

Istruzioni per l'uso

RealStar[®] EHEC PCR Kit 2.0

01/2017 IT

RealStar[®]

EHEC PCR Kit 2.0

Per uso con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



292013



96



01 2017



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Contenuto

1.	Usò previsto	6
2.	Componenti del kit.....	6
3.	Conservazione.....	7
4.	Materiale e dispositivi richiesti e non forniti	8
5.	Informazioni generali	9
6.	Descrizione del prodotto	10
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale	11
7.	Avvertenze e precauzioni	12
8.	Procedura	14
8.1	Preparazione del campione	14
8.2	Preparazione della Master Mix.....	15
8.3	Preparazione della reazione	17
9.	Programmazione dello strumento PCR in tempo reale	18
9.1	Impostazioni	18
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti)	18
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti	19
10.	Analisi dei dati.....	19
10.1	Validità dei test diagnostici	20
10.1.1	Test diagnostico valido	20
10.1.2	Test diagnostico invalido	20
10.2	Interpretazione dei risultati	21
10.2.1	Analisi qualitativa	21
11.	Dati di performance	22

11.1	Sensibilità analitica.....	22
11.2	Specificità analitica.....	24
11.3	Precisione	25
12.	Limitazioni	27
13.	Controllo di qualità	28
14.	Assistenza tecnica	28
15.	Letteratura	28
16.	Marchi e brevetti.....	29
17.	Spiegazione dei simboli	30

1. Uso previsto

Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro* qualitativo, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la differenziazione del DNA specifico di Tossina di Shiga 1 (*stx1*) e Tossina di Shiga 2 (*stx2*) di *Escherichia coli* e di Antigene plasmidico di invasione H (*ipaH*) di *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Shigella* spp.

2. Componenti del kit

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiale]
Blu	Master A	8	60
Viola	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rosso	Positive Control	1	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

3. Conservazione

- Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare Altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2°C e +8°C non deve superare un periodo di due ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Vortex mixer
- Piastre di reazione o provette di reazione appropriate a 96 pozzetti con materiale di chiusura (ottico) corrispondente
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro (monouso)
- Guanti senza polvere (monouso)

NOTA



Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

NOTA



Si consiglia di utilizzare il rotore a 72 pozzetti con le appropriate provette di reazione da 0,1 ml, se si utilizza il Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o il Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informazioni generali

L'*Escherichia coli* enteroemorragica (EHEC) è un batterio patogeno umano caratterizzato dalla capacità di produrre tossine di Shiga 1 e/o Shiga 2. I sintomi dell'infezione da EHEC possono includere colite emorragica e sindrome emolitico-uremica (HUS). I ceppi di EHEC possono avere solo uno o entrambi i geni di codifica della tossina di Shiga (*stx1* e/o *stx2*). Il gene che codifica la tossina di Shiga 1 (*stx1*) è presente anche nella *Shigella dysenteriae* di tipo 1, che può causare gli stessi sintomi della EHEC. Non tutte le varianti genetiche della tossina di Shiga 1 e 2 sono associate a una malattia grave, per es. *stx1c*, *stx1d*, *stx2f* e *stx2ev* [1, 2, 3, 4]. È possibile distinguere la *Shigella* spp. dall'EHEC per mezzo del marcatore "antigene H plasmidico di invasione" (*ipaH*). L'*ipaH* è presente anche nell'*Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), che non possiede nessuno dei due geni di codifica della tossina di Shiga, ma che può anch'essa causare diarrea emorragica.

Una diagnosi accurata di infezione da EHEC è essenziale per gestione del paziente, controllo dell'infezione ed epidemiologia.

- [1] http://www.bfr.bund.de/cm/343/bewertung_des_virulenzpotenzials_von_shigatoxin_2estx2_e_bildenden_e_coli_staemmen.pdf.
- [2] Friedrich AW1, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis*. 1 gennaio 2002;185(1):74-84. Epub 14 dicembre 2001.
- [3] Scheiring J1, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. Ottobre 2008;23(10):1749-60. doi: 10.1007/s00467-008-0935-6. Epub 13 agosto 2008.
- [4] Friesema I1, van der Zwaluw K, Schuurman T, Kooistra-Smid M, Franz E, van Duynhoven Y, van Pelt W. Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. *Euro Surveill*. 1 maggio 2014;19(17):26-32.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro* qualitativo, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la differenziazione del DNA specifico di Tossina di Shiga 1 (*stx1*) e Tossina di Shiga 2 (*stx2*) di *Escherichia coli* e di Antigene plasmidico di invasione H (*ipaH*) di *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e *Shigella* spp.

Il test include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione della PCR e per confermare l'integrità dei reagenti del kit.

Le varianti della tossina Shiga *stx1c*, *stx1d*, *stx2f* e *stx2ev*, che non hanno dimostrato di essere associate a una malattia grave, non possono essere rilevate con questo test.

La tecnologia PCR in tempo reale utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target specifiche e sonde target specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono marcate con un reporter fluorescente (fluoroforo) ed un quencher.

Le sonde specifiche per il DNA di *stx1* sono marcate con il fluoroforo Cy[®]5, le sonde specifiche per il DNA *stx2* sono marcate con il fluoroforo FAM[™] e le sonde specifiche per il DNA di *ipaH* sono marcate con il fluoroforo ROX[™]. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE[™].

L'uso di sonde collegate a coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo del DNA specifico di *stx1*, *stx2* e *ipaH*, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende due processi in un'unica provetta:

- Amplificazione per PCR del DNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control [*stx1* + *stx2* + *ipaH*]
- Water (PCR grade)

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento del DNA specifico di *stx1*, *stx2*, *ipaH* e del controllo interno in una singola reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di PCR in tempo reale:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

7. Avvertenze e precauzioni

Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.

- Prima del primo utilizzo, controllare il prodotto e i suoi componenti per:
 - Integrità
 - Completezza rispetto a numero, tipo e riempimento (vedere il capitolo 2. Componenti del kit)
 - Etichette corrette
 - Congelamento all'arrivo
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- I campioni devono essere sempre trattati come infettivi e/o pericolosi secondo le procedure di laboratorio sicure.
- Indossare guanti protettivi monouso senza polvere, un camice da laboratorio e una protezione per gli occhi durante la manipolazione dei campioni.
- Evitare la contaminazione microbica e nucleasica (DNasi/RNasi) dei campioni e dei componenti del kit.
- Utilizzare sempre puntali per pipette monouso privi di DNasi/RNasi.
- Indossare sempre guanti protettivi usa e getta senza polvere quando si maneggiano i componenti del kit.
- Utilizzare aree di lavoro separate e isolate per (i) preparazione del campione, (ii) impostazione della reazione e (iii) attività di amplificazione/rilevazione. Il flusso di lavoro in laboratorio dovrebbe procedere in modo unidirezionale. Indossare sempre guanti monouso in ogni area e cambiarli prima di entrare in un'altra area.
- Dedicare materiali di consumo e attrezzature alle aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.

- Non aprire le provette/piastre di reazione dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Controlli aggiuntivi possono essere testati secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.
- Non sterilizzare in autoclave le provette dopo la PCR, poiché ciò non distrugge gli acidi nucleici amplificati e rischierà di contaminare l'area di laboratorio.
- Non utilizzare componenti del kit che hanno superato la data di scadenza.
- Eliminare i rifiuti dei campioni e del test in base alle normative di sicurezza locali.

NOTA



Le varianti della tossina Shiga stx1c, stx1d, stx2f e stx2ev, che non hanno dimostrato di essere associate a una malattia grave, non possono essere rilevate con questo test.

8. Procedura

8.1 Preparazione del campione

Il DNA estratto è il materiale di partenza per il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0.

La qualità del DNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero saggio. È necessario garantire che il sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia PCR in tempo reale. I seguenti kit e sistemi sono indicati per l'estrazione dell'acido nucleico:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 deve essere convalidata dall'utente.

Se si utilizza una procedura di preparazione del campione basata su colonna di centrifugazione che include tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si consiglia di effettuare un'ulteriore fase di centrifugazione per 10 minuti a circa 17000 x g (~ 13000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

ATTENZIONE

Se il sistema di preparazione dei campioni utilizza tamponi di lavaggio contenenti etanolo, assicurarsi di eliminare eventuali tracce di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale.

ATTENZIONE

L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro servizio di assistenza tecnica (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

8.2 Preparazione della Master Mix

Tutti i reagenti e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex) e centrifugati brevemente prima dell'uso.

Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato o come controllo di inibizione della PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della PCR.

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione del campione, impostare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
Volume Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere l'IC durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- ▶ Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se l'acido nucleico deve essere eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, devono essere aggiunti 6 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.
- ▶ Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, preparare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume Master Mix	20 µl	240 µl

ATTENZIONE



Se l'IC (controllo interno) è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, almeno il controllo negativo deve includere l'IC.

ATTENZIONE

Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, non aggiungere mai l'IC direttamente al campione.

8.3 Preparazione della reazione

- ▶ Pipettare 20 µl di Master Mix in ciascuno dei pozzetti richiesti di un'appropriata piastra di reazione ottica a 96 pozzetti o di un'appropriata provetta di reazione ottica.
- ▶ Aggiungere 10 µl di campione (eluato dall'estrazione dell'acido nucleico) o 10 µl del controllo (controllo positivo o negativo).

Preparazione della reazione	
Master Mix	20 µl
Campione o controllo	10 µl
Volume totale	30 µl

- ▶ Assicurarsi che ogni controllo positivo e almeno un controllo negativo siano utilizzati ad ogni esecuzione del saggio.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

9.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di rampa	Predefinito
Riferimento passivo	Nessuno

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
DNA specifico di <i>stx1</i>	<i>stx1</i>	Cy [®] 5	(Nessuno)
DNA specifico di <i>stx2</i>	<i>stx2</i>	FAM [™]	(Nessuno)
DNA specifico di <i>ipaH</i>	<i>ipaH</i>	ROX [™]	(Nessuno)
Controllo interno (IC)	IC	JOE [™]	(Nessuno)

9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

- Impostare il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Fase	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Durata [min:sec]
Denaturazione	Mantenimento	1	-	95	02:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	58	00:45

10. Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

10.1 Validità dei test diagnostici

10.1.1 Test diagnostico valido

Un test diagnostico è **valido** se sono soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

Controllo	Canale			
	Cy [®] 5	FAM™	ROX™	JOE™
Controllo Positivo [<i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>ipaH</i>]	+	+	+	+/-*
Controllo negativo	-	-	-	+

* La presenza o l'assenza di un segnale nel canale JOE™ non è rilevante per la validità dell'esecuzione del test.

10.1.2 Test diagnostico invalido

Un test diagnostico **non è valido**, (i) se l'esecuzione non è stata completata o (ii) se una delle condizioni di controllo per un test diagnostico **valido** non è soddisfatta.

In caso di test diagnostici **non validi** ripetere i test utilizzando gli acidi nucleici purificati rimanenti o ricominciare dai campioni originali.

10.2 Interpretazione dei risultati

10.2.1 Analisi qualitativa

Canale				Interpretazione dei risultati
Cy [®] 5	FAM [™]	ROX [™]	JOE [™]	
+	-	-	+ [*]	Rilevato DNA specifico di <i>stx1</i> .
-	+	-	+ [*]	Rilevato DNA specifico di <i>stx2</i> .
+	+	-	+ [*]	Rilevato DNA specifico di <i>stx1</i> e <i>stx2</i> .
-	-	+	+ [*]	Rilevato DNA specifico di <i>ipaH</i> .
+	-	+	+ [*]	Rilevato DNA specifico di <i>stx1</i> e <i>ipaH</i> .
-	+	+	+ [*]	Rilevato DNA specifico di <i>stx2</i> e <i>ipaH</i> .
-	-	-	+	Nessun DNA specifico di <i>stx1</i> , <i>stx2</i> o <i>ipaH</i> rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di questi specifici DNA.
-	-	-	-	Inibizione della PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

* Il rilevamento del controllo interno nel canale di rilevamento di JOE[™] non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento di Cy[®]5, FAM[™] o nel canale di rilevamento di ROX[™]. Un elevato carico di DNA di target nel campione può portare segnali del controllo interno ridotti o assenti.

11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni analitiche del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è stata fatta utilizzando DNA quantificato specifico di *stx1*, di *stx2* e di *ipaH*.

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (Limite di rilevabilità: LoD) del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è definita come la concentrazione di DNA specifico di *stx1*, *stx2* o *ipaH* che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali di DNA *stx1* quantificato, *stx2* quantificato o *ipaH* quantificato.

Tab. 1: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *stx1*

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10,000	36	36	100
3,162	36	36	100
1,5	36	36	100
1,000	36	36	100
0,5	36	36	100
0,316	36	31	86
0,100	36	20	56
0,032	36	7	19
0,010	36	4	11
0,003	36	0	0

Tab. 2: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *stx2*

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10,000	18	18	100
3,162	18	18	100
1,5	18	18	100
1,000	18	18	100
0,5	18	17	94
0,316	18	17	94
0,100	18	7	39
0,032	18	4	22
0,010	18	1	16
0,003	18	2	11

Tab. 3: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di *ipaH*

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10,000	18	18	100
3,162	18	18	100
1,5	18	18	100
1,000	18	17	94
0,5	18	15	83
0,316	18	12	67
0,100	18	7	39
0,032	18	1	6
0,010	18	0	0
0,003	18	0	0

La sensibilità analitica del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è stata determinata dall'analisi Probit:

- Per il rilevamento di DNA specifico di *stx1*, la sensibilità analitica è di 0,48 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,33 - 0,77 copie/μl]
- Per il rilevamento di DNA specifico di *stx2*, la sensibilità analitica è di 0,69 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,30 - 3,92 copie/μl]
- Per il rilevamento di DNA specifico del virus *ipaH*, la sensibilità analitica è di 0,96 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,63 - 1,88 copie/μl]

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è assicurata dall'accurata selezione degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili per garantire che tutti i genotipi pertinenti di EHEC fossero rilevati.

La specificità analitica del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è stata valutata analizzando un pannello di DNA ed RNA genomico estratto da diversi patogeni gastrointestinali e flora commensale rilevati in intestino e feci.

Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Adenovirus umano
- Enterovirus 71
- Norovirus (GI)
- Norovirus (GII)
- Rotavirus
- Sapovirus
- Astrovirus
- Virus dell'epatite A
- Virus dell'epatite E
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter lari*
- *Citrobacter freundii*
- *Clostridium difficile*

- *Entamoeba histolytica*
- *Escherichia coli*
- *Giardia lamblia*
- *Listeria innocua*
- *Listeria ivanovii*
- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria seeligeri*
- *Listeria welshimeri*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*
- *Salmonella enteritidis*
- *Salmonella typhimurium*
- *Serratia marcescens*
- *Yersinia enterocolitica*

11.3 Precisione

La precisione del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è stata determinata come variabilità intra-dosaggio (variabilità all'interno di un esperimento), variabilità inter-dosaggio (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra lotti di produzione diversi). La variabilità totale è stata calcolata combinando le tre analisi.

I dati di variabilità sono espressi in termini di deviazione standard e coefficiente di variazione sulla base di ciclo di soglia (C_t) - valori per DNA specifico di tossina di Shiga 1 (*stx1*), tossina di Shiga 2 (*stx2*) e antigene H plasmidico di invasione (*ipaH*) e del controllo interno. Sono stati analizzati dodici replicati (*stx1*) e sei replicati (*stx2*, *ipaH*) per campione e per esperimento.

Tab. 4: Dati di precisione per DNA specifico di *stx1*, *stx2* e *ipaH*

<i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>ipaH</i>		Ciclo soglia medio (C _t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	<i>stx1</i>	28,48	0,09	0,31
	<i>stx2</i>	28,51	0,13	0,45
	<i>ipaH</i>	29,23	0,12	0,41
Variabilità inter-dosaggio	<i>stx1</i>	28,46	0,09	0,30
	<i>stx2</i>	28,54	0,11	0,40
	<i>ipaH</i>	29,15	0,16	0,54
Variabilità inter-lotto	<i>stx1</i>	28,31	0,20	0,71
	<i>stx2</i>	28,42	0,17	0,60
	<i>ipaH</i>	29,20	0,09	0,32
Variabilità totale	<i>stx1</i>	28,35	0,18	0,63
	<i>stx2</i>	28,47	0,17	0,58
	<i>ipaH</i>	29,15	0,13	0,44

Tab. 5: Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Cicli soglia medi (C _t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	28,71	0,21	0,73
Variabilità inter-dosaggio	28,46	0,34	1,19
Variabilità inter-lotto	27,97	0,81	2,88
Variabilità totale	28,05	0,67	2,40

12. Limitazioni

- Per risultati ottimali è richiesta la rigorosa osservanza delle istruzioni per l'uso.
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- La buona pratica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. È necessario prestare la massima attenzione per preservare la purezza dei componenti del kit e le impostazioni di reazione. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie adeguate procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR (ad es. eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma *ipaH*, *stx1* e/o *stx2* coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.

13. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Altona Diagnostics GmbH, ogni lotto di RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

14. Assistenza tecnica

Per l'assistenza ai clienti, si prega di contattare il nostro supporto tecnico:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**

telefono: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Letteratura

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise e David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

16. Marchi e brevetti

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

















Il RealStar® EHEC PCR Kit 2.0 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.

Prodotto non concesso in licenza con Health Canada e non approvato o autorizzato dalla FDA.

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Lotto
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Indice
	Numero
	Componente
	Global Trade Identification Number
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione
	Note
	Versione

Note:

Note:

Note:

Note:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

