

## Istruzioni per l'uso

# RealStar<sup>®</sup> WNV RT-PCR Kit 2.0

03/2020 IT



# RealStar<sup>®</sup>

## WNV RT-PCR Kit 2.0

Per uso con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)  
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)  
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)  
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)  
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)  
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)



322013



96



03 2020



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>10</b> |
| 6.1        | Strumenti per PCR in tempo reale .....                         | 12        |
| 6.2        | Tipi di campioni .....   | 12        |
| <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.....                             | 17        |
| 8.3        | Preparazione della reazione .....                              | 19        |
| <b>9.</b>  | <b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b> | <b>20</b> |
| 9.1        | Impostazioni .....   | 20        |
| 9.2        | Sonde fluorescenti (coloranti) .....                           | 21        |
| 9.3        | Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....             | 21        |
| <b>10.</b> | <b>Analisi dei dati.....</b>                                   | <b>22</b> |
| 10.1       | Validità dei test diagnostici .....                            | 22        |
| 10.1.1     | Test diagnostico valido .....                                  | 22        |
| 10.1.2     | Test diagnostico non valido .....                              | 22        |
| 10.2       | Interpretazione dei risultati .....                            | 23        |
| 10.2.1     | Analisi qualitativa .....                                      | 23        |

|            |                                      |           |
|------------|--------------------------------------|-----------|
| <b>11.</b> | <b>Dati di performance .....</b>     | <b>23</b> |
| 11.1       | Sensibilità analitica.....           | 23        |
| 11.2       | Specificità analitica.....           | 25        |
| 11.3       | Precisione .....                     | 26        |
| <b>12.</b> | <b>Limitazioni .....</b>             | <b>27</b> |
| <b>13.</b> | <b>Controllo di qualità .....</b>    | <b>28</b> |
| <b>14.</b> | <b>Assistenza tecnica .....</b>      | <b>28</b> |
| <b>15.</b> | <b>Letteratura .....</b>             | <b>28</b> |
| <b>16.</b> | <b>Marchi e brevetti.....</b>        | <b>29</b> |
| <b>17.</b> | <b>Spiegazione dei simboli .....</b> | <b>30</b> |

## 1. Uso previsto

Il RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di West Nile virus (WNV).

## 2. Componenti del kit

| Colore coperchio | Componente        | Numero di fiale | Volume [ $\mu$ l/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)

### ATTENZIONE



***Prima del primo utilizzo controllare la completezza del prodotto e di tutti i suoi componenti rispetto a numero, tipo e riempimento. Non utilizzare un prodotto difettoso o incompleto, in quanto le sue prestazioni potrebbero risultare compromesse.***

### 3. Conservazione

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

#### ATTENZIONE



*Condizioni di conservazione errate possono causare la compromissione delle prestazioni del prodotto stesso.*

#### ATTENZIONE



*Non superare il numero di sequenze di scongelamento e congelamento ripetuti e la durata delle manipolazioni specificate in queste Istruzioni per l'uso.*

#### ATTENZIONE



*Non utilizzare i componenti del prodotto oltre la data di scadenza stampata sull'etichetta.*

#### 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

Il *West Nile virus* (WNV) è una specie virale che appartiene alla famiglia dei *Flaviviridae*. L'RNA genomico dei flavivirus è monofilamento e ad orientamento positivo [(+)ssRNA]. I geni sono tutti posti su un singolo segmento lungo circa 9-12 kb. L'estremità 5' dei genomi contiene sequenze specifiche che si avvolgono in conformazioni relativamente stabili. Queste cosiddette sequenze di entrata ribosomiale permettono la traslazione diretta e la sintesi proteica da parte dei ribosomi dell'ospite.

I vettore di trasmissione del West Nile virus sono gli artropodi (diverse zanzare del genere *Culex*, *Aedes* o *Ochlerotatus*). Questo virus può infettare una vasta serie di ospiti differenti tra cui cavalli, uccelli e infine l'essere umano. Il virus è stato identificato per la prima volta nel 1937 in Uganda, e da allora è stato rilevato continuamente in uccelli, cavalli ed esseri umani in Africa, Medio Oriente ed Europa meridionale. Nel 1999 il virus ha raggiunto il Nord America; probabilmente, una zanzara portatrice del virus è arrivata a New York da Israele. Da allora, negli USA sono stati registrati diversi focolai epidemici.

Nella maggior parte dei casi (70-80%), nell'essere umano l'infezione è asintomatica. Nei casi sintomatici è possibile osservare febbre con altri segni e sintomi, quali cefalea, dolore articolare, vomito e altre caratteristiche abbastanza aspecifiche. In alcuni casi, l'1% circa di tutte le infezioni, si presentano gravi complicazioni neurologiche. Questi pazienti sviluppano grave cefalea, rigidità del collo e quindi coma o paralisi. Il 10% di questi pazienti muore a causa dell'infezione da WNV.

L'infezione da WNV non ha alcun trattamento specifico disponibile; è possibile somministrare medicinali per ridurre la febbre e il dolore, e i casi gravi vengono ricoverati e trattati con terapie di supporto.

È possibile rilevare il virus da 2-3 giorni e fino a 14-19 giorni dopo l'infezione, nel siero/plasma dei pazienti. È interessante notare che il rilevamento dell'RNA virale dalle urine è possibile perfino dopo che esso è scomparso dal sangue.

La sierologia è difficile, perché gli anticorpi presentano una reazione crociata con altri flavivirus. È possibile rilevare IgM e IgG nei pazienti a partire da 4-8 giorni dopo il rilevamento del virus nel sangue. Il test sierologico più specifico è il saggio di neutralizzazione-riduzione delle placche, che però necessita della coltura virale e può essere effettuato solo in laboratori esperti.

Il rilevamento dell'RNA virale viene effettuato principalmente con due obiettivi diversi. Prima di tutto viene effettuata la RT-PCR su campioni di casi sospetti per la diagnostica *in-vitro*. In questo caso la carica virale è solitamente elevata, e il limite di rilevamento del saggio ha pertanto poca importanza. In secondo luogo, nelle aree in cui il WNV è endemico, la trasmissione del virus è avvenuta tramite la trasfusione di sangue. Si devono pertanto effettuare degli screening di sicurezza delle donazioni di sangue, e pertanto è necessaria una sensibilità molto elevata.

#### 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® WNV RT-PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di West Nile virus (WNV).

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

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 WNV 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 WNV, 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® WNV RT-PCR Kit 2.0 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 WNV e del controllo interno in una singola reazione.

## 6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

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

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- 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)

## 6.2 Tipi di campioni

Il RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 è stato validato per essere utilizzato con i seguenti tipi di campione:

- Plasma umano EDTA

Il RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 è stato validato utilizzando il kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5 sul sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 per l'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici.

## 7. Avvertenze e precauzioni

- Prima del primo utilizzo controllare la completezza del prodotto e di tutti i suoi componenti rispetto a numero, tipo e riempimento. Non utilizzare un prodotto difettoso o incompleto, in quanto le sue prestazioni potrebbero risultare compromesse.
- Non utilizzare altri tipi di campione! L'uso di altri tipi di campione può compromettere le prestazioni del prodotto.
- La presenza di inibitori della PCR (per es., eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da WNV potrebbe presentarsi una competizione con l'amplificazione del target o reattività crociata.
- Condizioni di conservazione errate possono causare la compromissione delle prestazioni del prodotto stesso.
- La mancata centrifugazione dei componenti del prodotto dopo lo scongelamento potrebbe causare una contaminazione dei componenti con residui del reagente nei tappi e di conseguenza la compromissione delle prestazioni del prodotto.
- Non superare il numero di sequenze di scongelamento e congelamento ripetuti e la durata delle manipolazioni specificate in queste Istruzioni per l'uso.
- Non utilizzare i componenti del prodotto oltre la data di scadenza stampata sull'etichetta.
- L'errata manipolazione dei componenti del prodotto e dei campioni può portare a una contaminazione, causando risultati errati nell'esame IVD.
  - Non scambiare i tappi di fiale o flaconi, perché ciò potrebbe causare contaminazione crociata.
  - Per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da trasferimento, conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separatamente dai componenti del kit.
  - Utilizzare aree di lavoro separate per preparazione del campione, impostazione della reazione e attività di amplificazione/rilevazione.

- Indossare sempre guanti monouso.
- Non aprire le piastre PCR o le provette dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione della sequenza target di WNV.
- Non superare il tempo conservazione della miscela PCR. Ciò potrebbe causare la compromissione delle prestazioni del prodotto.
- Trattare sempre i campioni come infettivi e ad elevato rischio biologico conformemente alle procedure di laboratorio sicure. Pulire immediatamente gli sversamenti di campioni utilizzando un disinfettante adatto. Manipolare i materiali contaminati come se fosse con rischio biologico.
- Smaltire i rifiuti pericolosi e biologici solo conformemente alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati devono essere interpretati tenendo conto di tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma di WNV coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare il mancato rilevamento della presenza del patogeno.
- 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.
- L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.

## 8. Procedura

### ATTENZIONE



*L'errata manipolazione dei componenti del prodotto e dei campioni può portare a una contaminazione, causando risultati errati nell'esame IVD.*

*- Non scambiare i tappi di fiale o flaconi, perché ciò potrebbe causare contaminazione crociata.*

*- Per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da trasferimento, conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separatamente dai componenti del kit.*

*- Utilizzare aree di lavoro separate per preparazione del campione, impostazione della reazione e attività di amplificazione/rilevazione.*

*- Indossare sempre guanti monouso.*

*- Non aprire le piastre PCR di reazione dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.*

### 8.1 Preparazione del campione

L'RNA estratto è il materiale di partenza per il RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0.

Il RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 è stato validato con plasma umano EDTA usando il sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 in combinazione con il kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5.

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione dell'acido nucleico alternativi (si veda più sotto). L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 deve essere convalidata dall'utente.

- 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)

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.

Dopo il completamento della procedura di estrazione, gli eluati nella piastra non eluito sono stabili a temperatura ambiente (max. 30°C) per un totale di 6 ore. Gli eluati in una piastra eluito possono essere conservati a 2°C - 8°C fino a 24 ore prima dell'avvio dell'impostazione di una reazione PCR.

#### ATTENZIONE



***Non utilizzare altri tipi di campione! L'uso di altri tipi di campione può compromettere le prestazioni del prodotto.***

#### 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.***



**ATTENZIONE**

*Trattare sempre i campioni come infettivi e ad elevato rischio biologico conformemente alle procedure di laboratorio sicure. Pulire immediatamente gli sversamenti di campioni utilizzando un disinfettante adatto. Manipolare i materiali contaminati come se fosse con rischio biologico.*

**ATTENZIONE**

*La presenza di inibitori della PCR (per es., eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.*

**ATTENZIONE**

*Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.*

**ATTENZIONE**

*Smaltire i rifiuti pericolosi e biologici solo conformemente alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.*

**ATTENZIONE**

*Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione della sequenza target di WNV.*

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® WNV RT-PCR Kit 2.0 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         |
| <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 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        |
| <b>Volume Master Mix</b>  | <b>20 µl</b> | <b>240 µl</b> |

**ATTENZIONE**

*La mancata centrifugazione dei componenti del prodotto dopo lo scongelamento potrebbe causare una contaminazione dei componenti con residui del reagente nei tappi e di conseguenza la compromissione delle prestazioni del prodotto.*

**NOTA**

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

**NOTA**

*Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici, non aggiungere mai l'IC direttamente al campione.*

### 8.3 Preparazione della reazione

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

| Preparazione della reazione |              |
|-----------------------------|--------------|
| Master Mix                  | 20 µl        |
| Campione o controllo        | 10 µl        |
| <b>Volume totale</b>        | <b>30 µl</b> |

- ▶ Assicurarsi che almeno un controllo positivo e almeno un controllo negativo siano utilizzati ad ogni esecuzione del saggio.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.

- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

Dopo il completamento dell'impostazione della reazione PCR la miscela PCR è stabile a temperatura ambiente (max. 30 °C) per 30 minuti.

#### ATTENZIONE



***Non superare il tempo conservazione della miscela PCR. Ciò potrebbe causare la compromissione delle prestazioni del prodotto.***

## 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® WNV RT-PCR Kit 2.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

### 9.1 Impostazioni

- ▶ Definire i seguenti parametri:

| Impostazioni        |             |
|---------------------|-------------|
| Volume di reazione  | 30 µl       |
| Velocità di rampa   | Predefinito |
| Riferimento passivo | ROX™        |

## 9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

| Target                 | Nome sonda | Reporter | Quencher  |
|------------------------|------------|----------|-----------|
| RNA specifico di WNV   | WNV        | 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            |
|                      |              |                       | sì           | 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® WNV RT-PCR Kit 2.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

### 10.1 Validità dei test diagnostici

#### 10.1.1 Test diagnostico valido

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

| Controllo          | Canale |      |
|--------------------|--------|------|
|                    | 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 non valido

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

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

## 10.2 Interpretazione dei risultati

### ATTENZIONE



*Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati devono essere interpretati tenendo conto di tutti i risultati clinici e di laboratorio.*

### 10.2.1 Analisi qualitativa

| Canale |      | Interpretazione dei risultati  |
|--------|------|--|
| FAM™   | JOE™ |  |
| +      | +*   | Rilevato RNA specifico di WNV.   |
| -      | +    | Nessun RNA specifico di WNV rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di WNV.                      |
| -      | -    | 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 WNV nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

## 11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni analitiche del RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 è stata effettuata usando un West Nile Virus (ceppo NY2001-6263) fornito da ZeptoMetrix®.

### 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 è definita come la concentrazione (copie/μl) di molecole specifiche dell'RNA di WNV che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata

determinata con l'analisi di serie di diluizioni di WNV in plasma umano EDTA. Il materiale di West Nile virus (ceppo NY2001-6263) è stato fornito da ZeptoMetrix®.

Ogni diluizione è stata analizzata in 8 replicati in 3 giorni differenti (n° totale = 24 per diluizione) usando combinazioni di 3 lotti di RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0, 3 lotti di kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5 e 3 lotti di controlli interni AltoStar® Internal Control 1.5. I test sono stati effettuati usando 3 diversi sistemi di automazione AltoStar® Automation System AM16 e sistemi di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System.

Sono stati combinati i dati da tutti i test ed è stata quindi effettuata un'analisi Probit per determinare il valore LoD 95 %.

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

| Conc. in ingresso [copie/ml] | Numero di replicati | Numero di positivi | Tasso di successo [%] |
|------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| 3,16E+03                     | 24                  | 24                 | 100                   |
| 1,00E+03                     | 24                  | 24                 | 100                   |
| 3,16E+02                     | 24                  | 24                 | 100                   |
| 1,00E+02                     | 24                  | 19                 | 79                    |
| 3,16E+01                     | 24                  | 9                  | 38                    |
| 1,00E+01                     | 24                  | 7                  | 29                    |
| 3,16E+00                     | 24                  | 1                  | 4                     |
| 1,00E+00                     | 24                  | 0                  | 0                     |

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

- Per il rilevamento dell'RNA specifico di WNV, la sensibilità analitica è di 258 copie/ml [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 150 - 599 copie/ml]



## 11.2 Specificità analitica

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

La specificità analitica del RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 rispetto alla reattività crociata con altri patogeni differenti da WNV è stata valutata analizzando virus correlati a WNV, patogeni che causano sintomi simili all'infezione da WNV e patogeni che è probabile si presentino nei pazienti affetti da infezione da WNV.

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

- Virus Dengue 1
- Virus Dengue 2
- Virus Dengue 3
- Virus Dengue 4
- Virus dell'epatite A
- Virus dell'epatite C
- Virus dell'epatite E
- Virus herpes simplex 1
- Virus herpes simplex 2
- Virus dell'immunodeficienza umana 1
- Virus dell'encefalite giapponese
- Virus dell'encefalite della Murray Valley
- *Neisseria meningitidis*
- Virus dell'encefalite di San Louis
- *Streptococcus pneumoniae*
- Virus dell'encefalite da zecche (FSME)
- Usutu virus
- Virus della febbre gialla
- Virus Zika

Il RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 è in grado di rilevare WNV dei sottogeneri 1 e 2:

- Sottogenere 1 (NY99)
- Sottogenere 2 (Heja, B-956 Uganda, 1986)

**ATTENZIONE**

*Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da WNV potrebbe presentarsi una competizione con l'amplificazione del target o reattività crociata.*

### 11.3 Precisione

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

I dati di variabilità sono espressi in termini di coefficiente di variazione sulla base dei valori del ciclo soglia ( $C_t$ ). Almeno 4 replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

**Tab. 2:** Dati di precisione (CV % [valori  $C_t$ ]) per campioni di plasma umano EDTA fortemente positivi per WNV

|                            | Campione fortemente positivo per WNV<br>[CV% basato su valori $C_t$ ] |
|----------------------------|---|
| Variabilità intra-dosaggio | 0,32 - 0,95   |
| Variabilità inter-dosaggio | 0,02 - 0,40   |
| Variabilità inter-lotto    | 1,38  |
| Variabilità totale         | 1,21  |

Tutti i campioni analizzati a 3x LoD (campioni debolmente positivi) sono risultati positivi per WNV.

**Tab. 3:** Dati sulla precisione (CV % [valori C<sub>t</sub>]) per il Controllo interno nei campioni di plasma umano EDTA negativi per WNV

|                            | Controllo interno |
|----------------------------|-------------------|
| Variabilità intra-dosaggio | 0,18 - 0,67       |
| Variabilità inter-dosaggio | 0,04 - 0,32       |
| Variabilità inter-lotto    | 0,61              |
| Variabilità totale         | 1,52              |

## 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.

### **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® WNV RT-PCR Kit 2.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

### **14. Assistenza tecnica**

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

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

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

### **15. Letteratura**

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

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

## 16. Marchi e brevetti

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAasymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare); ZeptoMetrix®.

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® WNV RT-PCR Kit 2.0 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.

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

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2020 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

## 17. Spiegazione dei simboli

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

**Note:**

**Note:**



**Note:**





**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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

