

artus[®] SARS RG RT-PCR Kit

Manuale



24 (N. catalogo 4511263)

Diagnostica quantitativa in vitro

Da utilizzare con artus[™] 3000 e con Rotor-Gene[®] 3000

Versione 1



4511263



1046936IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

MAT

1046936IT



Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'estrazione e alla purificazione di acidi nucleici a partire da qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

- nella purificazione di DNA, RNA e proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca su microRNA e RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per maggiori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Indice

1. Contenuto	5
2. Conservazione	5
3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti	6
4. Precauzioni generali.....	6
5. Informazioni sull'agente patogeno.....	10
6. Principio della real-time PCR.....	11
7. Descrizione del prodotto.....	11
8. Protocollo	12
8.1 Fase preanalitica: prelievo, conservazione e trasporto dei campioni	12
8.2 Estrazione dell'RNA.....	14
8.3 Controllo interno	16
8.4 Quantificazione	17
8.5 Preparazione della PCR.....	19
8.6 Programmazione dell' <i>artus 3000</i> o del	23
9. Analisi dei dati	23
10. Risoluzione dei problemi.....	25
11. Specifiche	27
11.1 Sensibilità analitica	27
11.2 Specificità	28
11.3 Precisione	29
11.4 Robustezza	30
11.5 Riproducibilità	31

11.6 Valutazione diagnostica	31
12. Avvertenze speciali per l'uso del prodotto	31
13. Informazioni di sicurezza	31
14. Controllo di qualità	32
15. Riferimento bibliografico.....	32
16. Spiegazione dei simboli.....	33

artus SARS RG RT-PCR Kit

Kit da utilizzare con *artus 3000* o con *Rotor-Gene 3000**.

1. Contenuto

	Etichettatura e contenuto	Art. N. 4511263 24 reazioni
Blu	SARS-CoV RG/TM Master	2 x 12 rxns
Rosso	SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 [†] 1 x 10 ⁴ cop/μl	1 x 200 μl
Rosso	SARS-CoV LC/RG/TM QS 2 [†] 1 x 10 ³ cop/μl	1 x 200 μl
Rosso	SARS-CoV LC/RG/TM QS 3 [†] 1 x 10 ² cop/μl	1 x 200 μl
Rosso	SARS-CoV LC/RG/TM QS 4 [†] 1 x 10 ¹ cop/μl	1 x 200 μl
Verde	SARS-CoV LC/RG/TM IC [†]	1 x 1.000 μl
Bianco	Water (PCR grade)	1 x 1.000 μl

[†] QS = Standard di quantificazione

IC = Controllo interno

2. Conservazione

I componenti dell'*artus SARS RG RT-PCR Kit* devono essere conservati tra -30 e -15°C e possono essere utilizzati fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e congelarli più di due volte, poiché ciò potrebbe provocare una riduzione della sensibilità. In caso di utilizzo non regolare è necessario congelare aliquote dei reagenti. Qualora fosse necessario conservare i componenti a +4°C, non superare l'intervallo massimo di cinque ore.

* L'*artus SARS RG RT-PCR Kit* può essere utilizzato anche con il *Rotor-Gene™ 2000*.

3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- Guanti da laboratorio senza talco
- Kit di estrazione dell'RNA (vedi 8.2 Estrazione dell'RNA)
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro sterili per pipette
- Agitatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- *artus 3000* o *Rotor-Gene 3000*
- Provette PCR da 0,1 ml per l'utilizzo del rotore da 72 fori (0.1 ml Strip Tubes and Caps, QIAGEN Hamburg, n. cat.: 4699982; 0.1 ml tubes, Corbett Research, n. cat.: ST-1001)
- In alternativa: provette PCR da 0,2 ml per l'utilizzo del rotore da 36 fori (per es.: 0.2 ml PCR Tubes, QIAGEN Hamburg, n. cat.: 4699983; 0.2 ml tubes, Corbett Research, n. cat.: SE-1003F)
- Blocco di raffreddamento (72-/96-Well Loading Block, QIAGEN Hamburg, n. cat.: 4699980/4699981; 72/96 well loading block, Corbett Research, n. cat.: 3001-008/3001-009)

4. Precauzioni generali

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

- Utilizzare puntali con filtro sterili per pipette.
- Estrarre e conservare il materiale positivo (campioni, controlli, ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerlo alla mix di reazione in luogo separato.
- Prima dell'inizio del test scongelare tutti i componenti a temperatura ambiente.
- Una volta scongelati agitare brevemente i componenti su vortex e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare rapidamente in ghiaccio o nel blocco di raffreddamento (72/96 well loading block).

5. Informazioni sull'agente patogeno

I coronavirus appartengono alla famiglia dei *Coronaviridae* e sono virus di grandi dimensioni, costituiti da un singolo filamento di RNA positivo, in grado di provocare patologie molto virulente negli uomini e negli animali domestici. A due dei coronavirus umani finora conosciuti va imputato un terzo dei normali raffreddori e delle infezioni nosocomiali alle vie respiratorie superiori nei neonati prematuri.

Un nuovo membro della famiglia dei coronavirus è inoltre responsabile della sindrome respiratoria acuta grave (SARS, "Severe Acute Respiratory Syndrome"). Una parte del presunto gene della polimerasi del SARS-Coronavirus (SARS-CoV) è stata identificata in un paziente tramite PCR, grazie a un lavoro d'équipe che ha visto coinvolti l'Istituto di Medicina Tropicale Bernhard-Nocht di Amburgo e alcuni laboratori associati. Sulla base di questo test è stato quindi sviluppato un sistema commerciale real-time RT-PCR, per l'identificazione diretta di SARS-Coronavirus. La PCR è infatti in grado di rilevare materiale genetico di SARS-CoV in diversi tipi di campioni (sangue, secreto delle vie respiratorie o tessuti).

Analisi dei risultati dei test

Importante: attenersi alle disposizioni ufficiali dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) consultabili al seguente indirizzo Internet: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

Risultati positivi: se il risultato di un test di SARS-CoV è positivo, il paziente è infetto, anche nel caso in cui non presenti alcun sintomo della SARS.

Risultati negativi: se il risultato di un test di SARS-CoV è negativo, non è detto che il paziente non abbia contratto la SARS. La negatività del test nonostante i sintomi da SARS potrebbe dipendere da quanto segue:

- Al momento del prelievo del campione il virus non era ancora

contenuto nel campione (non è ancora ben chiaro in quale stadio della patogenesi da SARS-CoV sia rilevabile il virus in un determinato campione).

- Il paziente presenta sintomi analoghi a quelli della SARS, ma che sono stati causati da un altro agente patogeno.

6. Principio della real-time PCR

Per la diagnosi tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Per la real-time PCR la rilevazione richiede l'impiego di sostanze fluorescenti, di solito associate a sonde oligonucleotidiche, che si legano specificatamente al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare i prodotti senza dover riaprire le provette dei campioni al termine della PCR (Mackay, 2004).

7. Descrizione del prodotto

L'*artus* SARS RG RT-PCR Kit è un sistema pronto all'uso per la rilevazione dell'RNA di SARS-CoV tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) nell'*artus 3000* o nel *Rotor-Gene 3000*. Il SARS-CoV RG/TM Master contiene reagenti ed enzimi per la trascrizione inversa e per l'amplificazione specifica di una regione di 92 bp del genoma di SARS-CoV, nonché per la rilevazione immediata dell'amplicone specifico nel canale di fluorescenza Cycling A.FAM dell'*artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*. L'*artus* SARS RG RT-PCR Kit contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologo per la rilevazione di una possibile inibizione della PCR, che viene identificato come *Controllo interno (IC)* nel canale di fluorescenza Cycling A.JOE e che non riduce il limite di rilevabilità analitica della RT-PCR di SARS-CoV (vedi **11.1 Sensibilità analitica**). Il kit comprende controlli positivi esterni (SARS-CoV

LC/RG/TM QS 1 - 4), che consentono di determinare la carica dell'agente patogeno. A tale proposito consultare il paragrafo **8.4 Quantificazione**

8. Protocollo

8.1 Fase preanalitica: prelievo, conservazione e trasporto dei campioni

Attenzione: tutti i campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi.

Importante: i dati attualmente disponibili indicano l'espettorato come il campione più idoneo ai fini dell'identificazione di SARS-CoV. Pertanto con l'artus SARS RG RT-PCR Kit ne raccomandiamo l'impiego.

La convalida interna dell'artus SARS RG RT-PCR Kit è stata eseguita con campioni di siero. Altri campioni quali BAL, lavaggio nasofaringeo, tamponi, tessuto polmonare e espettorato non sono ancora completamente validati. Utilizzare solo i kit di estrazione di RNA raccomandati (vedi **8.2 Estrazione dell'RNA**) per la preparazione dei campioni.

In caso di determinati campioni è necessario rispettare particolari disposizioni riguardanti il prelievo, la conservazione e il trasporto.

Attenzione: in proposito osservare anche le disposizioni ufficiali dell'OMS alla pagina internet indicata di seguito: <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>.

8.1.1 Prelievo dei campioni

Per il prelievo dei tamponi utilizzare i materiali indicati di seguito:

Utilizzare solo tamponi con estremità in Dacron® o rayon su spatola in plastica. Non utilizzare tamponi con spatola in legno o alluminio.

8.1.2 Conservazione dei campioni

La riuscita del test puP essere compromessa se i campioni vengono congelati più volte o conservati a lungo.

I campioni vanno conservati a 2 - 8°C. (Se i tamponi devono essere spediti a un laboratorio di analisi, devono essere inviati il più presto possibile dopo il prelievo, in accordo con le disposizioni del laboratorio per il trasporto di SARS-CoV).

I tamponi che non vengono analizzati direttamente dopo l'arrivo in laboratorio devono essere conservati a 2 - 8°C e analizzati entro un giorno. Tamponi che non possono essere analizzati entro un giorno devono essere conservati a -20°C o meno e essere analizzati entro 30 giorni dalla data di prelievo.

8.1.3 Trasporto dei campioni

I tamponi devono essere trasportati refrigerati.

Se i tamponi devono essere spediti in laboratorio, devono essere spediti quanto prima possibile dopo il prelievo, in accordo con le disposizioni del laboratorio per il trasporto dei campioni refrigerati. I campioni devono essere spediti nel rispetto delle disposizioni locali e statali vigenti per il trasporto di materiali potenzialmente patogeni*.

8.2 Estrazione dell'RNA

Sono disponibili kit per l'estrazione dell'RNA di diversi produttori. Attenendosi al protocollo del produttore prescelto utilizzare la quantità di campione indicata e eseguire l'estrazione dell'RNA conformemente alle istruzioni. Si raccomanda l'utilizzo dei seguenti kit d'estrazione.

Campione	Kit di estrazione	Numero di catalogo	Produttore	Carrier RNA
espettorato, siero, BAL, lavaggio nasofaringeo,	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	incluso
tessuto polmonar	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	non incluso

In caso di utilizzo dell'espettorato come campione seguire le seguenti precauzioni:

per la preparazione del campione miscelare il campione in una provetta di reazione in parti uguali con una soluzione NaCl allo 0,9 %, che contenga 1 % di N-Acetilcistina (Sigma cat. n. A 8199) (per es. 300 µl di espettorato + 300 µl di miscela NaCl). Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, usare 140 µl del lisato per la successiva purificazione dell'RNA con il QIAamp Viral RNA Mini Kit e seguire le istruzioni del protocollo del produttore.

* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st edition 2000.704.

- L'aggiunta di **carrier RNA** è di importanza fondamentale per l'efficacia della purificazione e quindi per la resa del DNA/RNA. Per ottenere una maggiore stabilità del carrier RNA in dotazione con il QIAamp Viral RNA Mini Kit consigliamo la seguente procedura diversa da quella indicata dal manuale del kit di estrazione:

- a. Prima del primo utilizzo del kit di estrazione risospendere il carrier RNA liofilizzato in 310 μ l del tampone di eluizione contenuto nel kit (concentrazione finale 1 μ g/ μ l, non utilizzare tampone di lisi) e ripartire questa soluzione di carrier RNA nel numero desiderato di aliquote, da conservare a -20 C. Evitare di scongelare più volte (> 2 x) un'aliquota di carrier RNA.
- b. Prima dell'inizio di ogni procedura di purificazione deve essere preparata a fresco una miscela di tampone di lisi e di carrier RNA (e eventualmente di *Controllo interno*, vedi **8.3 Controllo interno**) in base al seguente schema di pipettamento.

Numero dei campioni	1	12
tampone di lisi AVL	560 μ l	6.720 μ l
carrier RNA (1 μ g/ μ l)	5,6 μ l	67,2 μ l
volume totale	565,6 μl	6.787,2 μl
volume per la purificazione	560 μl	560 μl ciascuno

- c. Utilizzare subito la miscela di tampone di lisi e di carrier RNA preparata a fresco per la purificazione. Non è possibile conservare la miscela.
- Nelle procedure di estrazione dell'RNA che richiedono l'utilizzo di tamponi di lavaggio contenenti **etanolo**, assicurarsi di eseguire una fase di centrifugazione aggiuntiva (tre minuti, 13.000 rpm) prima dell'eluizione, onde rimuovere residui di etanolo. Ciò impedisce eventuali inibizioni della PCR.
 - L'*artus SARS RG RT-PCR Kit* non deve essere utilizzato con procedure di estrazione dell'RNA basate su **fenolo**.

Importante: il *Controllo interno* dell'*artus SARS RG RT-PCR Kit* può essere impiegato direttamente nella procedura di estrazione dell'RNA (vedi **8.3 Controllo interno**).

8.3 Controllo interno

Il kit comprende un *Controllo interno (SARS-CoV LC/RG/TM IC)*, che consente di verificare sia la procedura di estrazione dell'RNA che una possibile inibizione della PCR (vedi Fig. 1). Per tale applicazione aggiungere durante l'estrazione il *Controllo interno* in un rapporto di 0,1 μ l per 1 μ l del volume di eluizione. Ad esempio, se si utilizza il QIAamp Viral RNA Mini Kit e l'RNA è diluito in 60 μ l di tampone AVE, aggiungere 6 μ l di *Controllo interno*. Se l'eluizione avviene in 50 μ l, aggiungere il corrispondente volume di 5 μ l. La quantità di *Controllo interno* impiegato dipende **solo** dal volume di eluizione. Il *Controllo interno* e il carrier RNA (vedi **8.2 Estrazione dell'RNA**), possono essere aggiunti solo

- alla miscela di tampone di lisi e di campione o
- direttamente al tampone di lisi

Il *Controllo interno* non deve essere aggiunto direttamente al campione. Quando si aggiunge il tampone di lisi occorre considerare che la miscela di *Controllo interno* e di tampone di lisi/carrier RNA va usata immediatamente dopo la sua preparazione (la conservazione della miscela a temperatura ambiente o in frigo può portare già dopo poche ore ad un difettoso funzionamento del *Controllo interno* e quindi ad una minore efficacia della procedura di purificazione). **Non** aggiungere il *Controllo interno* e il carrier RNA direttamente al campione.

In alternativa il *Controllo interno* può essere utilizzato **esclusivamente per la verifica di un'eventuale inibizione della PCR** (vedi Fig. 2). A tale scopo aggiungere per ogni reazione 1 μ l di *Controllo interno* direttamente a 15 μ l di SARS-CoV RG/TM Master. Per ogni reazione di PCR utilizzare 15 μ l di Master Mix* preparata come descritto sopra, quindi aggiungere 10 μ l di campione purificato. Se si desidera effettuare una corsa per più campioni, aumentare le quantità di SARS-CoV RG/TM Master e di *Controllo interno* in base al numero dei campioni (vedi **8.5 Preparazione della PCR**).

8.4 Quantificazione

Gli *Standard di quantificazione* in dotazione (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) sono stati calibrati con gli standard dell'istituto Robert Koch di Berlino. Essi vengono trattati come campioni già purificati e se ne utilizza lo stesso volume (10 μ l). Per creare una curva standard nell'*artus 3000* o nel *Rotor-Gene 3000*, utilizzare tutti e quattro gli *Standard di quantificazione* in dotazione, definirli nella finestra di menu *Edit Samples* come standard e inserire le concentrazioni indicate (vedi *artus 3000 Software Manual* o *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*). Tale curva standard può essere impiegata per quantificazioni successive, sempre che in questa corsa venga utilizzato almeno uno standard ad **una** determinata concentrazione. A tale scopo è necessario importare la curva standard precedentemente creata (vedi *artus 3000™ Software Manual* o *Rotor-Gene™ Manual, Version 4.6*). Per questa forma di quantificazione è necessario considerare che, a causa della variabilità tra le corse di PCR, il risultato può presentare degli scarti.

Attenzione: gli *Standard di quantificazione* vengono definiti in copie/ μ l. Per convertire in copie/ml di campione i valori ottenuti con l'aiuto della curva standard, utilizzare la formula seguente:

$$\text{risultato (copie/ml)} = \frac{\text{risultato (copie/}\mu\text{l)} \times \text{volume di eluizione (}\mu\text{l)}}{\text{volume del campione (ml)}}$$

Notare che nella formula di cui sopra occorre utilizzare il volume iniziale del campione. Questo è da tenere presente soprattutto quando il volume campione è stato modificato prima dell'estrazione degli acidi nucleici (per esempio per riduzione dovuta a centrifugazione o per aumento dovuto ad aggiunta di volume per raggiungere la quantità richiesta per la purificazione).

Importante: per semplificare l'analisi quantitativa dei sistemi *artus* nell'*artus 3000* o nel *Rotor-Gene 3000* consultare la guida **Technical Note for quantitation on *artus 3000* or *Rotor-Gene 3000*** all'indirizzo Internet www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è trascurabile. La sensibilità del sistema di rilevazione non viene influenzata.

8.5 Preparazione della PCR

Assicurarsi che il blocco di raffreddamento (accessorio dell'*artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*) sia stato raffreddato ad una temperatura di +4°C. Inserire il numero di provette PCR richiesto per le reazioni desiderate. Assicurarsi che per ciascuna corsa di PCR vengano eseguiti parallelamente almeno uno *Standard di quantificazione* e un controllo negativo (*Water, PCR grade*). Per la creazione di una curva standard utilizzare per ogni corsa di PCR tutti gli *Standard di quantificazione* in dotazione (*SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4*). Prima dell'inizio del test tutti i reagenti devono essere scongelati completamente a temperatura ambiente, ben miscelati (pipettamento ripetuto o inversione ripetuta della provetta) e infine centrifugati.

Se si desidera utilizzare il *Controllo interno* per controllare **sia la procedura di estrazione dell'RNA che una possibile inibizione della PCR**, il *Controllo interno* deve essere aggiunto precedentemente alla procedura di purificazione (vedi **8.3 Controllo interno**). In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (vedi anche panoramica schematica, Fig. 1):

		Numero dei campioni	
		1	12
1. Preparazione della Master Mix	SARS-CoV RG/TM Master	15 μ l	180 μ l
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	0 μ l	0 μ l
	volume totale	15 μl	180 μl
2. Preparazione reazione PCR	Master Mix	15 μ l	15 μ l ciascuno
	campione	10 μ l	10 μ l ciascuno
	volume totale	25 μl	25 μl ciascuno

Se si desidera utilizzare il *Controllo interno esclusivamente per la verifica di un'inibizione della PCR*, è necessario aggiungerlo direttamente al SARS-CoV RG/TM Master. In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (vedi anche panoramica schematica, Fig. 2):

		Numero dei campioni	
		1	12
1. Preparazione della Master Mix	SARS-CoV RG/TM Master	15 μ l	180 μ l
	SARS-CoV LC/RG/TM IC	1 μ l	12 μ l
	volume totale	16 μl*	192 μl*
2. Preparazione reazione PCR	Master Mix	15 μ l*	15 μ l* ciascuno
	campione	10 μ l	10 μ l ciascuno
	volume totale	25 μl	25 μl ciascuno

In ogni provetta PCR pipettare 15 μ l di Master Mix. Di seguito aggiungere 10 μ l di RNA estratto e mescolare bene con un pipettamento ripetuto. Analogamente è necessario utilizzare come controllo positivo 10 μ l di almeno uno degli *Standard di quantificazione (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4)* e come controllo negativo 10 μ l di acqua (*Water, PCR grade*). Chiudere le provette PCR. Notare che è necessario posizionare un *Locking Ring* (accessorio dell'*artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*) sopra il rotore per impedire l'apertura accidentale delle provette di reazione durante la corsa.

* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è irrilevante. La sensibilità del sistema di rilevazione non viene influenzata.

Aggiunta del *Controllo interno* alla procedura di purificazione

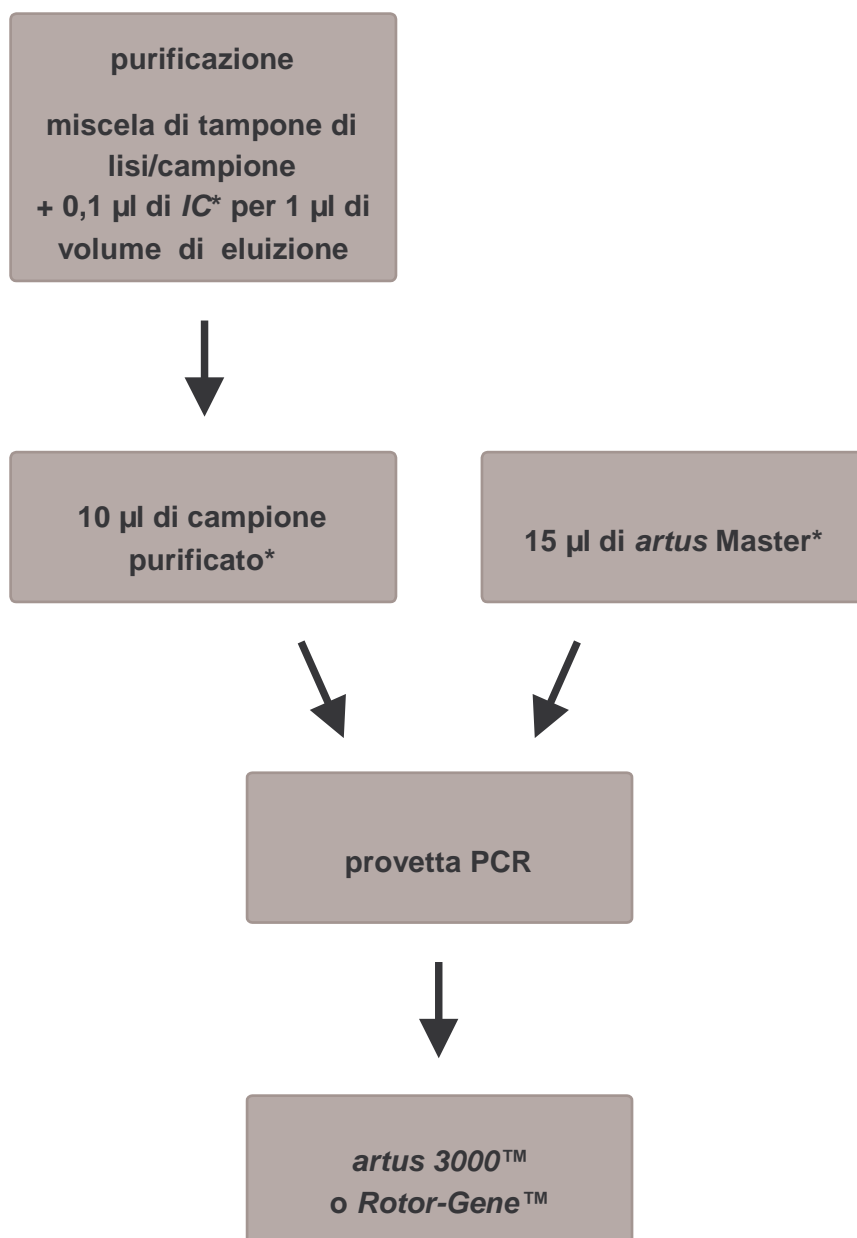


Fig. 1: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'estrazione dell'RNA e dell'inibizione della PCR.

*

Per ogni fase del pipettamento è necessario che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

Aggiunta del Controllo interno alla soluzione artus Master

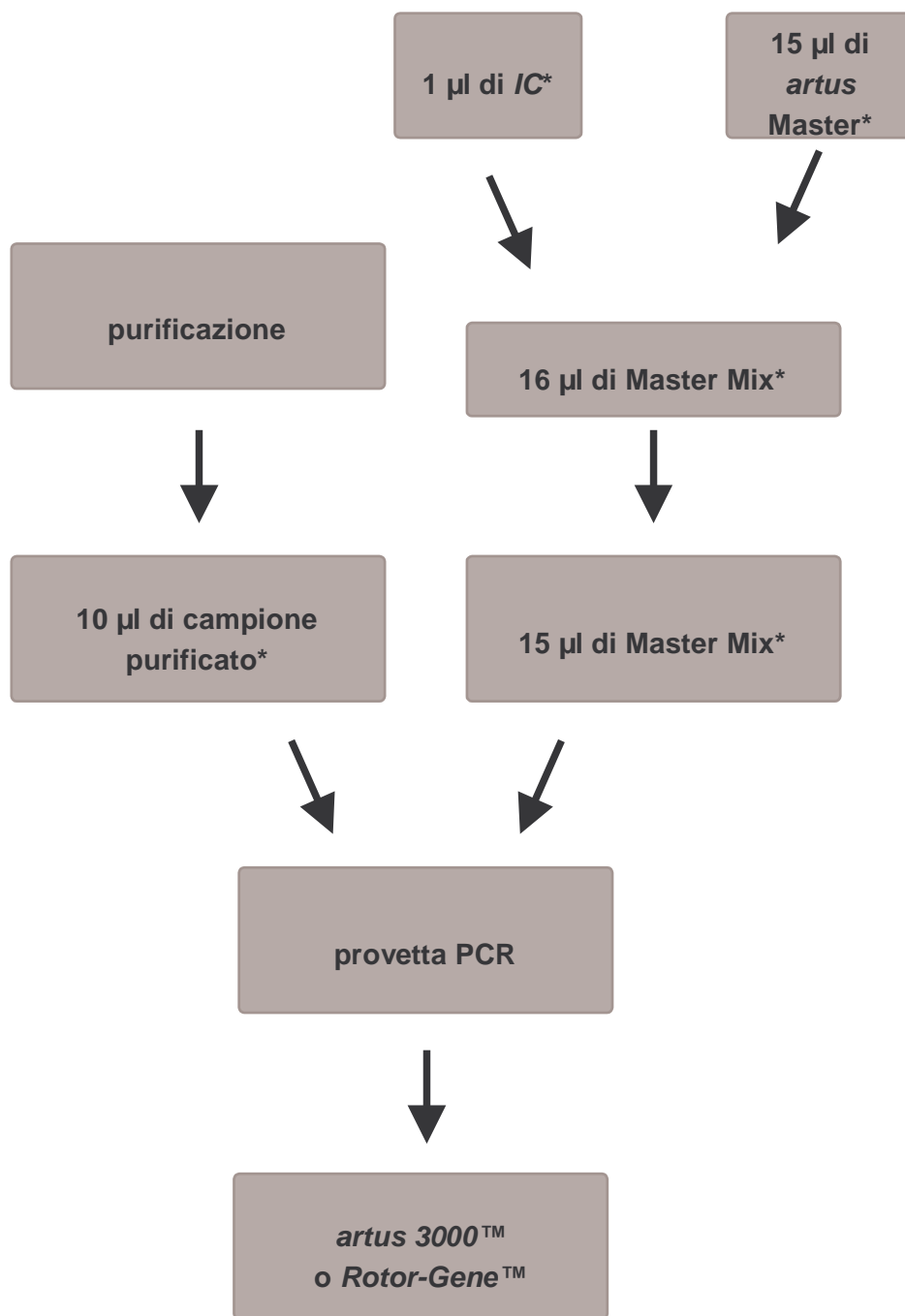


Fig. 2: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'inibizione della PCR.

* Per ogni fase del pipettamento è necessario che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

8.6 Programmazione dell'*artus 3000* o del

Rotor-Gene™ 3000

Per rilevare l'RNA di SARS-CoV programmare nell'*artus 3000* o nel *Rotor-Gene 3000* un profilo di temperatura secondo le seguenti sei fasi (vedi Fig. 3 - 8):

- | | | |
|----|--|--------|
| A. | Impostazione dei parametri generali della PCR | Fig. 3 |
| B. | Trascrizione inversa dell'RNA | Fig. 4 |
| C. | Attivazione iniziale dell'enzima Hot Start | Fig. 5 |
| D. | Amplificazione del cDNA | Fig. 6 |
| E. | Impostazione della sensibilità dei canali di fluorescenza | Fig. 7 |
| F. | Avvio della corsa nell' <i>artus 3000</i> o nel <i>Rotor-Gene 3000</i> | Fig. 8 |

Tutti i dati si riferiscono alla versione 5.0.69 del software *artus 3000* o alla versione 4.6.94 del software *Rotor-Gene*. Per ulteriori precisazioni sulla programmazione dell'*artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000* consultare l'*artus 3000 Software Manual* o il *Rotor-Gene Manual*, versione 4.6. Nelle figure tali impostazioni sono evidenziate da riquadri neri.

Prima di tutto inserire il volume di reazione per la PCR nella finestra di menu *New Experiment Wizard* (vedi Fig. 3).

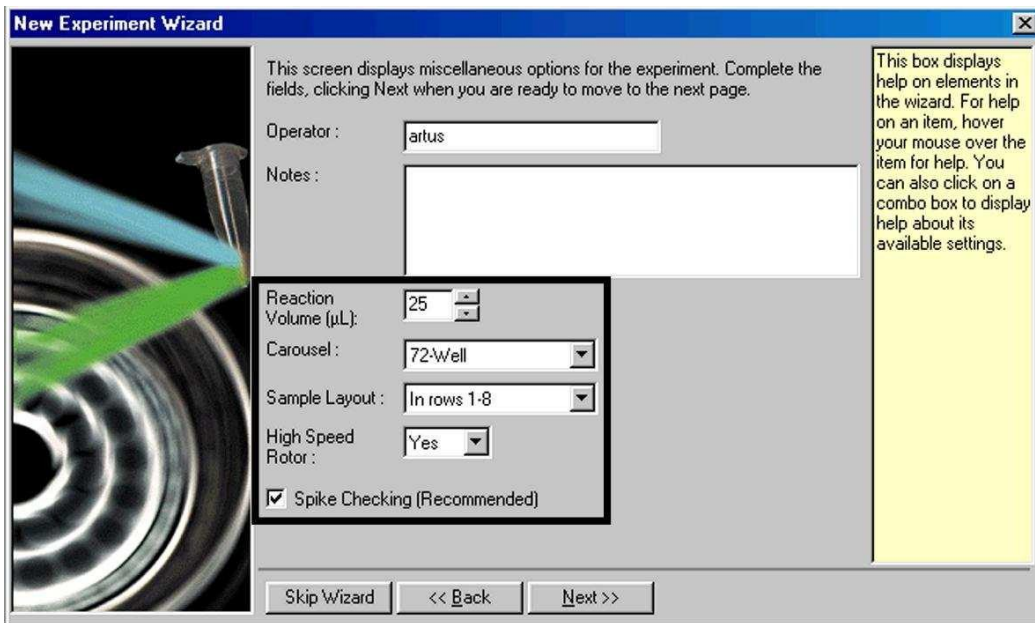


Fig. 3: Impostazione dei parametri generali della PCR.

La funzione *Edit* nella successiva finestra di menu *New Experiment Wizard* consente di programmare il profilo termico (vedi Fig. 4, 5 e 6).

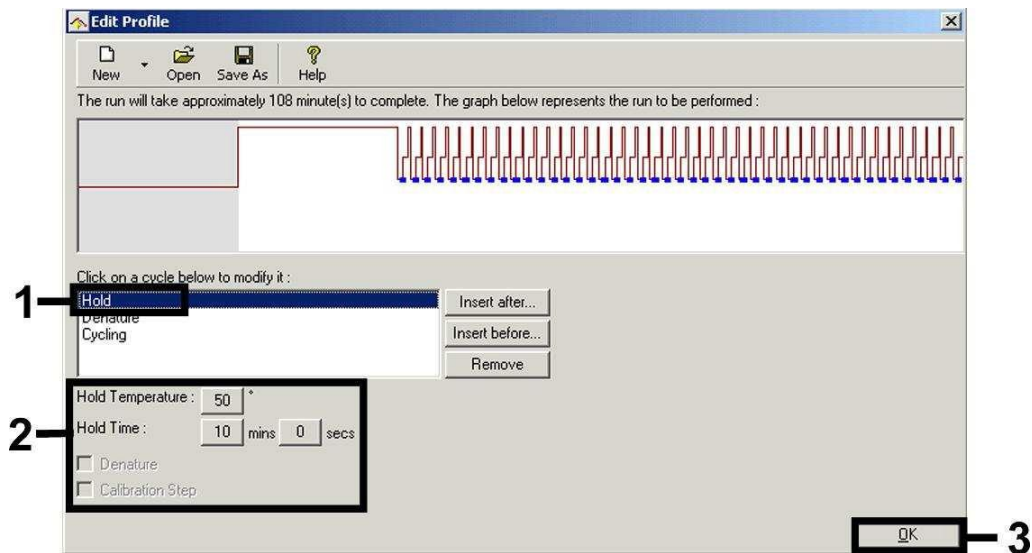


Fig. 4: Trascrizione inversa dell'RNA.

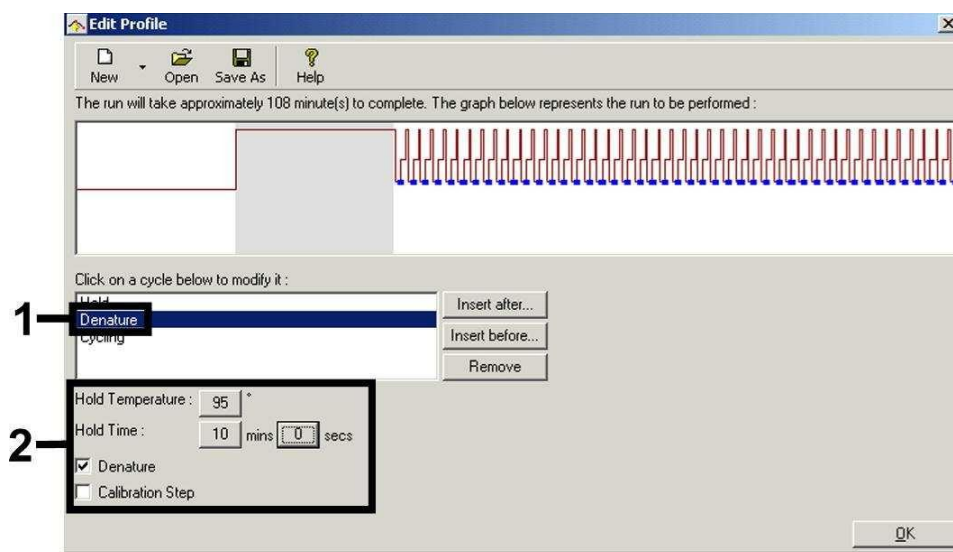


Fig. 5: Attivazione iniziale dell'enzima Hot Start.

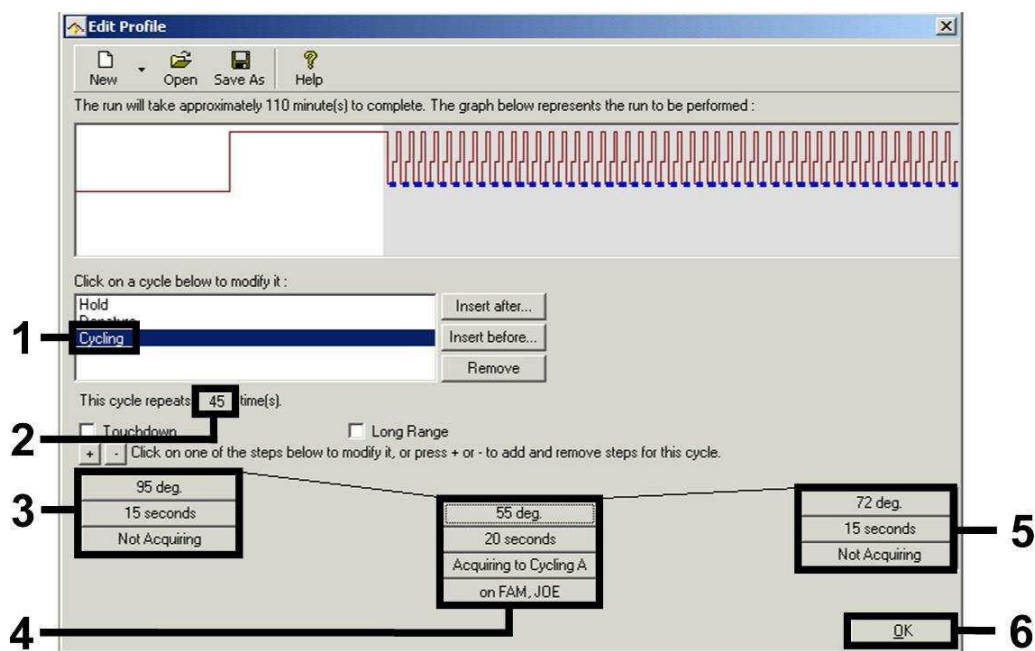


Fig. 6: Amplificazione del cDNA.

La sensibilità di lettura (gain) dei canali di fluorescenza deve essere determinata in base all'intensità di fluorescenza delle reazioni PCR. Tale impostazione viene definita nella finestra di menu *Auto Gain Calibration Setup* (selezionabile nella finestra di menu *New Experiment Wizard* alla voce *Calibrate*). Impostare la temperatura di calibrazione sulla temperatura di annealing del programma di amplificazione (vedi Fig. 7).

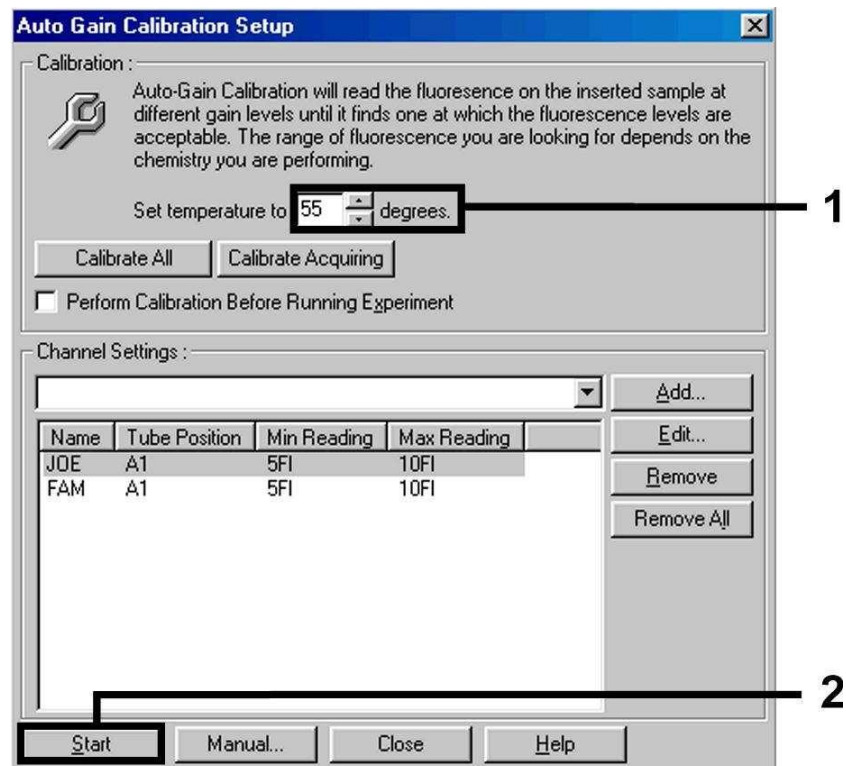


Fig. 7: Impostazione della sensibilità dei canali di fluorescenza.

I valori del "gain" determinati tramite la calibrazione del canale vengono salvati automaticamente e inseriti nell'ultima finestra del menu della programmazione (vedi Fig. 8).

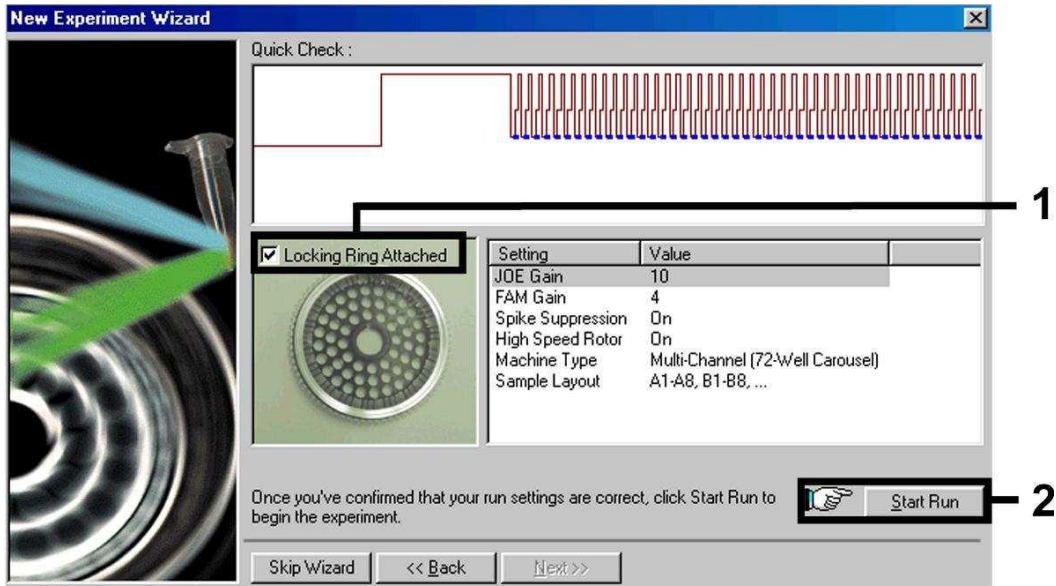


Fig. 8: Avvio della corsa nell'artus 3000 o nel Rotor-Gene 3000.

9. Analisi dei dati

L'analisi dei dati tramite il software *artus 3000* o *Rotor-Gene* avviene secondo le istruzioni del produttore (*artus 3000 Software Manual* o *Rotor-Gene Manual, Version 4.6*).

Si possono ottenere i seguenti risultati:

1. Nel canale di fluorescenza Cycling A.FAM viene rilevato un segnale.

Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene RNA di SARS- CoV.

In questo caso la rilevazione di un segnale nel canale Cycling A.JOE è trascurabile, poiché alte concentrazioni iniziali dell'RNA di SARS-CoV (segnale positivo nel canale Cycling A.FAM) possono portare ad un segnale di fluorescenza ridotto o assente del *Controllo interno* nel canale Cycling A.JOE (competizione).

2. Nel canale di fluorescenza Cycling A.FAM non viene rilevato il segnale, ma solo nel canale Cycling A.JOE (segnale del *Controllo interno*).

Nel campione non è possibile rilevare alcun RNA di SARS-CoV. Il risultato dell'analisi può essere quindi considerato negativo.

In caso di RT-PCR negativa per SARS-CoV il segnale del *Controllo interno* rilevato esclude la possibilità di inibizione della RT-PCR.

3. Non vengono rilevati segnali né nel canale Cycling A.FAM né in quello Cycling A.JOE.

Non è possibile formulare una diagnosi.

Per informazioni riguardo le origini degli errori e le possibili soluzioni consultare **10. Risoluzione dei problemi.**

Esempi di reazioni di PCR positive e negative vengono illustrati in Fig. 9 e Fig. 10.

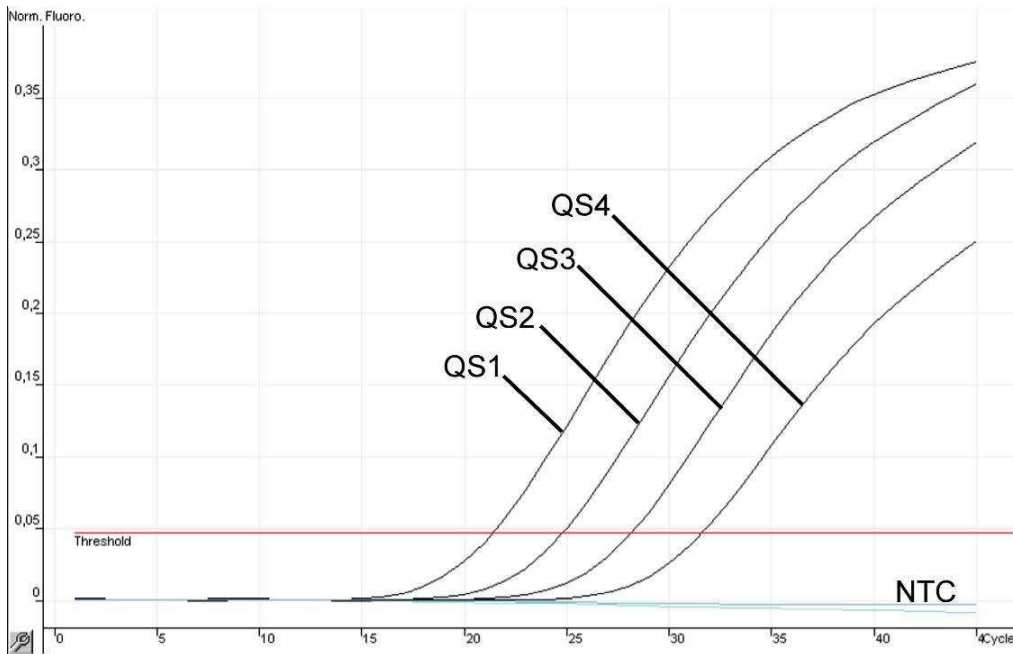


Fig. 9: Rilevazione degli *Standard di quantificazione* (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) nel canale di fluorescenza Cycling A.FAM. NTC: non-template control (controllo negativo).

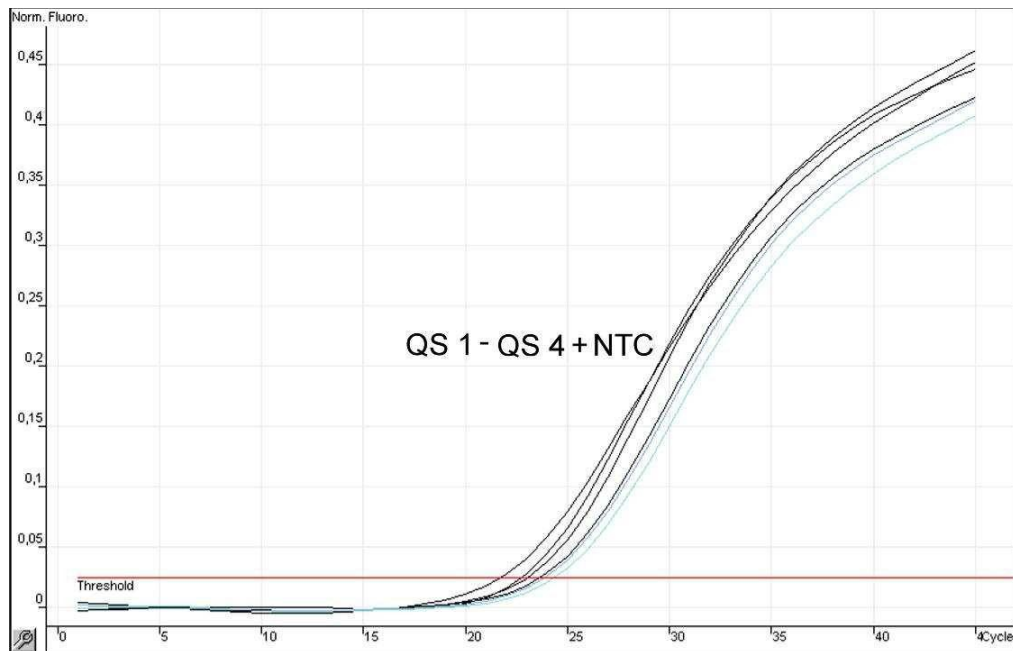


Fig. 10: Rilevazione del *Controllo interno (IC)* nel canale di fluorescenza Cycling A.JOE durante l'amplificazione degli *Standard di quantificazione* (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4). NTC: non-template control (controllo negativo).

10. Risoluzione dei problemi

Nessun segnale per i controlli positivi (SARS-CoV LC/RG/TM QS 1 - 4) nel canale di fluorescenza Cycling A.FAM:

- La selezione del canale di fluorescenza durante l'analisi dei dati della PCR non corrisponde a quanto indicato nel protocollo.
 - ❖ Per l'analisi dei dati selezionare il canale di fluorescenza Cycling A.FAM per la RT-PCR analitica di SARS-Coronavirus e il canale di fluorescenza Cycling A.JOE per la PCR del *Controllo interno*.
- Errata programmazione del profilo della temperatura dell'*artus 3000* o del *Rotor-Gene 3000*.
 - ❖ Confrontare il profilo della temperatura con quanto indicato nel protocollo (vedi **8.6 Programmazione dell'artus 3000 o del Rotor-Gene 3000**)
- Errata preparazione della reazione PCR.
 - ❖ Con l'aiuto dello schema di pipettamento (vedi **8.5 Preparazione della PCR**) verificare nuovamente le fasi operative eseguite e eventualmente ripetere la PCR.
- Le condizioni per la conservazione di uno o più componenti del kit non corrispondono a quanto indicato in **2. Conservazione** o è stata superata la data di scadenza dell'*artus SARS RG RT-PCR Kit*.
 - ❖ Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnale del *Controllo interno* debole o mancante nel canale di fluorescenza Cycling A.JOE e contemporanea assenza di segnale nel canale Cycling A.FAM:

- Le condizioni della PCR non corrispondono a quanto indicato nel protocollo.
 - ❖ Verificare le condizioni della PCR (vedi sopra) e eventualmente ripetere la PCR con le impostazioni corrette.

- La PCR è stata inibita.
 - ❖ Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.2 Estrazione dell'RNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
 - ❖ Accertarsi che durante l'estrazione del RNA e prima dell'eluizione sia stata eseguita l'ulteriore fase di centrifugazione consigliata per eliminare eventuali residui di etanolo (vedi **8.2 Estrazione dell'RNA**).
- Ci sono state perdite di RNA durante l'estrazione.
 - ❖ Se è stato aggiunto il *Controllo interno* alla procedura di purificazione, il mancato segnale del *Controllo interno* può indicare una perdita di RNA durante la purificazione. Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.2 Estrazione dell'RNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
- Le condizioni per la conservazione di uno o più componenti del kit non corrispondono a quanto indicato in **2. Conservazione** o è stata superata la data di scadenza dell'*artus SARS RG RT-PCR Kit*.
 - ❖ Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnale nel canale di fluorescenza CyclingA.FAM della RT-PCR analitica con i controlli negativi:

- Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR.
 - ❖ Ripetere la PCR in replicati con reagenti non ancora utilizzati.
 - ❖ Chiudere le singole provette PCR possibilmente subito dopo l'aggiunta del campione da analizzare.
 - ❖ Pipettare i controlli positivi rigorosamente per ultimi.
 - ❖ Assicurarsi che le superfici di lavoro e gli strumenti vengano regolarmente decontaminati.
- Si è verificata una contaminazione dovuta all'estrazione.
 - ❖ Ripetere l'estrazione e la PCR dei campioni da analizzare con reagenti non ancora utilizzati.

- ◆ Assicurarsi che le superfici di lavoro e gli strumenti vengano regolarmente decontaminati.

In caso di dubbi o problemi contattare il nostro servizio tecnico.

11. Specifiche

11.1 Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica dell'*artus* SARS RG RT-PCR Kit è stata effettuata una serie di diluizioni di uno standard da 10 a nominali 0,003 copie di RNA trascritte *in vitro* per μl dell'amplicone di SARS-CoV, poi analizzata con l'*artus* SARS RG RT-PCR Kit. Le analisi sono state eseguite in tre diversi giorni su otto replicati. Il risultato è stato determinato grazie a un'analisi probit, illustrata nella Fig. 11. Il limite di rilevabilità dell'*artus* SARS RG RT-PCR Kit è pertanto di 0,5 copie/ μl ($p = 0,05$). Ciò significa che la probabilità di rilevare 0,5 copie/ μl è pari al 95 %.

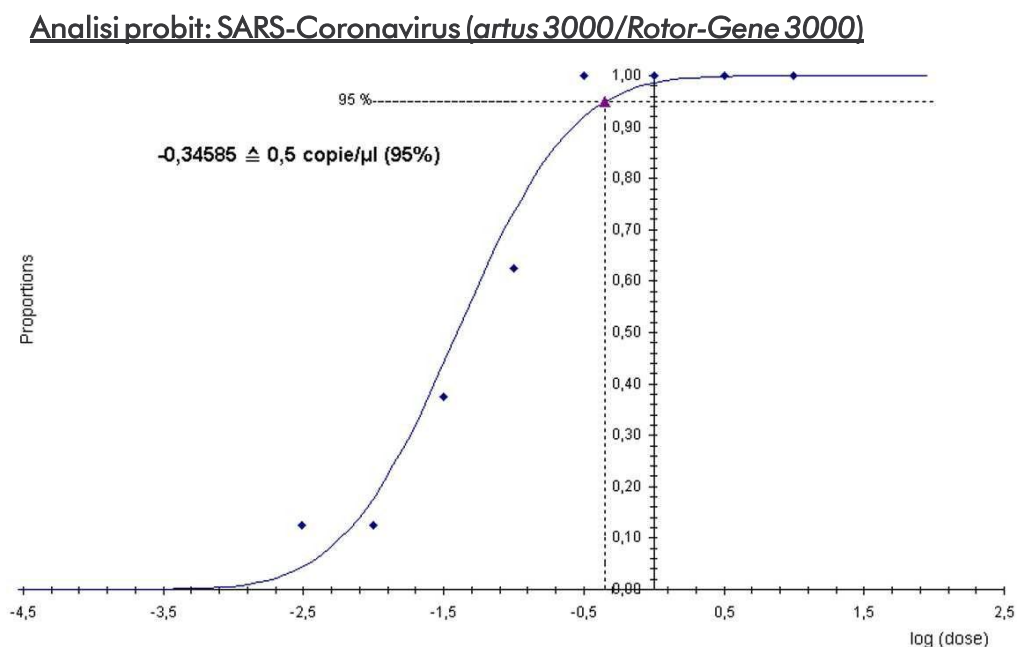


Fig. 11: Sensibilità analitica dell'*artus* SARS RG RT-PCR Kit.

11.2 Specificità

La specificità dell'*artus* SARS RG RT-PCR Kit viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti della reazione di PCR. Primer e sonde sono stati controllati per mezzo di un'apposita analisi di confronto delle sequenze, onde verificare l'eventuale presenza di omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genomiche. In tal modo è stato possibile controllare anche la rilevabilità di tutti i sottotipi e i genotipi significativi.

La convalida della specificità è stata effettuata inoltre su 30 diversi campioni di siero SARS-CoV-negativi, che non hanno generato alcun segnale con i primer e le sonde specifici per SARS-CoV contenuti nel SARS-CoV RG/TM Master.

Per determinare la specificità dell'*artus* SARS RG RT-PCR Kit il gruppo controllo presentato nella Tabella 1 è stato analizzato al fine di verificarne la reattività crociata. Nessuno degli agenti patogeni testati è risultato reattivo.

Tabella 1: analisi di specificità del kit con agenti patogeni potenzialmente dotati di reattività crociata.

Gruppo controllo	SARS-CoV (Cycling A.FAM)	Controllo interno (Cycling A.JOE)
HCoV OC 43 ATCC (Human coronavirus OC 43)	-	+
HCoV 229 E ATCC (Human coronavirus 229 E)	-	+
SB 1 + 4 HCoV (Human coronavirus SB 1 + 4)	-	+
SB 164 HCoV (Human coronavirus SB 164)	-	+
IBV Beaudelle (Avian infectious bronchitis virus Beaudelle)	-	+
BCV 212 (Bovine CoV212)	-	+
TGEV Perdue (Porcine transmissible gastroenteritis virus Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Porcine transmissible gastroenteritis virus Pur)	-	+

11.3 Precisione

I dati di precisione per l'*artus* SARS RG RT-PCR Kit consentono di determinare la varianza totale del sistema di analisi. Questa varianza totale consta della **variabilità intra-assay** (variabilità dei replicati dello stesso campione nello stesso saggio), della **variabilità inter-assay** (variabilità interna di laboratorio derivante dall'impiego da parte di persone diverse all'interno di un laboratorio e dall'utilizzo di diverse apparecchiature dello stesso tipo) e della **variabilità inter-lotto** (variabilità derivante dall'impiego di lotti diversi). In questo modo vengono determinate singolarmente la deviazione standard, la varianza ed il coefficiente di variazione sia per la PCR specifica dell'agente patogeno che per quella del *Controllo interno*.

Questi dati sono stati ottenuti per l'*artus* SARS RG RT-PCR Kit sulla base dello *Standard di quantificazione* alla concentrazione minima (QS 4; 10 copie/ μ l). Le analisi sono state eseguite con una serie di otto replicati. L'analisi dei risultati è stata ottenuta in base ai valori Ct delle curve di amplificazione (Ct: *threshold cycle*, vedi Tabella 2). Pertanto la dispersione totale di un campione qualsiasi alla detta concentrazione è pari a 1,66 % (Ct), mentre per la rilevazione del *Controllo interno* è pari a 1,28 %. Questi valori si basano sulla totalità di ciascuno dei valori delle variabilità determinate.

Tabella 2: dati di precisione sulla base dei valori Ct.

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-assay: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,15	0,02	0,48
Variabilità intra-assay: <i>Controllo interno</i>	0,40	0,15	1,67
Variabilità inter-assay: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,23	0,05	0,75
Variabilità inter-assay: <i>Controllo interno</i>	1,13	1,28	4,53
Variabilità inter-lotto: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,52	0,25	1,69
Variabilità inter-lotto: <i>Controllo interno</i>	0,94	0,63	3,62
Varianza totale: <i>SARS-CoV LC/RG/TM QS4</i>	0,51	0,26	1,66
Varianza totale: <i>Controllo interno</i>	1,13	1,28	1,28

11.4 Robustezza

Il controllo della robustezza serve per determinare la percentuale totale di errore dell'*artus SARS RG RT-PCR Kit*. A questo scopo 30 campioni di siero SARS-CoV-negativi sono stati miscelati ciascuno con 1,5 copie/ μ l del volume di eluzione dell'RNA controllo di SARS-CoV (tre volte la concentrazione del limite di sensibilità analitico), sono stati purificati con il QIAamp Viral RNA Mini Kit (vedi **8.2 Estrazione dell'RNA**) e infine analizzati con l'*artus SARS RG RT-PCR Kit*. Sul totale dei campioni la percentuale di errore per SARS-CoV era pari a 0 %. La robustezza del *Controllo interno* è stata ulteriormente verificata mediante purificazione ed analisi di 30 campioni di siero SARS-CoV-negativi. La percentuale d'errore totale era pari a 0 %. Non sono state riscontrate inibizioni di alcun genere. Pertanto la robustezza dell'*artus SARS RG RT-PCR Kit* è risultata pari a ≥ 99 %.

11.5 Riproducibilità

I dati di riproducibilità vengono rilevati allo scopo di effettuare una valutazione continua dell'*artus* SARS RG RT-PCR Kit ed anche per un confronto con altri prodotti. Questi dati sono ottenuti mediante la partecipazione a programmi di controllo di qualità interlaboratori.

11.6 Valutazione diagnostica

L'*artus* SARS RG RT-PCR Kit è attualmente in corso di valutazione in numerosi studi.

12. Avvertenze speciali per l'utilizzo del prodotto

- Tutti i reagenti devono essere impiegati esclusivamente per la diagnostica in vitro.
- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.
- Per ottenere risultati PCR ottimali è assolutamente necessario attenersi al protocollo.
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.

13. Informazioni di sicurezza

Per le informazioni di sicurezza riguardanti l'*artus* SARS RG RT-PCR Kit consultare la relativa scheda di sicurezza (safety data sheet, SDS), disponibile all'indirizzo www.qiagen.com/safety nel comodo e compatto formato PDF.












14. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione per la qualità di QIAGEN certificato ISO 9001 e ISO 13485 ogni lotto dell'*artus* SARS RG RT-PCR Kit è stato testato in base a specificità prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

15. Riferimento bibliografico

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.

16. Spiegazione dei simboli

	Utilizzare entro
	Codice del lotto
	Fabbricante
	Numero di catalogo
	Numero die materiale
	Manuale
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Etanolo
	Global Trade Item Number
	Contenuto sufficiente per <N> test
	Limiti di temperatura
QS	<i>Standard di quantificazione</i>
IC	<i>Controllo interno</i>

artus SARS RG RT PCR Kit

Marchi registrati e clausola di esclusione di responsabilità
QIAGEN®, QIAamp®, artus® **Rotor-Gene**® (Gruppo QIAGEN); Dacron® (Invista, Inc.).

Nomi, marchi registrati, ecc., usati in questo documento, anche se non contrassegnati specificatamente come tali, non devono essere considerati non protetti da legge.

L'artus SARS RG RT-PCR Kit è un kit diagnostico contrassegnato CE secondo la Direttiva Europea per la diagnostica In Vitro 98/79/CE. Non disponibile in tutti i paesi.

I kit QIAamp sono destinati all'uso generale di laboratorio. Le indicazioni o le rappresentazioni del prodotto non sono destinate a fornire indicazioni per la diagnosi, la prevenzione o il trattamento di malattie.

Con gli artus PCR Kits si acquisisce anche una licenza limitata per il loro impiego nelle procedure di reazione a catena della polimerasi (PCR) nell'ambito della diagnostica umana e veterinaria in vitro, in combinazione con un termociclo, il cui uso nell'esecuzione automatizzata della procedura PCR è coperto da licenza upfront da pagare o a Applied Biosystems o tramite l'acquisto di un termociclo autorizzato. La procedura PCR è coperta da equivalenti nazionali dei brevetti USA n. 5,219,727 e 5,322,770 e 5,210,015 e 5,176,995 e 6,040,166 e 6,197,563 e 5,994,056 e 6,171,785 e 5,487,972 e 5,804,375 e 5,407,800 e 5,310,652 e 5,994,056 in possesso di F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007-2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

