sulla striscia non compare alcuna banda, nemmeno quella di controllo.

- Non si è atteso che il coniugato e/o il rivelatore raggiungessero la temperatura ambiente.
- Il coniugato e/o il rivelatore non sono stati aggiunti o sono stati aggiunti in quantità insufficiente.

2. Compare solo la linea della banda di controllo.

- Errore di amplificazione nella PCR (eseguire un controllo su gel di agarosio).
- Durante la fase di ibridazione il prodotto di PCR non è stato aggiunto o è stato aggiunto in quantità insufficiente.
- Temperatura non corretta del tampone di ibridazione/lavaggio 1 (superiore a quella indicata).
- Temperatura non corretta dell'incubatore (superiore a quella indicata).

3. Forte colore di fondo sulla striscia dopo la fase di rivelazione.

- La procedura di lavaggio non è stata eseguita correttamente (durata troppo breve, quantità di tampone insufficiente, tamponi freddi).

4. Colorazione non omogenea della striscia

- Agitazione inadeguata (controllare la programmazione del termomixer per piastre).
- Le strisce non sono rimaste completamente sommerse durante le incubazioni.

5. Risultati inattesi

- Temperatura di incubazione e/o dei tamponi/reagenti non corretta.
- Contaminazione nelle PCR (verificare con un controllo negativo).
- Contaminazione di canali adiacenti dovuta al passaggio di liquido da un canale all'altro durante l'aggiunta del tampone di ibridazione.

Nel grafico riportato di seguito sono mostrati in grigio gli intervalli di temperatura operativa (ibridazione/rivelazione; prova realizzata con il termomixer PST-60HL) con i quali si ottengono risultati adeguati in ciascuna delle bande (buona intensità di ibridazione, assenza di reazioni crociate).

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
PTB N							
PTB M							
FVL N							
FVL M							
MTHFR N							
MTHFR M							

SENSIBILITÀ

È stata valutata con vari lotti la quantità minima di DNA puro necessaria per eseguire una corretta genotipizzazione con il kit ThromboStrip. I risultati ottenuti hanno mostrato che la quantità minima di DNA nella PCR con cui è possibile ottenere risultati perfettamente leggibili è di 5-10 ng. Con quantità inferiori (fino a 2,5 ng) si ottengono bande molto deboli, che in alcuni casi sono difficili da visual

SPECIFICITÀ

La specificità del kit ThromboStrip è stata valutata analizzando 56 campioni di DNA, di genotipo noto, con tre diversi lotti di prodotto. In tutti i lotti la concordanza dei risultati del kit con quelli della genotipizzazione previa è stato il 100 %.

La specificità del kit ThromboStrip è stata valutata analizzando 100 campioni di DNA sottoposti a genotipizzazione mediante analisi di restrizione, sequenziamento o PCR in tempo reale con un lotto di prodotto. La concordanza di specificità con altri metodi di genotipizzazione è stato il 100 %.

EFFETTO HOOK

Il funzionamento del kit ThromboStrip è stato comprovato in presenza di quantità crescenti di DNA (fino a 5000 ng). Non sono stati osservati effetti di inibizione della PCR, né di riduzione dell'intensità delle bande ottenute, né comparsa di reazioni incrociate. I risultati sono stati soddisfacenti con tutte le quantità di DNA testate.

PRECISIONE INTRASAGGIO

Sono stati analizzati 5 replicati di 3 DNA diversi con 3 lotti di prodotto ThromboStrip. L'analisi è stata realizzata dalla stessa persona e sono stati ottenuti risultati identici per i replicati in tutti i casi, a dimostrazione dell'alta precisione intrasaggio di ThromboStrip.

PRECISIONE INTERGIORNALIERA

Sono stati analizzati 3 campioni di DNA, ciascuno in duplicato, con 3 lotti di prodotto ThromboStrip in 5 giorni consecutivi. L'analisi è stata realizzata dalla stessa persona e i risultati ottenuti per ciascun DNA sono stati uguali in tutti i casi, a dimostrazione dell'alta precisione intergiornaliera di ThromboStrip.

PRECISIONE INTERLABORATORIO

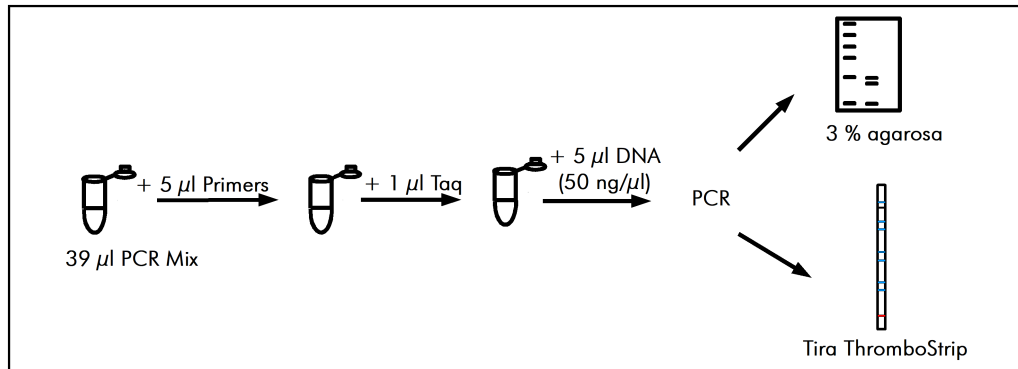
Tre persone hanno analizzato 3 campioni di DNA in duplicato con un lotto di ThromboStrip. L'analisi è stata realizzata lo stesso giorno e i risultati ottenuti sono stati identici, a dimostrazione dell'alta precisione interlaboratorio di ThromboStrip.

PRECISIONE INTERLOTTO

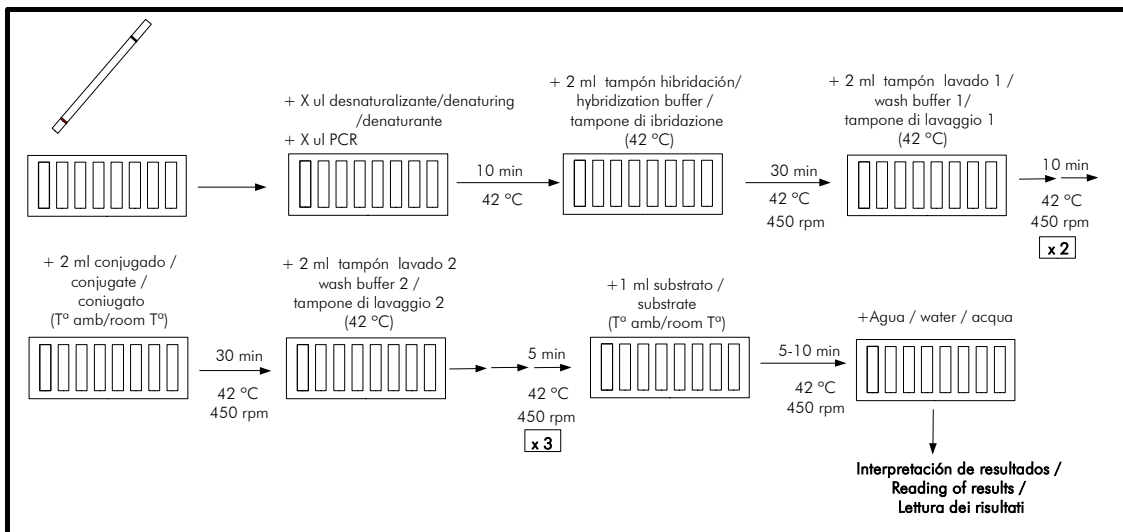
Sono stati analizzati 3 campioni di DNA in triplicato con tre lotti di prodotto ThromboStrip. L'analisi è stata realizzata dalla stessa persona nello stesso giorno e sono stati ottenuti risultati identici con tutti i lotti, a dimostrazione dell'alta precisione interlotto di ThromboStrip.

ANEXO / ANNEX / ALLEGATO

Esquema de preparación de PCR / PCR preparation diagram / Schema di preparazione della PCR



Desarrollo de la tira / Strip developing diagram / Sviluppo della striscia



BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES / BIBLIOGRAFIA

1. Bertina R.M. et al. "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C". Nature (1994). Vol 369: 64-67.
2. Poort S.R. et al. "A common genetic variation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis". Blood (1996). Vol 88: 3698-3703.
3. Frosst P. et al. "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase". Nature Genet (1995). Vol 10: 111-113.



Fecha de caducidad / Expiration date / Data di scadenza



Número de lote / Lot number / Numero di lotto



Uso diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use / Per uso diagnostico in vitro



Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/EC sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE relativa a dispositivi medico-diagnostici in vitro.



Número de catálogo / Catalogue number / Numero di catalogo



Leer instrucciones de uso / Please read pack inserts / Leggere le istruzioni d'uso



Fabricado por / Manufactured by / Prodotto da



Contenido suficiente para <n> ensayos / Contents sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi



Conservar a / Store at / Conservare a



Precaución / Caution / Precauzione



Reactivo corrosivo / Corrosive reagent / Reagente corrosivo



DO-09051001 Rev. 10 – 25.10.2018



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA

+ 34 976 503597