

Istruzioni per l'uso

RealStar[®] HSV PCR Kit 1.0

06/2017 IT

RealStar[®]

HSV 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)



061013



96



06 2017



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

Contenuto

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

10.2.1	Analisi qualitativa	22
10.2.2	Analisi quantitativa	22
11.	Dati di performance	24
11.1	Sensibilità analitica.....	24
11.2	Specificità analitica.....	26
11.3	Range lineare.....	26
11.4	Precisione	29
12.	Limitazioni	31
13.	Controllo di qualità	32
14.	Assistenza tecnica	32
15.	Letteratura	32
16.	Marchi e brevetti.....	33
17.	Spiegazione dei simboli	34

1. Uso previsto

Il RealStar® HSV PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento simultaneo e la quantificazione del DNA specifico di virus dell'Herpes simplex 1 (HSV-1) e di virus dell'Herpes simplex 2 (HSV-2).

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	HSV-1 QS1-4*	4	250
Arancia	HSV-2 QS1-4*	4	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

* Il RealStar® HSV PCR Kit 1.0 contiene Standard di quantificazione (QS) per HSV-1 e HSV-2 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® HSV 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 $+2^{\circ}\text{C}$ 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

I virus dell'Herpes simplex 1 (HSV-1) e dell'Herpes simplex 2 (HSV-2) sono membri della famiglia degli *Herpesviridae* e, assieme al virus Varicella-zoster (VZV), sono classificati come *alphaherpesviridae*. HSV-1 e HSV-2 hanno un genoma costituito da DNA lineare a doppio filamento di circa 150 kbp. HSV-1 ed HSV-2 condividono oltre l'80% di identità nucleotidica entro la propria regione di codifica proteica.

Le infezioni da virus Herpes simplex si presentano in tutto il mondo senza alcuna distribuzione stagionale. Il virus si diffonde per contatto diretto con le secrezioni che lo contengono. La prevalenza di infezione da HSV-1 aumenta gradualmente dall'infanzia, raggiungendo l'80% e oltre negli anni seguenti, mentre la sieroprevalenza di HSV-2 resta bassa fino all'adolescenza. La maggior parte delle infezioni primarie da HSV-1 sono acquisite come subcliniche o non riconosciute. Le infezioni primarie da HSV-2 hanno come presentazione classica l'herpes genitale. L'infezione primaria da HSV-1 o HSV-2 è seguita dall'insediarsi della latenza nei gangli della radice dorsale. Periodicamente, il virus si riattiva e viaggia lungo l'assone nervoso fino a siti orali o genitali, causando il rilascio di virus infettivo e, in alcuni casi, la formazione di lesioni. Sebbene siano solitamente asintomatiche, le infezioni da HSV possono causare un ampio spettro di manifestazioni cliniche, tra cui herpes orale, herpes genitale, herpes neonatale, encefalite ed herpes oculare.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® HSV PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento simultaneo e la quantificazione del DNA specifico di virus dell'Herpes simplex 1 (HSV-1) e di virus dell'Herpes simplex 2 (HSV-2).

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 HSV-1 sono marcate con il fluoroforo FAM™ mentre le sonde specifiche per il DNA di HSV-2 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 HSV-1 e HSV-2, 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 PCR del DNA target e controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® HSV PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- HSV-1 QS1-4*
- HSV-2 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 HSV-1, HSV-2 e del controllo interno in una singola reazione.

Gli Standard di quantificazione contengono concentrazioni standardizzate di DNA specifico di HSV-1 e HSV-2. 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 HSV-1 e/o di HSV-2 nel campione.

Gli standard di quantificazione hanno le seguenti concentrazioni:

Standard di quantificazione	Concentrazione [copie/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® HSV PCR Kit 1.0 è stato sviluppato e validato per essere 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® HSV PCR Kit 1.0:

- Plasma umano EDTA
- Tamponi di lesioni cutanee e mucocutanee umane
- Liquido cerebrospinale umano

Se si applica un'appropriata procedura di estrazione degli acidi nucleici, è possibile utilizzare ulteriori tipi di campione insieme al kit RealStar® HSV 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® HSV 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® HSV 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® HSV 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
Volume Master Mix	21 µl	252 µl

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

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

ATTENZIONE



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

ATTENZIONE

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

8.3 Preparazione della reazione

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

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

- ▶ Assicurarsi che ogni controllo positivo (QS) e almeno un controllo negativo siano utilizzati per ogni seduta.
- ▶ Ai fini della quantificazione, tutti (HSV-1 e HSV-2) 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® HSV 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 HSV-1	HSV-1	FAM™	(Nessuno)
DNA specifico HSV-2	HSV-2	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
			si	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® HSV 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 HSV-1	+	-	+/-*
Controllo positivo HSV-2	-	+	+/-*
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™	
+	-	+*	Rilevato DNA specifico HSV-1.
-	+	+*	Rilevato DNA specifico HSV-2.
-	-	+	Non è stato rilevato DNA specifico né HSV-1 né HSV-2. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico per HSV-1 o HSV-2.
-	-	-	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 HSV-1 e/o HSV-2 nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

10.2.2 Analisi quantitativa

Il RealStar® HSV PCR Kit 1.0 include quattro Standard di quantificazione (QS) per HSV-1 e quattro Standard di quantificazione (QS) per HSV-2. 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.

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

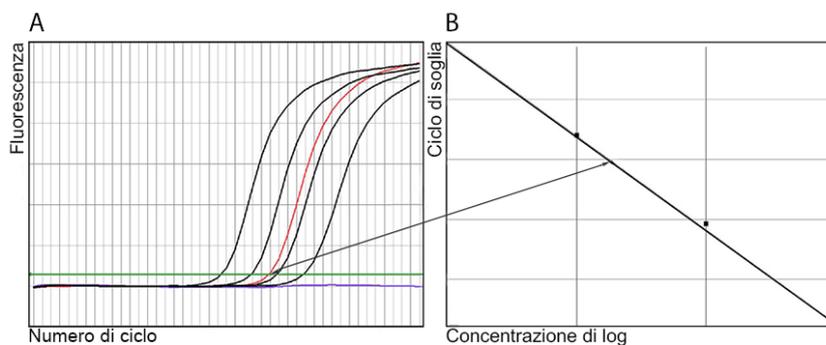


Figura 1: Standard di quantificazione (nero), un campione positivo (rosso) e un negativo (blu) visualizzati in diagramma di amplificazione [A] e analisi della curva standard [B]

NOTA

i

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

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

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

11. Dati di performance

La valutazione delle performance di RealStar® HSV PCR Kit 1.0 è stata effettuata usando DNA specifico quantificato di HSV-1 (Numero ATCC®: VR-1493) e DNA specifico di HSV-2 (numero ATCC®: VR-540).

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole di DNA specifico HSV-1 o HSV-2 che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali di DNA HSV-1 quantificato e DNA HSV-2 quantificato.

Tab. 1: Risultati PCR usati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di HSV-1

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	11	92
0,100	12	9	75
0,032	12	6	50
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0

Tab. 2: Risultati PCR usati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di HSV-2

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,162	18	18	100
1,000	18	18	100
0,316	18	11	61
0,100	18	7	39
0,032	18	3	17
0,010	18	1	6
0,003	18	0	0
0,001	18	0	0

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

- Per il rilevamento del DNA specifico di HSV-1, la sensibilità analitica è di 0,33 copie/μl eluato [intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,16 – 1,3 copie/μl]
- Per il rilevamento del DNA specifico di HSV-2, la sensibilità analitica è di 1,2 copie/μl eluato [intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,7 – 3,5 copie/μl]

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® HSV 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 HSV-1 e HSV-2 pertinenti fossero rilevati.

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

- Virus BK
- Citomegalovirus
- Virus Epstein-Barr
- Virus epatite B
- Virus epatite C
- Herpesvirus umano 6A
- Herpesvirus umano 6B
- Herpesvirus umano 7
- Herpesvirus umano 8
- Virus dell'immunodeficienza umana 1
- Virus JC
- Virus della varicella-zoster

11.3 Range lineare

Il range lineare del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 è stato valutato analizzando una serie di diluizioni logaritmiche di DNA specifico di HSV-1 e HSV-2 utilizzando concentrazioni che vanno da 1E+07 a 1E+00 copie/μl (HSV-1) e da 1E+06 a 1E+00 copie/μl (HSV-2). Sono stati analizzati almeno quattro replicati per diluizione.

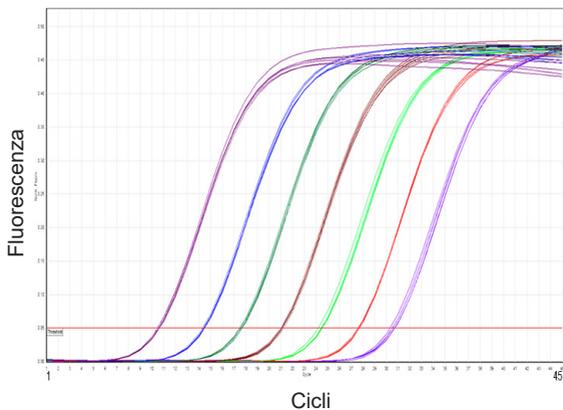
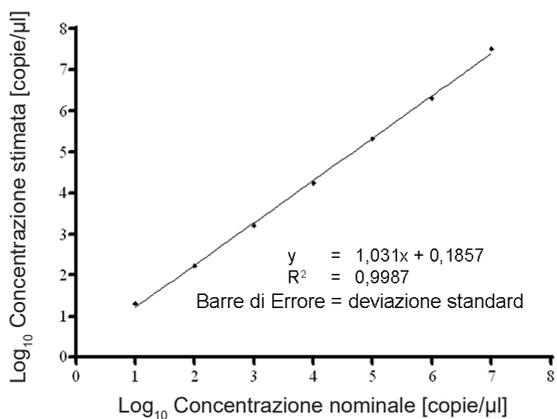
A**B**

Figura 2: Curve di amplificazione [A] e regressione lineare [B] di una serie di diluizioni di DNA specifico HSV-1 analizzata

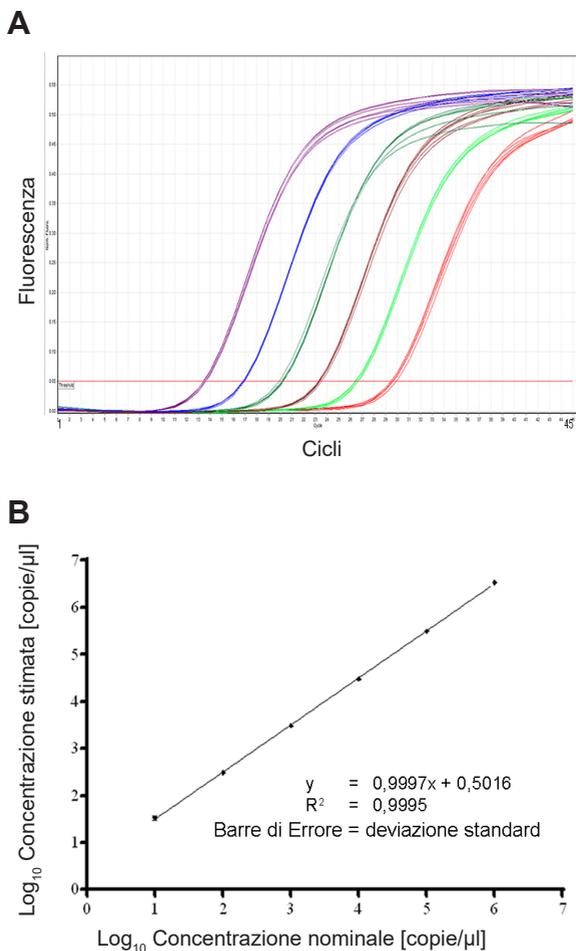


Figura 3: Curve di amplificazione [A] e regressione lineare [B] di una serie di diluizioni di DNA specifico HSV-2 analizzata

Il range lineare del RealStar® HSV PCR Kit 1.0 per il DNA specifico di HSV-1 si estende lungo un intervallo di almeno **sette** grandezze e per il DNA specifico di HSV-2 lungo un intervallo di almeno **sei** grandezze.

11.4 Precisione

La precisione del RealStar® HSV 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 delle concentrazioni definite di DNA specifico di HSV-1 e HSV-2 sul valore del ciclo di soglia (C_t) in termini di controllo interno. Sono stati analizzati almeno sei replicati per campione per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

Tab. 3: Dati di precisione per il rilevamento del DNA specifico di HSV-1 e HSV-2

HSV-1 e HSV-2		Conc. media [copie/μl]	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	HSV-1	91,00	5,30	5,90
	HSV-2	108,00	5,90	5,50
Variabilità inter-dosaggio	HSV-1	94,20	5,30	5,70
	HSV-2	99,20	9,40	9,40
Variabilità inter-lotto	HSV-1	90,30	5,10	5,60
	HSV-2	102,50	9,50	9,30
Variabilità totale	HSV-1	92,70	5,50	6,00
	HSV-2	99,60	9,00	9,10

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

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C _t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	24,00	0,10	0,43
Variabilità inter-dosaggio	23,80	0,30	1,27
Variabilità inter-lotto	24,00	0,14	0,59
Variabilità totale	23,90	0,25	1,03

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 HSV-1 e HSV-2 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® HSV 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® HSV 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® HSV 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.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

17. Spiegazione dei simboli

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

Note:

Note:

Note:

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

