

Istruzioni per l'uso

RealStar[®] *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0

01/2017 IT

RealStar®

alpha Herpesvirus 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)



081013



96



01 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	11
7.	Avvertenze e precauzioni	12
8.	Procedura	13
8.1	Preparazione del campione	13
8.2	Preparazione della Master Mix.....	14
8.3	Preparazione della reazione	16
9.	Programmazione dello strumento PCR in tempo reale	17
9.1	Impostazioni	17
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti)	17
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti	18
10.	Analisi dei dati.....	18
10.1	Validità dei test diagnostici	21
10.1.1	Test diagnostico valido	21
10.1.2	Test diagnostico invalido	21
10.2	Interpretazione dei risultati	22
10.2.1	Analisi qualitativa	22

11.	Dati di performance	23
11.1	Sensibilità analitica.....	23
11.2	Specificità analitica.....	25
11.3	Precisione	26
12.	Limitazioni	28
13.	Controllo di qualità	29
14.	Assistenza tecnica	29
15.	Letteratura	29
16.	Marchi e brevetti.....	30
17.	Spiegazione dei simboli	31

1. Uso previsto

Il RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la differenziazione del DNA specifico di virus herpes simplex 1 (HSV-1), virus herpes simplex 2 (HSV-2) e virus varicella-zoster (VZV).

2. Componenti del kit

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiale]
Blu	Master A	8	60
Viola	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rosso	Positive Control VZV	1	250
Giallo	Positive Control HSV-1	1	250
Arancia	Positive Control HSV-2	1	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control (IC) = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

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

3. Conservazione

- Il RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare Altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2°C e +8°C non deve superare un periodo di due ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere il capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato
- 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

Quella degli *herpesviridae* (sinonimo: Herpesvirus) è una grande famiglia di virus a DNA che provocano malattie negli animali, esseri umani inclusi. Tutti gli *herpesviridae* sono composti da genomi di DNA lineare a doppio filamento di dimensioni relativamente grandi. Gli *Herpesviridae* sono virus a replicazione nucleare, ovvero la replicazione del DNA virale e la trascrizione dei geni virali avvengono all'interno del nucleo delle cellule infettate. In base alle differenze nella patogenicità, nelle cellule ospite e nelle caratteristiche di replicazione, gli *herpesviridae* si suddividono in tre gruppi: *alpha*-, *beta*- e *gammaherpesviridae*. Gli *alphaherpesviridae* (Herpesvirus alfa) sono caratterizzati da brevi cicli riproduttivi, rapida distruzione delle cellule ospite e possibilità di replicarsi in un'ampia gamma di tessuti ospite. Una caratteristica fondamentale di questi virus è la capacità di stabilire un'infezione latente a vita nel sistema nervoso periferico dei loro ospiti. I virus patogeni umani *herpes simplex 1* (HSV-1), *herpes simplex 2* (HSV-2) e *varicella-Zoster* (VZV), appartengono alla famiglia degli Herpesvirus alfa.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la differenziazione del DNA specifico di virus herpes simplex 1 (HSV-1), virus herpes simplex 2 (HSV-2) e virus varicella-zoster (VZV).

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 ROX™, le sonde specifiche per il DNA HSV-2 sono marcate con il fluoroforo Cy®5 e le sonde specifiche per il DNA di VZV sono marcate con il fluoroforo FAM™. 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 del DNA specifico di HSV-1 HSV-2 e VZV, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende due processi in un'unica provetta:

- Amplificazione per PCR del DNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control VZV
- Positive Control HSV-1
- Positive Control HSV-2
- Water (PCR grade)

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

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

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento di DNA specifico di HSV-1, HSV-2, VZV e del controllo interno in una singola reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di 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)

6.2 Tipi di campioni

I seguenti tipi di campione sono stati validati con RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0:

- 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® *alpha* Herpesvirus 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® *alpha* Herpesvirus 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)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® *alpha* Herpesvirus 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® *alpha* Herpesvirus 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 (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 e almeno un controllo negativo siano utilizzati per ogni seduta.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del RealStar® *alpha* Herpesvirus 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	Nessuno

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
DNA specifico di HSV-1	HSV-1	ROX™	(Nessuno)
DNA specifico di HSV-2	HSV-2	Cy®5	(Nessuno)
DNA specifico di VZV	VZV	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 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® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

Analisi dei dati con l'utilizzo di ABI Prism® 7500 SDS o 7500 Fast SDS (Applied Biosystems), m2000rt (Abbott Diagnostics), VERSANT® kPCR System (Siemens Healthcare) o Mx3005P™ QPCR System (Stratagene):

Utilizzando uno di questi sistemi per PCR in real time non dovrebbero esserci fenomeni di crosstalk tra i diversi canali di rilevamento se è stata installata una taratura valida dei coloranti puri (Pure Spectra Component File) e del fondo (Background Component File). Pertanto, si avrà un segnale per il DNA specifico di **VZV** solo nel canale di rilevamento FAM™, un segnale per il DNA specifico di **HSV-1** solo nel canale di rilevamento ROX™, un segnale per il DNA specifico di **HSV-2** solo nel canale di rilevamento Cy®5 e i segnali del controllo interno si presenteranno solo nel canale di rilevamento JOE™ (vedere la Figura 1).

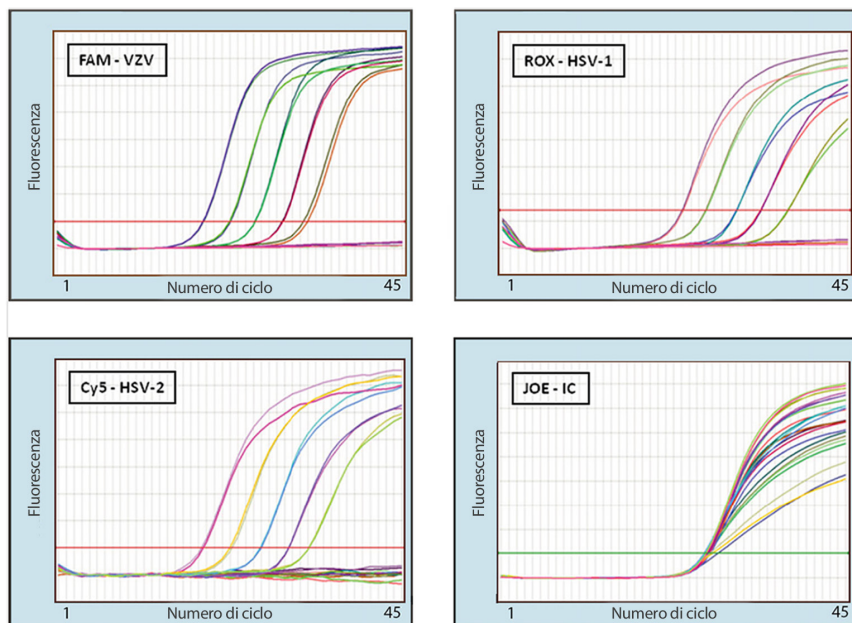


Figura 1: Serie di diluizioni di DNA specifico di VZV, HSV-1, e HSV-2 che vanno da 1 copia/ μ l a $1,00E+04$ copie/ μ l. I campioni sono stati analizzati utilizzando il RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 su un ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems). I campioni positivi per il DNA specifico di VZV generano segnali nel canale di rilevamento FAM™, i campioni positivi per il DNA specifico di HSV-1 generano segnali nel canale di rilevamento ROX™ e i campioni positivi per il DNA specifico di HSV-2 generano segnali nel canale di rilevamento Cy®5. Il controllo interno (IC) genera segnali nel canale di rilevamento JOE™.

Analisi dei dati con Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN):

Usando Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) potrebbe verificarsi un lieve crosstalk a tra il canale di rilevamento arancione (ROX™) e il canale di rilevamento rosso (Cy®5). Pertanto, si avrà un segnale per il DNA specifico di VZV solo nel canale di rilevamento verde (FAM™), un segnale per il DNA specifico di HSV-2 solo nel canale di rilevamento rosso Cy®5 e i segnali specifici del controllo interno si presenteranno solo nel canale di rilevamento giallo (JOE™) (vedere la Figura 2). Un segnale per il DNA specifico di HSV-1,

tuttavia, non solo si manifesterà nel canale di rilevamento arancione (ROX™), ma produrrà un più debole segnale di crosstalk nel canale di rilevamento rosso (Cy®5). Questo segnale di crosstalk sarà sempre più debole (fluorescenza inferiore) di un segnale prodotto da un campione di DNA specifico di HSV-2. Consigliamo pertanto di analizzare i campioni comparandoli ai controlli positivi per VZV, HSV-1 e HSV-2 (vedere la Figura 2). Per qualsiasi domanda riguardo all'analisi dei dati su uno strumento Rotor-Gene, contattare il nostro supporto tecnico.

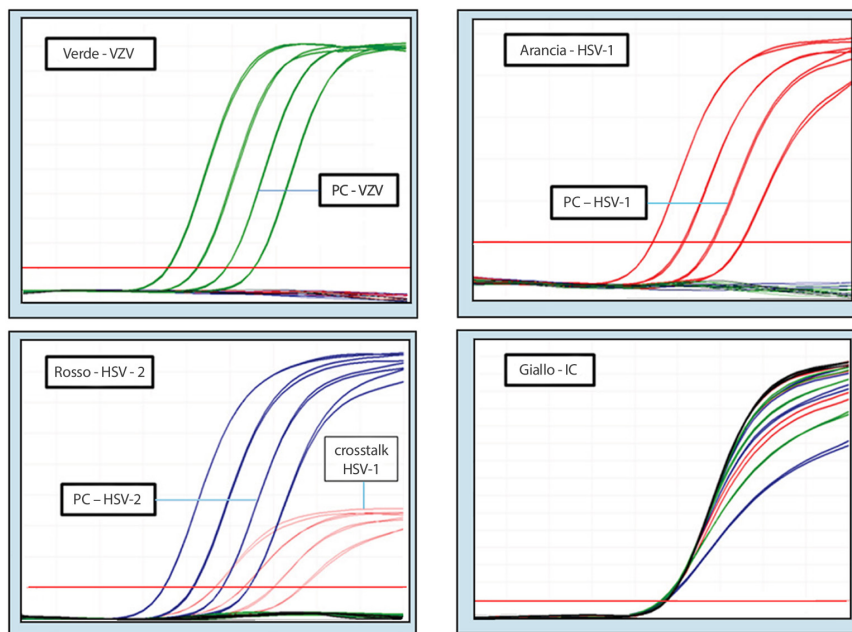


Figura 2: Serie di diluizioni di DNA specifico di VZV, HSV-1, e HSV-2 che vanno da 10 copie/µl a 1,00E+04 copie/µl. I campioni sono stati analizzati utilizzando il RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 su uno strumento Rotor-Gene® 6000 (Corbett-Research). Campioni positivi per il DNA di VZV generano segnali solo nel canale di rilevamento verde (FAM™), i campioni positivi per il DNA di HSV-2 generano segnali solo nel canale di rilevamento rosso Cy®5 e il controllo interno genera segnali solo nel canale di rilevamento giallo (JOE™). I campioni positivi per il DNA di HSV-1 possono generare non solo segnali nel canale di rilevamento arancione (ROX™), ma anche segnali di crosstalk più deboli nel canale di rilevamento rosso (Cy®5). Questi segnali di crosstalk saranno sempre più deboli (fluorescenza inferiore) di un segnale prodotto da campioni positivi per DNA di HSV-2.

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			
	ROX™	Cy®5	FAM™	JOE™
Controllo positivo HSV-1	+	- ¹	-	+/-*
Controllo positivo HSV-2	-	+	-	+/-*
Controllo positivo VZV	-	-	+	+/-*
Controllo negativo	-	-	-	+

* La presenza o l'assenza di un segnale nel canale JOE™ non è rilevante per la validità dell'esecuzione del test.

¹ Segnali di crosstalk possono manifestarsi nel canale di rilevamento rosso (Cy®5) se si usa Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

10.1.2 Test diagnostico invalido

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

10.2.1 Analisi qualitativa

Canale				Interpretazione dei risultati
ROX™	Cy®5	FAM™	JOE™	
+	- ¹	-	+*	Rilevato DNA specifico di HSV-1.
-	+	-	+*	Rilevato DNA specifico di HSV-2.
-	-	+	+*	Rilevato DNA specifico di VZV.
-	-	-	+	Nessun DNA HSV-1-specifico, HSV-2-specifico né VZV-specifico rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico di HSV-1, HSV-2 e VZV.
-	-	-	-	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 di JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento di ROX™, Cy®5 o nel canale di rilevamento di FAM™. Un elevato carico di DNA di target nel campione può portare segnali del controllo interno ridotti o assenti.

¹ Segnali di crosstalk possono manifestarsi nel canale di rilevamento rosso (Cy®5) se si usa Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN).

11. Dati di performance

La valutazione della performance del RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 è stata effettuata utilizzando DNA VZV-specifico (VZV ceppo ELLEN; numero ATCC®: VR-1367), DNA HSV-1-specifico (numero ATCC®: VR-1493) e DNA HSV-2-specifico (numero ATCC®: VR-540).

11.1 Sensibilità analitica

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

Tab. 1: Risultati della PCR utilizzati 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	8	67
0,032	12	2	17
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0

Tab. 2: Risultati della PCR utilizzati 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 [%]
10,000	12	12	100
3,162	12	12	100
1,000	12	12	100
0,316	12	10	83
0,100	12	3	25
0,032	12	1	8
0,010	12	2	17
0,003	12	0	0

Tab. 3: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento del DNA specifico di VZV

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,162	17	17	100
1,000	18	18	100
0,316	18	18	100
0,100	18	17	94
0,032	18	7	39
0,010	18	6	33
0,003	18	1	6
0,001	12	0	0

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

- Per il rilevamento del DNA specifico di VZV, la sensibilità analitica è di 0,2 copie/μl eluato [intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,1 – 1,5 copie/μl]
- Per il rilevamento del DNA specifico di HSV-1, la sensibilità analitica è di 0,46 copie/μl eluato [intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,23 – 1,8 copie/μl]
- Per il rilevamento del DNA specifico di HSV-2, la sensibilità analitica è di 1,00 copia/μl eluato [intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,5 – 4,1 copie/μl]

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® *alpha* Herpesvirus 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, HSV-2 e VZV pertinenti fossero rilevati.

La specificità analitica di RealStar® *alpha* Herpesvirus PCR Kit 1.0 è stata valutata analizzando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da altri herpesvirus o da altri patogeni significativi nei pazienti immunocompromessi.

Il RealStar® *alpha* Herpesvirus 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
- Parvovirus umano B19
- Virus JC

11.3 Precisione

La precisione del RealStar® *alpha* Herpesvirus 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 genomico specifico di HSV-1, HSV-2 e VZV e 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. 4: Dati di precisione per il rilevamento del DNA specifico di HSV-1

HSV-1	Conc. media (copie/μl)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	96,0	4,7	4,9
Variabilità inter-dosaggio	96,2	5,8	6,0
Variabilità inter-lotto	96,0	4,8	5,0
Variabilità totale	96,1	5,5	5,7

Tab. 5: Dati di precisione per il rilevamento del DNA specifico di HSV-2

HSV-2	Conc. media (copie/μl)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	91,5	7,3	7,9
Variabilità inter-dosaggio	95,3	7,8	8,2
Variabilità inter-lotto	89,9	8,2	9,1
Variabilità totale	92,9	8,7	9,4

Tab. 6: Dati di precisione per il rilevamento del DNA specifico di VZV

VZV	Conc. media (copie/μl)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	86,3	4,0	4,6
Variabilità inter-dosaggio	92,8	8,2	8,9
Variabilità inter-lotto	89,4	4,2	4,7
Variabilità totale	92,6	6,8	7,3

Tab. 7: Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C _t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	24,55	0,02	0,10
Variabilità inter-dosaggio	24,55	0,05	0,19
Variabilità inter-lotto	24,58	0,06	0,24
Variabilità totale	24,57	0,06	0,23

12. Limitazioni

- Per risultati ottimali è richiesta la rigorosa osservanza delle istruzioni per l'uso.
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- La buona pratica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. È necessario prestare la massima attenzione per preservare la purezza dei componenti del kit e le impostazioni di reazione. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie adeguate procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR (ad es. eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma HSV-1, HSV-2 e/o VZV coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del RealStar® *alpha* Herpesvirus 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® *alpha* Herpesvirus 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); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, 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® *alpha* Herpesvirus 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

