

## Istruzioni per l'uso

# RealStar<sup>®</sup> Malaria PCR Kit 1.0

08/2018 IT



# RealStar<sup>®</sup>

## Malaria PCR Kit 1.0

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)



341013



96



08 2018



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

## Contenuto

<b>1.</b>	<b>Usò previsto .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componenti del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Conservazione.....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Materiale e dispositivi richiesti e non forniti .....</b>	<b>7</b>
<b>5.</b>	<b>Informazioni generali .....</b>	<b>8</b>
<b>6.</b>	<b>Descrizione del prodotto .....</b>	<b>9</b>
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale .....	10
<b>7.</b>	<b>Avvertenze e precauzioni .....</b>	<b>11</b>
<b>8.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>12</b>
8.1	Preparazione del campione .....	12
8.2	Preparazione della Master Mix.....	13
8.3	Preparazione della reazione .....	15
<b>9.</b>	<b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b>	<b>16</b>
9.1	Impostazioni .....	16
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti) .....	16
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....	17
<b>10.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>17</b>
10.1	Validità dei test diagnostici .....	18
10.1.1	Test diagnostico valido (qualitativo) .....	18
10.1.2	Test diagnostico invalido (qualitativo).....	18
10.2	Interpretazione dei risultati .....	19
10.2.1	Analisi qualitativa .....	19
<b>11.</b>	<b>Dati di performance .....</b>	<b>19</b>

11.1	Sensibilità analitica.....	19
11.2	Specificità analitica.....	20
11.3	Precisione .....	21
11.4	Valutazione diagnostica .....	22
<b>12.</b>	<b>Limitazioni .....</b>	<b>24</b>
<b>13.</b>	<b>Controllo di qualità .....</b>	<b>25</b>
<b>14.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>25</b>
<b>15.</b>	<b>Letteratura .....</b>	<b>25</b>
<b>16.</b>	<b>Marchi e brevetti.....</b>	<b>26</b>
<b>17.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>27</b>

## 1. Uso previsto

Il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento del DNA specifico della specie *Plasmodium* comprese le cinque specie umane patogene *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*.

## 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® Malaria PCR Kit 1.0 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 (vedere capitolo 8.1 Preparazione del campione)
- 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

La malaria è tra le più importanti malattie infettive al mondo. Ogni anno vengono infettate circa 250 milioni di persone, e la maggior parte dei casi si presenta in Africa, Asia e Sud America. Ogni anno muoiono a causa della malaria da 800.000 a 1,2 milioni di persone (fonte RKI, 2012).

La malaria è una malattia infettiva trasmessa da vettore causata da parassiti eucarioti del genere *Plasmodium*, che vengono diffusi alle persone attraverso le punture di zanzare *Anopheles* infette. Le infezioni possono presentarsi anche in e attorno agli aeroporti, attraverso l'importazione non riconosciuta di zanzare infette negli aeromobili o nel bagaglio dei viaggiatori (malaria d'aeroporto e malaria da bagaglio). L'infezione può avvenire anche attraverso la donazione di sangue infetto.

Vi sono cinque specie patogene umane note: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. La malaria è una malattia febbrile acuta. In un soggetto non immune, i sintomi compaiono da 7 a 15 giorni dopo l'infezione. I primi sintomi, febbre, cefalea, brividi e vomito, possono essere lievi e difficili da riconoscere. I sintomi spesso vengono erroneamente diagnosticati come raffreddore o infezione gastrointestinale. Se non viene trattata, la malaria può aggravarsi portando spesso al decesso. Sia con *P. vivax* che con *P. ovale* possono presentarsi recidive cliniche da settimane a mesi dopo la prima infezione. Questi nuovi episodi si presentano a partire da forme epatiche dormienti note come ipnozoiti. Nelle aree in cui la malaria è endemica, le persone possono sviluppare una parziale immunità che permette la presentazione di infezioni asintomatiche.

Il miglior trattamento disponibile contro la malaria, e in particolare per le infezioni da *P. falciparum*, è una terapia combinata a base di artemisina (ACT).



## 6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento del DNA specifico della specie *Plasmodium* comprese le cinque specie umane patogene *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*.

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.

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 *Plasmodium* spp. sono marcate con il fluoroforo FAM™. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde marcate con coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo del DNA specifico di *Plasmodium* spp., 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® Malaria PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- 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 *Plasmodium* spp. e del controllo interno in una singola reazione.

### 6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 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.

## 8. Procedura

### 8.1 Preparazione del campione

Il DNA estratto è il materiale di partenza per il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0.

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)
- QIAamp® DNA Blood 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® Malaria PCR Kit 1.0 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® Malaria PCR Kit 1.0 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
<b>Volume Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

- ▶ 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
<b>Volume Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

#### 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
<b>Volume totale</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Assicurarsi che almeno un 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® Malaria PCR Kit 1.0 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	ROX™

### 9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
DNA specifico di <i>Plasmodium</i> spp.	<i>Plasmodium</i> spp.	FAM™	(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	10:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	58	00:45
			-	72	00:15

## 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® Malaria PCR Kit 1.0 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 (qualitativo)

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

Controllo	Canale	
	FAM™	JOE™
Controllo positivo	+	+/-*
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 (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo 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
FAM™	JOE™	
+	+*	Rilevato DNA specifico di <i>Plasmodium</i> spp.
-	+	Nessun DNA specifico di <i>Plasmodium</i> spp. rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico di <i>Plasmodium</i> spp.
-	-	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 JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento FAM™. Un elevato carico di DNA di *Plasmodium* spp. nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

## 11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni analitiche del RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 è stata effettuata utilizzando il "1° Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per i dosaggi basati su NAT (Nucleic Acid Amplification) per DNA di *Plasmodium falciparum*, codice NIBSC: 04/176".

### 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (Limite di rilevabilità: LoD) del RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 è definita come la concentrazione (UI/μl dell'eluato) di molecole di DNA specifico di *Plasmodium* spp. che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata con l'analisi delle diluizioni seriali del "1° Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per i dosaggi basati su NAT (Nucleic Acid Amplification) per DNA di *Plasmodium falciparum*".

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

Conc. in ingresso [UI/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10,000	12	12	100
3,160	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	8	67
0,100	12	4	33
0,032	12	4	33
0,010	12	1	8
0,003	12	0	0

La sensibilità analitica del RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 è stata determinata dall'analisi Probit:

- Per il rilevamento di DNA specifico di *Plasmodium* spp., la sensibilità analitica è di 1,27 UI/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,57 - 5,42 UI/μl]

## 11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 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 *Plasmodium* spp. pertinenti fossero rilevati.

Sono stati analizzati oltre un centinaio di diversi campioni di sangue intero negativi per *Plasmodium* con il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0, dopo estrazione del DNA per mezzo del kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Nessuno di essi presentava un segnale specifico (FAM™) positivo per il *Plasmodium* ma tutti hanno presentato un segnale positivo per il Controllo Interno (JOE™).

Inoltre, la specificità del RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 è stata valutata analizzando diverse *specie di Plasmodium*, oltre che un pannello di DNA/dell'RNA genomico estratto da specie correlate al *Plasmodium*, da altri patogeni a trasmissione ematica e da patogeni che causano sintomi simili.

Il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Virus BK
- Citomegalovirus
- Virus Dengue
- Virus Epstein-Barr
- Virus dell'epatite A
- Virus dell'epatite B
- Virus dell'epatite C
- Virus dell'epatite E
- Virus herpes simplex 1
- Virus herpes simplex 2
- Herpesvirus umano 6A
- Herpesvirus umano 6B
- Herpesvirus umano 7
- Herpesvirus umano 8
- Virus dell'immunodeficienza umana 1
- Parvovirus umano B19
- Influenzavirus A
- Influenzavirus B
- Virus JC
- Virus Varicella-zoster
- West Nile virus
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma cruzi*

### 11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 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 della concentrazione per DNA specifico di *Plasmodium* spp. e sulla base dei valori di ciclo soglia ( $C_t$ ) in termini di controllo interno. Almeno sei replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

**Tab. 2:** Dati di precisione per il rilevamento del DNA specifico di *Plasmodium* spp.

<i>Plasmodium</i> spp.	Ciclo soglia medio ( $C_t$ )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	29,05	0,18	0,63
Variabilità inter-dosaggio	30,77	0,16	0,51
Variabilità inter-lotto	29,14	0,64	2,21
Variabilità totale	29,65	0,27	0,92

**Tab. 3:** Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio ( $C_t$ )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	23,45	0,14	0,61
Variabilità inter-dosaggio	25,87	0,33	1,26
Variabilità inter-lotto	23,46	0,14	0,62
Variabilità totale	24,26	0,11	0,43

## 11.4 Valutazione diagnostica

Il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0 è stato valutato in uno studio prospettico contro la l'esame al microscopio con "striscio e goccia spessa", il golden standard della diagnosi della malaria. 118 campioni, inviati per la diagnosi di routine della malaria, sono stati analizzati con il metodo dell'analisi al microscopio su "striscio a goccia spessa" e, in più, previa estrazione degli acidi nucleici (QIAamp® DNA Blood Mini Kit; QIAGEN), con il RealStar® Malaria PCR Kit 1.0.

**Tab. 4:** Risultati della valutazione della sensibilità e specificità diagnostica del RealStar® Malaria PCR Kit 1.0

		RealStar® Malaria PCR Kit 1.0	
		+	-
Metodo di riferimento	+	17	0
	-	3*	98

\* Tutti i campioni discrepanti sono stati identificati positivi per la specie di patogeno umano *Plasmodium* spp. con analisi delle sequenze

## 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 *Plasmodium* spp. 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® Malaria PCR Kit 1.0 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® Malaria PCR Kit 1.0 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); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, 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® Malaria PCR Kit 1.0 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.

© 2018 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:**



**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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

