

Istruzioni per l'uso

RealStar[®] Dengue RT-PCR Kit 3.0

01/2019 IT

RealStar[®]

Dengue RT-PCR Kit 3.0

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)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



283013



96



01 2019



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 | 11 |
| 6.1 | Strumenti per PCR in tempo reale | 13 |
| 7. | Avvertenze e precauzioni | 13 |
| 8. | Procedura | 15 |
| 8.1 | Preparazione del campione | 15 |
| 8.2 | Preparazione della Master Mix..... | 17 |
| 8.3 | Preparazione della reazione | 18 |
| 9. | Programmazione dello strumento PCR in tempo reale | 19 |
| 9.1 | Impostazioni | 19 |
| 9.2 | Sonde fluorescenti (coloranti) | 20 |
| 9.3 | Profilo termico e acquisizione dei coloranti | 20 |
| 10. | Analisi dei dati..... | 21 |
| 10.1 | Validità dei test diagnostici | 21 |
| 10.1.1 | Test diagnostico valido (qualitativo) | 21 |
| 10.1.2 | Test diagnostico invalido (qualitativo)..... | 21 |
| 10.2 | Interpretazione dei risultati | 22 |
| 10.2.1 | Analisi qualitativa | 22 |
| 11. | Dati di performance | 22 |

| | | |
|------------|--------------------------------------|-----------|
| 11.1 | Sensibilità analitica..... | 22 |
| 11.2 | Specificità analitica..... | 23 |
| 11.3 | Precisione | 24 |
| 12. | Limitazioni | 26 |
| 13. | Controllo di qualità | 27 |
| 14. | Assistenza tecnica | 27 |
| 15. | Letteratura | 27 |
| 16. | Marchi e brevetti..... | 28 |
| 17. | Spiegazione dei simboli | 29 |

1. Uso previsto

Il RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di virus Dengue (DENV).

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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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

Il *virus Dengue* (DENV) è una specie del genere *Flavivirus*, che fa parte della famiglia dei *Flaviviridae*. Questa specie può essere suddivisa in quattro sierotipi noti: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. [1] Il genoma è costituito da un RNA a singolo filamento positivo, lungo circa 10,7 kb, avvolto da un nucleocapside e coperto da un pericapside lipidico. [2]

Il DENV è un arbovirus trasmesso dalle zanzare femmina della *specie Aedes*. Questa specie particolare di zanzara era originariamente endemica in Asia; tuttavia, in tempo recenti si è poi rapidamente diffusa in tutto il Nord e Sud America, in Africa, Europa e Australia, oltre che in diverse isole dell'oceano Pacifico e Indiano. [4] In queste regioni, ogni anno vengono infettate dal DENV più di 50 milioni di persone, 24000 delle quali muoiono a causa dell'infezione. Il DENV viene pertanto considerato uno dei patogeni virali trasmessi dalle zanzare più pericolosi per l'essere umano. La patogenicità del DENV è associata principalmente alla proteina del pericapside, che media il legame e l'entrata del virus nella cellula ospite. Questa proteina influisce inoltre sulle reazioni immunitarie dell'ospite, causando un danno cellulare. [3] Le infezioni da DENV spesso causano sintomi aspecifici che includono febbre e grave dolore articolare, che solitamente scompaiono senza complicazioni dopo un periodo che va da due a sette giorni. Tuttavia, l'infezione può anche portare ad altre condizioni più gravi, tra cui la febbre emorragica Dengue (DHF) e la sindrome da shock di Dengue (DSS), che spesso sono il risultato di infezioni sequenziali con più sierotipi virali. [2]

Quando un'infezione da DENV causa la febbre emorragica Dengue (DHF), i sintomi includono febbre alta, collasso circolatorio e fenomeni emorragici. È inoltre possibile che il paziente sviluppi encefalite, insufficienza epatica e miocardite. I pazienti colpiti possono presentare anche uno shock potenzialmente fatale, con forte riduzione di pressione arteriosa e frequenza cardiaca.

Le infezioni da DENV possono causare tuttavia anche la sindrome da shock di Dengue (DSS), che è accompagnata da perdita di plasma e vomito persistente che possono portare a uno shock fatale. Si tratta di una sindrome gravissima con un tasso di mortalità che arriva al 47%. [3] Fino ad ora non è disponibile nessun

trattamento specifico per i pazienti con infezione da DENV: ecco perché i pazienti possono essere trattati unicamente con misure di supporto per attenuare i sintomi e prevenire lo shock. [5]

La diagnosi clinica di infezione da DENV può essere difficile, a causa dei sintomi spesso aspecifici dell'infezione. La verifica di laboratorio della diagnosi è pertanto essenziale. Uno dei metodi utilizzati più comunemente per il rilevamento del virus è la RT-PCR, un metodo rapido, sensibile e affidabile in grado di offrire risultati fin dall'inizio della malattia. [6]

L'infezione causata da uno dei quattro sierotipi di DENV non conferisce immunità crociata per gli altri sierotipi, quindi è possibile subire fino a quattro infezioni da DENV, e questo pone i pazienti nelle aree endemiche particolarmente a rischio. Le infezioni secondarie con altri sierotipi spesso portano allo sviluppo di condizioni più gravi, a causa degli effetti di amplificazione mediati dagli anticorpi. È pertanto necessario uno sforzo importante per sviluppare un vaccino in grado di mediare l'immunità contro diversi o tutti i sierotipi simultaneamente. Tuttavia, lo sviluppo di un vaccino di questo tipo è difficile. Finora lo sviluppo di un vaccino non ha avuto successo, perché non è possibile neutralizzare completamente gli anticorpi già presenti contro gli altri sierotipi. [7]

- [1] Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (1998). American Society for Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. Doi: 10.1128/CMR.11.3.480
- [2] Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R (1999). Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. American Society for Microbiology. *Journal of Virology*. Vol.73: 4738-4747.
- [3] Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL (2004). Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal*. 80: 588-601.
- [4] Lambrechts L, Scott TW e Gubler DJ (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus transmission. *Plos neglected tropical diseases*. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000646.
- [5] Rajapakse S, Rodrigo C e Rajapakse A. Treatment of dengue fever. *Infection and Drug Resistance*. 2012. 5: 103-112.

- [6] Muller DA, Depelenaire ACI e Young PR (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. J Infect Dis. 215 (suppl_2): 89-95.
- [7] Gosh A e Dar L (2015). Dengue vaccines: Challenges, development, current status and prospects. Indian Journal of Medical Microbiology 33: 3-15.

NOTA



A causa dell'evoluzione molecolare relativamente veloce dei virus RNA, sussiste un rischio intrinseco, per ogni sistema di test basato sulla RT-PCR, che un accumulo di mutazioni nel tempo possa portare a risultati falso-negativi.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di Virus Dengue (DENV).

La tecnologia RT-PCR in tempo reale utilizza la reazione della trascrittasi inversa (RT) per convertire l'RNA in DNA complementare (cDNA), la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target particolari 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 l'RNA di DENV 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 dell'RNA specifico di DENV, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende tre processi in un'unica provetta:

- Trascrittasi inversa dell'RNA target e del controllo interno in cDNA
- Amplificazione PCR del cDNA target e controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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, trascrittasi inversa, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire la trascrizione inversa, l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento dell'RNA specifico di DENV e del controllo interno in una singola reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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)
- CFX96™ Deep Well 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

L'RNA estratto è il materiale di partenza per il RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0.

La qualità dell'RNA 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® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato o come controllo di inibizione della RT-PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della RT-PCR.

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della RT-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 RT-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 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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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 |
|------------------------|------------|----------|-----------|
| RNA specifico di DENV | DENV | 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] |
|----------------------|--------------|-----------------------|--------------|------------------|------------------|
| Trascrizione inversa | Mantenimento | 1 | - | 55 | 20:00 |
| Denaturazione | Mantenimento | 1 | - | 95 | 02:00 |
| Amplificazione | Ciclaggio | 45 | - | 95 | 00:15 |
| | | | si | 55 | 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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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 RNA specifico di DENV. |
| - | + | Nessun RNA specifico di DENV rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di DENV. |
| - | - | Inibizione della RT-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 dell'RNA di DENV nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni di RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è stata effettuata utilizzando RNA genomico di virus Dengue, sierotipo 1.

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole dell'RNA specifico di DENV che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La determinazione della sensibilità analitica è stata effettuata con una serie di diluizioni dell'RNA derivato da virus Dengue.

Tab. 1: Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico di DENV

| Conc. in ingresso [copie/μl] | Numero di replicati | Numero di positivi | Tasso di successo [%] |
|------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| 316,200 | 24 | 24 | 100 |
| 100,000 | 23 | 23 | 100 |
| 31,620 | 24 | 24 | 100 |
| 10,000 | 24 | 24 | 100 |
| 3,162 | 24 | 17 | 70,8 |
| 1,000 | 24 | 12 | 50 |
| 0,316 | 24 | 2 | 8,3 |
| 0,100 | 24 | 0 | 0 |

La sensibilità analitica del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è stata determinata dall'analisi Probit:

- Per il rilevamento dell'RNA specifico di virus Dengue, la sensibilità analitica è di 7,04 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 4,37 - 15,39 copie/μl]

11.2 Specificità analitica

Reattività

La specificità analitica relativa alla reattività del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è stata valutata da un pannello dell'RNA genomico estratto da sierotipi di virus Dengue.

Il RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è in grado di rilevare l'RNA dei seguenti sierotipi di virus Dengue:

- Virus Dengue 1
- Virus Dengue 2
- Virus Dengue 3
- Virus Dengue 4

Reattività crociata

La specificità analitica rispetto alla reattività crociata di RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 è stata valutata analizzando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da virus correlati ai virus Dengue e ad altri organismi che causano sintomi simili a quelli dei virus Dengue.

Il RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Virus della febbre emorragica Crimea-Congo
- Virus Chikungunya
- Virus Ebola
- Virus dell'epatite C
- Virus dell'encefalite giapponese
- Virus Lassa
- Virus Marburg
- Virus dell'encefalite della Murray Valley
- Usutu virus
- West Nile virus
- Virus della febbre gialla
- Virus Zika
- *Plasmodium falciparum*

11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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 del ciclo soglia (C_t) - valori. 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 dell'RNA specifico di DENV

| DENV | Ciclo soglia medio (C _t) | Deviazione standard | Coefficiente di variazione [%] |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Variabilità intra-dosaggio | 31,64 | 0,19 | 0,61 |
| Variabilità inter-dosaggio | 31,37 | 0,31 | 1,00 |
| Variabilità inter-lotto | 31,35 | 0,28 | 0,89 |
| Variabilità totale | 31,45 | 0,28 | 0,90 |

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 | 30,17 | 0,17 | 0,56 |
| Variabilità inter-dosaggio | 30,14 | 0,13 | 0,43 |
| Variabilità inter-lotto | 29,96 | 0,26 | 0,87 |
| Variabilità totale | 30,01 | 0,23 | 0,76 |

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 RT-PCR (ad es. eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma DENV 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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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® Dengue RT-PCR Kit 3.0 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.

© 2019 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:

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

