

## Istruzioni per l'uso

# RealStar<sup>®</sup> HHV-6 PCR Kit 1.0

09/2018 IT



# RealStar®

## HHV-6 PCR Kit 1.0

Per uso con

m2000rt (Abbott Diagnostics)

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)



311013



96



09 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>7</b>
<b>4.</b>	<b>Materiale e dispositivi richiesti e non forniti .....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Informazioni generali .....</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Descrizione del prodotto .....</b>	<b>9</b>
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale .....	12
6.2	Tipi di campioni .....	13
<b>7.</b>	<b>Avvertenze e precauzioni .....</b>	<b>13</b>
<b>8.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>15</b>
8.1	Preparazione del campione .....	15
8.2	Preparazione della Master Mix.....	16
8.3	Preparazione della reazione .....	18
<b>9.</b>	<b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b>	<b>19</b>
9.1	Impostazioni .....	19
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti) .....	19
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....	20
<b>10.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>20</b>
10.1	Validità dei test diagnostici .....	21
10.1.1	Test diagnostico valido (qualitativo) .....	21
10.1.2	Test diagnostico invalido (qualitativo).....	21
10.1.3	Test diagnostico valido (quantitativo) .....	22
10.1.4	Test diagnostico invalido (quantitativo) .....	22
10.2	Interpretazione dei risultati .....	23

10.2.1	Analisi qualitativa .....	23
10.2.2	Analisi quantitativa .....	23
<b>11.</b>	<b>Dati di performance .....</b>	<b>25</b>
11.1	Sensibilità analitica.....	25
11.2	Specificità analitica.....	28
11.3	Range lineare.....	28
11.4	Precisione .....	31
11.5	Valutazione diagnostica .....	33
<b>12.</b>	<b>Limitazioni .....</b>	<b>34</b>
<b>13.</b>	<b>Controllo di qualità .....</b>	<b>35</b>
<b>14.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>35</b>
<b>15.</b>	<b>Letteratura .....</b>	<b>35</b>
<b>16.</b>	<b>Marchi e brevetti.....</b>	<b>36</b>
<b>17.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>37</b>

## 1. Uso previsto

Il RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento, la differenziazione e la quantificazione del DNA specifico di herpesvirus umano 6A (HHV-6A) e di herpesvirus umano 6B (HHV-6B).

## 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	QS1-4*	4	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

\* Il RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 contiene Standard di quantificazione (QS) per HHV-6A e HHV-6B a quattro diverse concentrazioni (vedere il capitolo 6. Descrizione del prodotto)

Internal Control (IC) = Controllo interno

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

### 3. Conservazione

- Il RealStar® HHV-6 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  $-25^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$  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  $+2^{\circ}\text{C}$  e  $+8^{\circ}\text{C}$  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 il capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato (vedere il 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

*Herpesvirus umano 6* (HHV-6) è il nome generale dei due sottotipi strettamente correlati HHV-6A e HHV-6B. L'infezione primaria con HHV-6 avviene in genere prima dei due anni e il virus rimarrà latente nel corpo. I disturbi nei bambini comprendono febbre, diarrea ed esantema subitum (nota soprattutto come roseola). La prima infezione può raramente provocare convulsioni febbrili, encefalite o convulsioni intrattabili.

L'HHV-6 latente può essere riattivato in età avanzata. La riattivazione è stata associata a molte manifestazioni cliniche che possono verificarsi in tutte le parti del corpo, inclusi cervello, polmone, cuore, rene e tratto gastrointestinale. Sebbene rara, la riattivazione dell'HHV-6 nel cervello può causare disfunzione cognitiva, disabilità permanente e morte.

Mentre l'HHV-6B può causare problemi nei pazienti immunocompromessi e nei bambini negli Stati Uniti, in Giappone e in Europa, l'HHV-6A è prevalentemente presente nei bambini in Africa. Quest'ultimo è anche più frequente nei pazienti con malattie neurologiche croniche come le malattie neuroinfiammatorie come la sclerosi multipla (SM) e la romboencefalite.

## 6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento, la differenziazione e la quantificazione del DNA specifico di herpesvirus umano 6A (HHV-6A) e di herpesvirus umano 6B (HHV-6B).

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 HHV-6A sono marcate con il fluoroforo FAM™ mentre le sonde specifiche per il DNA di HHV-6B sono marcate con il fluoroforo Cy®5. 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 di DNA specifico di HHV-6A e HHV-6B, 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 tramite PCR del DNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo dei prodotti di PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4\*
- Water (PCR grade)

\* Standard di quantificazione (QS) in quattro concentrazioni diverse

Internal Control = Controllo interno

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 di DNA specifico di HHV-6A, HHV-6B e del controllo interno in una singola reazione.

Gli standard di quantificazione contengono concentrazioni standardizzate di DNA specifico per HHV-6A e HHV-6B. Lo standard di quantificazione per il DNA specifico di HHV-6B è stato calibrato rispetto al 1° Standard Internazionale OMS per il DNA dell'Herpesvirus umano 6B (HHV-6B) per analisi basate sulla tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) (codice NIBSC: 15/266) [1].

Per calibrare il materiale positivo specifico per HHV-6A del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0, è stato utilizzato un test di rilevazione dell'acido nucleico che non differenzia HHV-6A e HHV-6B (RealStar® HHV-4/-5/-6 PCR Kit 1.0). La calibrazione è stata eseguita mediante analisi in parallelo con il materiale positivo specifico HHV-6A e il 1° Standard Internazionale OMS per il DNA dell'Herpesvirus umano 6B (HHV-6B) (codice NIBSC: 15/266). La calibrazione è stata confermata utilizzando RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0.

Gli standard di quantificazione possono essere utilizzati singolarmente come controlli positivi o insieme per generare una **curva standard**, che può essere utilizzata per determinare la concentrazione di DNA specifico di HHV-6A e/o di HHV-6B nel campione.

- [1] Sheila Govind, Jason Hockley, Clare Morris and the Collaborative Study Group. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHOECBS Report 217; WHO/BS/2017.2321.

Gli standard di quantificazione hanno le seguenti concentrazioni:

Standard di quantificazione	Concentrazione [UI/μl]	
	HHV-6A	HHV-6B
QS1	1,00E+04	1,00E+04
QS2	1,00E+03	1,00E+03
QS3	1,00E+02	1,00E+02
QS4	1,00E+01	1,00E+01

## 6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è stato sviluppato e validato per utilizzato con i seguenti strumenti PCR in tempo reale:

- m2000rt (Abbott Diagnostics)
- 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)

## 6.2 Tipi di campioni

I seguenti tipi di campione sono stati validati con RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0:

- Plasma umano EDTA
- Sangue intero umano

Se si applica un'appropriata procedura di estrazione degli acidi nucleici, è possibile utilizzare ulteriori tipi di campione insieme al kit RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0. L'idoneità della procedura di estrazione degli acidi nucleici deve essere validata dall'utente.

## 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® HHV-6 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)
- 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® HHV-6 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® HHV-6 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 (Standard di quantificazione, 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 ogni controllo positivo (QS) e almeno un controllo negativo siano utilizzati per ogni Master Mix e esecuzione del saggio.
- ▶ Ai fini della quantificazione, tutti gli standard di quantificazione (da QS1 a QS4) dovrebbero essere utilizzati.
- ▶ 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 1.000 x g (~ 3.000 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® HHV-6 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 HHV-6A	HHV-6A	FAM™	(Nessuno)
DNA specifico HHV-6B	HHV-6B	Cy®5	(Nessuno)
Controllo interno	IC	JOE™	(Nessuno)

### 9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

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

	Fase	Ripetizioni ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Durata [min:sec]
Denaturazione	Mantenimento	1	-	95	10:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	58	01:00

## 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® HHV-6 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™	Cy®5	JOE™
Controllo positivo (QS)	+	+	+/-*
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.

### 10.1.3 Test diagnostico valido (quantitativo)

Un test diagnostico **quantitativo** è **valido** se sono soddisfatte tutte le condizioni di controllo per l'esecuzione di un test diagnostico **qualitativo valido** [vedere il capitolo 10.1.1 Test diagnostico valido (qualitativo)]. I risultati della **quantificazione** sono **validi** se la **curva standard** generata raggiunge il seguente valore del parametro di controllo:

Parametro	Valore valido
R square ( $R^2$ )	$\geq 0,98$

#### NOTA



*Non tutti gli strumenti PCR in tempo reale visualizzano il valore di ( $R^2$ ). Per informazioni dettagliate, consultare il manuale dell'utente del rispettivo strumento.*

### 10.1.4 Test diagnostico invalido (quantitativo)

Un test diagnostico **quantitativo non è valido**, (i) se il test non è stato completato o (ii) se non sono soddisfatte le condizioni di controllo per un test diagnostico **quantitativo valido**.

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™	Cy®5	JOE™	
+	+ <sup>1</sup>	+*	Rilevato DNA specifico HHV-6A e HHV-6B.
+	- <sup>1</sup>	+*	Rilevato DNA specifico HHV-6A.
-	+	+*	Rilevato DNA specifico HHV-6B.
-	-	+	Non è stato rilevato DNA specifico né HHV-6A né HHV-6B. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico per HHV-6A o HHV-6B.
-	-	-	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 del canale di rilevamento FAM™ o del canale di rilevamento Cy®5. Un elevato carico di DNA HHV-6A e/o HHV-6B nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

<sup>1</sup> A causa di nuovi dati di sequenza, non è possibile escludere la reattività crociata del sistema di rilevamento specifico HHV-6B con alcuni ceppi di HHV-6A. Questi ceppi causeranno un debole segnale nel canale di rilevamento HHV-6B (Cy®5) oltre al segnale nel canale di rilevamento HHV-6A (FAM™).

### 10.2.2 Analisi quantitativa

Il RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 include quattro standard di quantificazione (QS). Per generare una **curva standard** per l'analisi quantitativa, questi devono essere definiti come **standard** con concentrazioni appropriate (vedere il capitolo 6. Descrizione del prodotto). Utilizzando **standard** di concentrazioni note è possibile generare una curva standard per l'analisi quantitativa.

$$C_t = m \cdot \log(N_0) + b$$

$C_t$  = Ciclo soglia

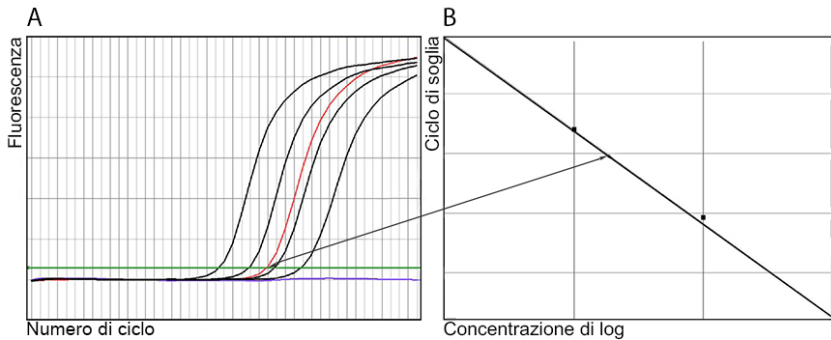
$m$  = Pendenza

$N_0$  = Concentrazione iniziale

$b$  = Intercetta

È possibile quindi determinare la concentrazione non nota di campioni positivi a seconda della curva standard.

$$N_0 = 10^{(C_t - b) / m}$$



**Figura 1:** Standard di quantificazione (nero), un campione positivo (rosso) e un negativo (blu) visualizzati in diagramma di amplificazione [A] e analisi della curva standard [B]

Per determinare la **carica virale del campione originale**, è necessario applicare la seguente formula:

$$\text{Carica virale (campione) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (Eluato) [\mu l]} \cdot \text{Carica virale (Eluato) [UI/\mu l]}}{\text{Volume iniziale campione [ml]}}$$



**NOTA**

*La concentrazione del "Campione" è visualizzata in UI/μl e si riferisce alla concentrazione nell'eluato.*

## 11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è stata effettuata utilizzando DNA specifico quantificato HHV-6A (ceppo GS) e DNA specifico HHV-6B (ceppo Z-29).

### 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole di DNA specifico HHV-6A o HHV-6B che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali di DNA HHV-6A quantificato e di DNA HHV-6B quantificato.

**Tab. 1:** Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di HHV-6A

Conc. in ingresso [copie/ $\mu$ l]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10,000	30	30	100
3,162	30	30	100
1,500	30	30	100
1,000	30	28	93
0,500	30	23	77
0,316	30	17	57
0,100	30	13	43
0,032	30	4	13
0,010	30	2	7
0,003	30	0	0
0,001	30	0	0

**Tab. 2:** Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di HHV-6B

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,500	24	23	95
1,000	28	26	93
0,500	24	21	88
0,316	24	13	54
0,100	24	8	33
0,032	24	4	17
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0
0,001	24	0	0

La sensibilità analitica del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è stata determinata dall'analisi Probit:

- Per il rilevamento del DNA specifico di HHV-6A, la sensibilità analitica è di 1,49 copie/μl eluato [intervallo di confidenza del 95% (CI): 0,98 - 2,63 copie/μl]
- Per il rilevamento del DNA specifico di HHV-6B, la sensibilità analitica è di 1,35 copie/μl eluato [intervallo di confidenza del 95% (CI): 0,89 - 2,47 copie/μl]

## 11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® HHV-6 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 HHV-6A e HHV-6B pertinenti fossero rilevati.

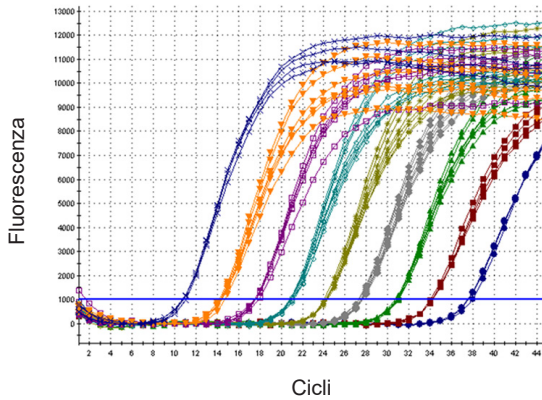
Il RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Virus BK
- Citomegalovirus
- Virus Epstein-Barr
- Virus epatite A
- Virus epatite B
- Virus epatite C
- Virus herpes simplex 1
- Virus herpes simplex 2
- Herpesvirus umano 7
- Herpesvirus umano 8
- Parvovirus umano B19
- Virus JC
- Virus della varicella-zoster

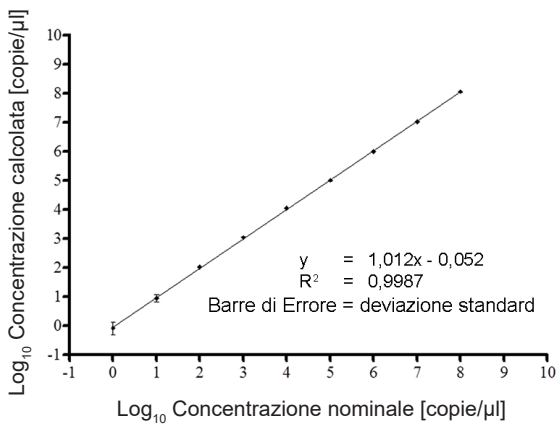
## 11.3 Range lineare

Il range lineare del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 è stato valutato analizzando una serie di diluizioni logaritmiche di DNA specifico HHV-6A e HHV-6B utilizzando concentrazioni che vanno da 1E+08 a 1E+00 copie/μl. Sono stati analizzati almeno sei replicati per diluizione.

**A**

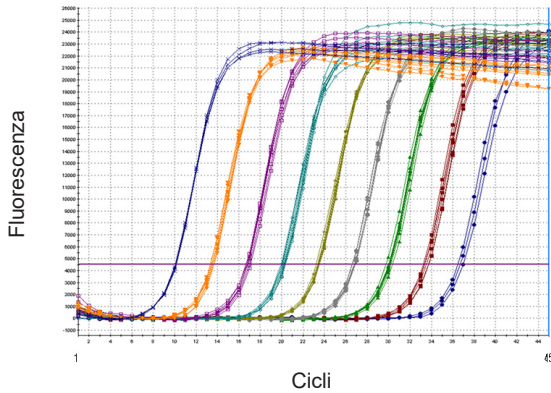


**B**

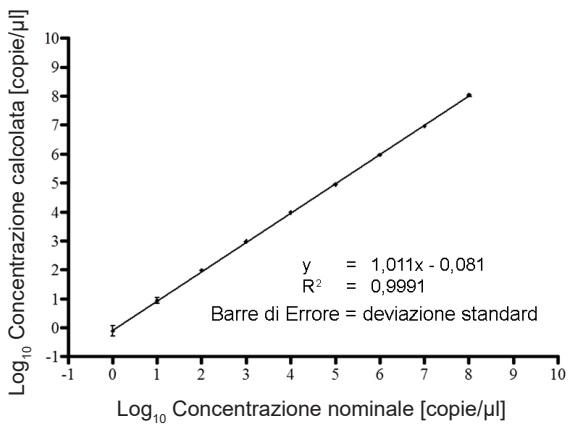


**Figura 2:** Curve di amplificazione [A] e regressione lineare [B] di una serie di diluizioni di DNA specifico HHV-6A analizzate

**A**



**B**



**Figura 3:** Curve di amplificazione [A] e regressione lineare [B] di una serie di diluizioni di DNA specifico HHV-6B analizzate

Il range lineare del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 per DNA specifico HHV-6A e HHV-6B si estende su un intervallo di almeno **otto** ordini di grandezza.

## 11.4 Precisione

La precisione del RealStar® HHV-6 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. I dati si basano sull'analisi di quantificazione di concentrazioni definite di DNA specifico HHV-6A e HHV-6B e sul valore del ciclo di 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. 3:** Dati di precisione per il rilevamento del DNA specifico di HHV-6A e HHV-6B

HHV-6A e HHV-6B		Conc. media [copie/ $\mu$ l]	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	HHV-6A	133,00	9,70	5,21
	HHV-6B	160,88	10,34	4,19
Variabilità inter-dosaggio	HHV-6A	137,00	9,68	7,05
	HHV-6B	160,63	8,42	5,24
Variabilità inter-lotto	HHV-6A	136,00	9,61	7,06
	HHV-6B	158,36	10,04	6,34
Variabilità totale	HHV-6A	138,00	9,22	6,67
	HHV-6B	159,03	8,96	5,64

**Tab. 4:** Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C <sub>t</sub> )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	27,80	0,05	0,10
Variabilità inter-dosaggio	27,40	0,22	0,81
Variabilità inter-lotto	27,50	0,34	1,25
Variabilità totale	27,50	0,28	1,02



## 11.5 Valutazione diagnostica

La sensibilità diagnostica e la specificità del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 vengono valutate regolarmente analizzando campioni di riferimento e diagnostici precedentemente analizzati con metodi di riferimento.

**Tab. 5:** Risultati della valutazione della sensibilità diagnostica e della specificità di RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0

		RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0		
		HHV-6A (+)	HHV-6B (+)	-
Metodo di riferimento	HHV-6A (+)	8	0	0
	HHV-6B (+)	0	19	0
	-	0	0	3

## 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 insufficienti, risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma HHV-6A e HHV-6B coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una sottoquantificazione e/o il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del RealStar® HHV-6 PCR Kit 1.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- A causa di nuovi dati di sequenza, non è possibile escludere la reattività crociata del sistema di rilevamento specifico HHV-6B con alcuni ceppi di HHV-6A. Queste deformazioni porteranno a un segnale debole nel canale di rilevamento HHV-6B (Cy<sup>®5</sup>) oltre al segnale nel canale di rilevamento HHV-6A (FAM<sup>™</sup>).

### **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® HHV-6 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® HHV-6 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:**



**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)

