

Manuale del kit *artus*[®] WNV LC RT-PCR



Diagnostica quantitativa in vitro

Per l'uso con lo strumento *LightCycler*[®]

Dicembre 2014 — Versione 1



4509063, 4509065



1046924IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R3

MAT

1046924IT



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN è un fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e test che consentono di isolare e rilevare il contenuto di qualunque 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 del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori 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.....	6
6. Principio della real-time PCR	7
7. Descrizione del prodotto	7
8. Protocollo.....	8
8.1 Estrazione dell'RNA	8
8.2 Controllo interno	9
8.3 Quantificazione.....	10
8.4 Preparazione della PCR.....	11
8.5 Programmazione dello strumento <i>LightCycler</i>	15
9. Analisi dei dati	18
10. Risoluzione dei problemi.....	21
11. Specifiche	23
11.1 Sensibilità analitica.....	23
11.2 Specificità.....	24
11.3 Precisione.....	26
11.4 Robustezza	28
11.5 Riproducibilità.....	28
11.6 Valutazione diagnostica	28
12. Limiti per l'uso del prodotto.....	28
13. Informazioni sulla sicurezza.....	29

14. Controllo di qualità.....	29
15. Riferimenti bibliografici	29
16. Spiegazione dei simboli.....	30

Kit *artus* WNV LC RT-PCR

Per l'uso con lo strumento *LightCycler*.

1. Contenuto

	Etichettatura e contenuto	Cat. n. 4509063 24 reazioni
Blu	<i>WNV LC Master</i>	2 x 12 reazioni
Rosso	<i>WNV LC/TM QS 1^a</i> <i>4 x 10⁴ copie/μl</i>	1 x 200 μl
Rosso	<i>WNV LC/TM QS 2^a</i> <i>4 x 10³ copie/μl</i>	1 x 200 μl
Rosso	<i>WNV LC/TM QS 3^a</i> <i>4 x 10² copie/μl</i>	1 x 200 μl
Rosso	<i>WNV LC/TM QS 4^a</i> <i>4 x 10¹ copie/μl</i>	1 x 200 μl
Verde	<i>WNV LC IC^c</i>	1 x 1000 μl
Bianco	<i>Acqua (grado PCR)</i>	1 x 1000 μl

- QS = *Standard di quantificazione*
IC = *Controllo interno*

2. Conservazione

I componenti del kit *artus* WNV LC RT-PCR devono essere conservati ad una temperatura compresa tra -15°C e -30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e congelarli più di due volte, poiché ciò potrebbe ridurre la sensibilità del test. 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.

3. Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- Guanti monouso non talcati
- Kit di estrazione dell'RNA (vedi 8.1 Estrazione dell'RNA)
- Pipette (regolabili)
- Puntali per pipette sterili con filtri
- Agitatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- *Color Compensation Set* (cat. n. 2 158 850) per l'installazione di un file *Crosstalk Color Compensation*
- Capillari *LightCycler* (20 µl)
- Blocco di raffreddamento *LightCycler*
- Strumento *LightCycler*
- Strumento di chiusura *LightCycler*

4. Precauzioni generali

Chi utilizza il prodotto deve sempre attenersi a quanto segue:

- Utilizzare puntali con filtro sterili per pipette.
- Conservare ed estrarre i materiali positivi (campioni, controlli e ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerli alla miscela di reazione in un ambiente fisicamente separato.
- Prima dell'inizio del test scongelare accuratamente tutti i componenti a temperatura ambiente.
- Una volta scongelati, miscelare i componenti e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare su ghiaccio o sul blocco di raffreddamento *LightCycler* con una certa rapidità.

5. Informazioni sull'agente patogeno

Il virus del Nilo occidentale (WNV) appartiene alla famiglia Flaviviridae (genere *Flavivirus*). Normalmente, le zanzare infette pungono e infettano gli uccelli selvatici, che rappresentano il principale veicolo del virus, ma il WNV

può infettare anche cavalli e altri mammiferi. L'80% di tutti gli esseri umani infetti non manifesta sintomi correlati al WNV. In rari casi, l'infezione da WNV di persone anziane, bambini e pazienti immunodepressi può causare encefalite mortale o miocardite.

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. Nella real-time PCR la rilevazione del prodotto di amplificazione richiede l'impiego di coloranti fluorescenti, di solito legati a sonde oligonucleotidiche, che si legano in modo specifico al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare il prodotto interessato senza dover riaprire le provette di reazione al termine della PCR (Mackay, 2004).

7. Descrizione del prodotto

Il kit *artus* WNV LC RT-PCR è un kit pronto all'uso per la rilevazione dell'RNA del WNV tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) nello strumento *LightCycler*. Il *WNV LC Master* contiene reagenti ed enzimi per la trascrittasi inversa e l'amplificazione specifica di una regione di 72 bp del genoma del WNV, nonché per la rilevazione immediata dell'amplicone specifico nel canale F1 del fluorimetro dello strumento *LightCycler*. Il kit *artus* WNV LC RT-PCR contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologa per verificare una possibile inibizione della PCR. Questa viene rilevata come *Controllo interno (IC)* nel canale F3 del fluorimetro. In questo modo non viene ridotto il limite di rilevabilità analitica della RT-PCR di WNV (vedi **11.1** Sensibilità analitica). Il kit comprende controlli positivi esterni (*WNV LC/TM QS 1 – 4*), che consentono di determinare la carica dell'agente patogeno. A tale proposito, consultare il paragrafo **8.3** Quantificazione.

8. Protocollo

8.1 Estrazione dell'RNA

Sono disponibili kit per l'estrazione dell'RNA di diversi produttori. Le quantità di campioni necessarie per l'estrazione dell'RNA dipendono dal protocollo utilizzato. Si prega di effettuare l'estrazione dell'RNA seguendo le istruzioni del produttore del kit. Si raccomanda l'utilizzo del seguente kit di estrazione:

Campione	Kit di estrazione dell'acido nucleico	Numero di catalogo	Produttore	Carrier RNA
Siero, plasma, FCS	QIAamp® Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	incluso

- L'aggiunta di **carrier RNA** è di fondamentale importanza per l'efficacia dell'estrazione e, quindi, per la resa del DNA/RNA. Per aumentare la stabilità del carrier RNA in dotazione con il kit QIAamp Viral RNA Mini si consiglia di seguire la seguente procedura discrepante rispetto a quanto indicato nel manuale utente del kit di estrazione:
 - a. Prima del primo utilizzo risospendere il carrier RNA liofilizzato del kit di estrazione in 310 µl di tampone AE o tampone AVE (tampone di eluizione, concentrazione finale di 1 µg/µl, non utilizzare tampone di lisi). Dividere questa soluzione del carrier RNA in numerose aliquote conformi alle proprie esigenze e conservarle a -20°C. Evitare di ricongelare più di 2 volte un' aliquota del carrier RNA.
 - b. Prima di cominciare ogni estrazione, si raccomanda di preparare una miscela fresca di tampone di lisi e carrier RNA (e *Controllo interno*, se applicabile, vedi **8.2** Controllo interno) secondo il seguente schema di pipettamento:

Numero di campioni	1	12
Tampone AVL	560 µl	6720 µl
Carrier RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Volume totale	565,6 µl	6787,2 µl
Volume per estrazione	560 µl	560 µl ciascuno

- c. Utilizzare immediatamente per l'estrazione il tampone di lisi appena preparato. Non è ammessa la conservazione della miscela!
- Se le procedure di estrazione prevedono tamponi di lavaggio contenenti **etanolo**, eseguire una fase di centrifugazione aggiuntiva (tre minuti, 13.000 giri/min) prima dell'eluizione per rimuovere eventuali residui di etanolo. Ciò impedisce eventuali inibizioni della PCR.
 - Il kit *artus* WNV LC RT-PCR non deve essere usato con metodi di estrazione a base di **fenolo**.

Importante: il *Controllo interno* del kit *artus* WNV LC RT-PCR può essere utilizzato direttamente nella procedura di estrazione (vedi **8.2** Controllo interno).

8.2 Controllo interno

Il kit include un *Controllo interno* (*WNV LC IC*), che permette all'utilizzatore **sia di controllare la procedura di estrazione dell'RNA che di verificare una possibile inibizione della PCR** (vedi Fig. 1). Per tale applicazione aggiungere durante l'estrazione il *Controllo interno* in un rapporto di 0,1 µl per 1 µl del volume di eluizione. Per esempio, se si utilizza il kit QIAmp Viral RNA Mini, l'RNA viene eluito in 60 µl di tampone AVE. Inizialmente, si devono aggiungere quindi 6 µl del *Controllo interno*. Se si esegue l'eluizione ad es. in 50 µl, successivamente utilizzare il corrispondente volume di 5 µl. La quantità di *Controllo interno* impiegato dipende **solo** dal volume di eluizione. Si noti che il *Controllo interno* deve essere aggiunto alla miscela di tampone di lisi e di campione. In alternativa, il *Controllo interno* può essere aggiunto direttamente al tampone di lisi. In via opzionale, è possibile aggiungere il carrier RNA unitamente al *Controllo interno* al tampone di lisi (vedi **8.1** Estrazione dell'RNA). Tuttavia, la miscela di *Controllo interno*/carrier RNA e tampone di lisi va preparata al momento e usata immediatamente dopo la sua preparazione (la conservazione della miscela a temperatura ambiente o in frigo può portare già dopo poche ore ad un'anomalia del *Controllo interno* e quindi ad una minore efficacia della procedura di estrazione). **Non** aggiungere il *Controllo interno* direttamente al campione!

In via opzionale, il *Controllo interno* può essere utilizzato **esclusivamente per verificare una possibile inibizione della PCR** (vedi Fig. 2). A tale scopo aggiungere per ogni reazione 0,5 µl di *Controllo interno* direttamente a 15 µl di *HBV WNV LC Master*. Per ogni reazione di PCR utilizzare 15 µl di miscela master* preparata come descritto sopra, quindi aggiungere 5 µl di campione purificato. Se si prepara una PCR per diversi campioni, aumentare il volume del *WNV LC Master* e del *Controllo interno* in base al numero di campioni (vedi **8.4** Preparazione della PCR).

8.3 Quantificazione

Gli *Standard di quantificazione* in dotazione (*WNV LC/TM QS 1 – 4*) vengono trattati come campioni precedentemente purificati e se ne utilizza lo stesso volume (5 µl). Per generare una curva standard sullo strumento *LightCycler*, tutti i quattro *Standard di quantificazione* devono essere utilizzati e definiti nella *Sample Loading Screen* (Schermata caricamento campioni) come standard con le concentrazioni specificate (vedi il manuale dell'operatore del *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*, versione 3.5, capitolo B, 2.4. Inserimento dei dati del campione). La curva standard generata come sopra indicato può essere utilizzata anche per processi successivi, a condizione che almeno uno standard di **una** data concentrazione venga utilizzato nel rispettivo processo. A tale scopo occorre importare la curva standard precedentemente generata (vedi il manuale dell'operatore del *LightCycler (LightCycler Operator's Manual)*, versione 3.5, capitolo B, 4.2.5. Quantificazione con una curva standard esterna). Tuttavia, questo metodo di quantificazione può causare discrepanze nei risultati a causa della variabilità fra i diversi processi PCR.

Attenzione: Gli *Standard di quantificazione* sono definiti come copie/µl. Si deve applicare la seguente equazione per convertire i valori, determinati mediante la curva standard, in copie/ml di campione.

* 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.

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

In linea di principio, 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 l'estrazione).

Importante: una guida per l'analisi quantitativa dei kit *artus* sullo strumento *LightCycler* è disponibile nel sito www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX (**Nota tecnica per la quantificazione sullo strumento *LightCycler***).

8.4 Preparazione della PCR

Accertarsi che il blocco di raffreddamento e gli adattatori per capillari (accessori dello strumento *LightCycler*) siano stati pre-raffreddati a +4°C. Collocare il numero desiderato di capillari del *LightCycler* negli adattatori del blocco di raffreddamento. Accertarsi che in ogni PCR siano inclusi almeno uno *Standard di quantificazione* e almeno un controllo negativo (*acqua, grado PCR*). Per generare una curva standard, utilizzare per ogni PCR tutti gli *Standard di quantificazione (WNV LC/TM QS 1 – 4)*. Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli ripetutamente su e giù o capovolgendoli più volte) e centrifugati brevemente.

È possibile utilizzare il *Controllo interno per monitorare l'estrazione dell'RNA e verificare una possibile inibizione della PCR*, perché questo è già stato aggiunto all'estrazione (vedi **8.2** Controllo interno). In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (per una panoramica schematica vedi Fig. 1):

	Numero di campioni	1	12
1. Preparazione della miscela master	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0 µl	0 µl
	Volume totale	15 µl	180 µl
2. Preparazione della PCR	Miscela master	15 µl	15 µl ciascuno
	Campione	5 µl	5 µl ciascuno
	Volume totale	20 µl	20 µl ciascuno

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

	Numero di campioni	1	12
1. Preparazione della miscela master	<i>WNV LC Master</i>	15 µl	180 µl
	<i>WNV LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	Volume totale	15,5 µl*	186 µl
2. Preparazione della PCR	Miscela master	15 µl	15 µl ciascuno
	Campione	5 µl	5 µl ciascuno
	Volume totale	20 µl	20 µl ciascuno

Pipettare 15 µl della miscela master nel bulbo in plastica di ciascun capillare. Successivamente, aggiungere 5 µl del campione di RNA eluito. A questo punto, occorre utilizzare 5 µl di almeno uno degli *Standard di quantificazione (WNV LC/TM QS 1 – 4)* come controllo positivo e 5 µl di acqua (*acqua, grado PCR*) come controllo negativo. Chiudere i capillari. Per trasferire la miscela dal bulbo in plastica nel capillare, centrifugare gli adattatori contenenti i capillari in una centrifuga da banco per dieci secondi a max. 400 x g (2.000 giri/min).

* 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 estrazione

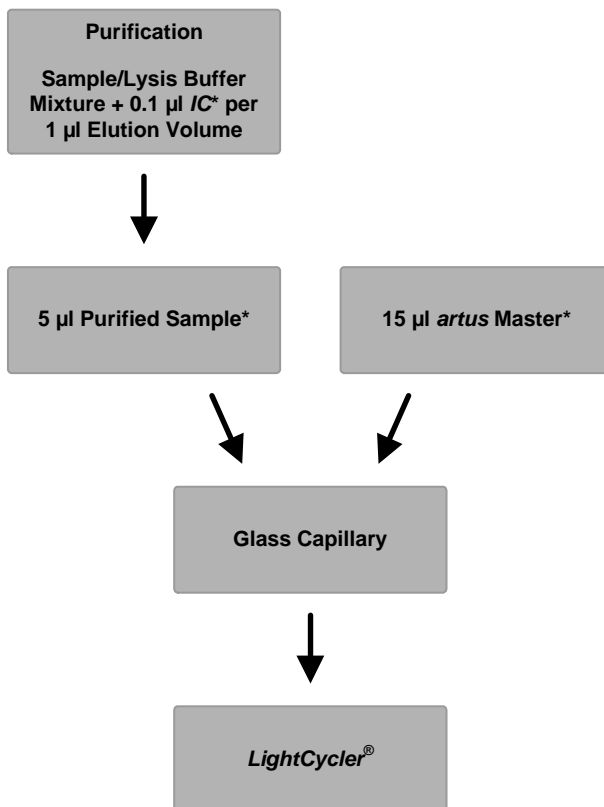


Fig. 1: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'estrazione e dell'inibizione della PCR.

*Accertarsi che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

Aggiunta del *Controllo interno* al master *artus*

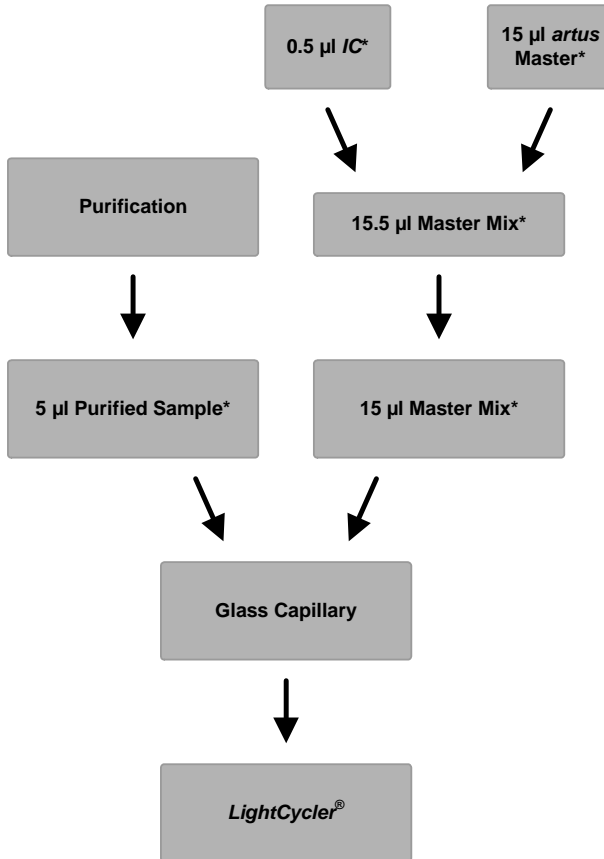


Fig. 2: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'inibizione della PCR.

*Accertarsi che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

8.5 Programmazione dello strumento *LightCycler*

Per rilevare l'RNA del WNV creare un profilo della temperatura sullo strumento *LightCycler* seguendo le quattro fasi operative riportate di seguito (vedi Fig. 3 — 6).

- A. Trascrittasi inversa dell'RNA Fig. 3
- B. Attivazione iniziale dell'enzima hot-start Fig. 4
- C. Amplificazione del cDNA Fig. 5
- D. Raffreddamento Fig. 6

Prestare particolare attenzione alle impostazioni relative a *Analysis Mode* (Modalità di analisi), *Cycle Program Data* (Dati del programma ciclo) e *Temperature Targets* (Target di temperatura). Nelle figure queste impostazioni sono evidenziate da un riquadro nero in grassetto. Per maggiori informazioni sullo strumento *LightCycler* consultare il manuale dell'operatore del *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*).

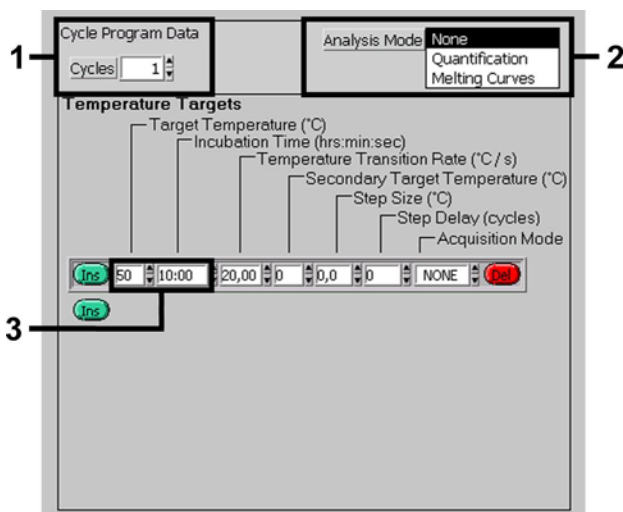


Fig. 3: Trascrittasi inversa dell'RNA.

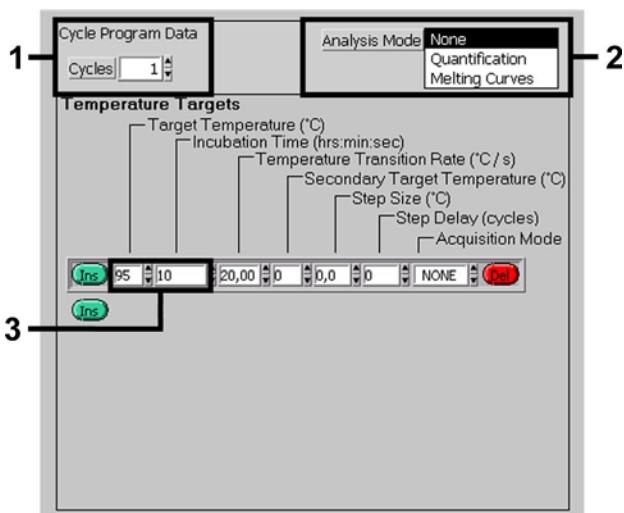


Fig. 4: Attivazione iniziale dell'enzima hot-start.

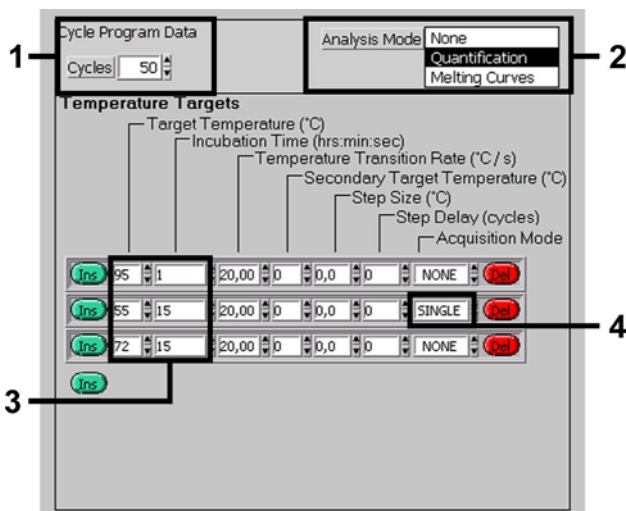


Fig. 5: Amplificazione del cDNA.

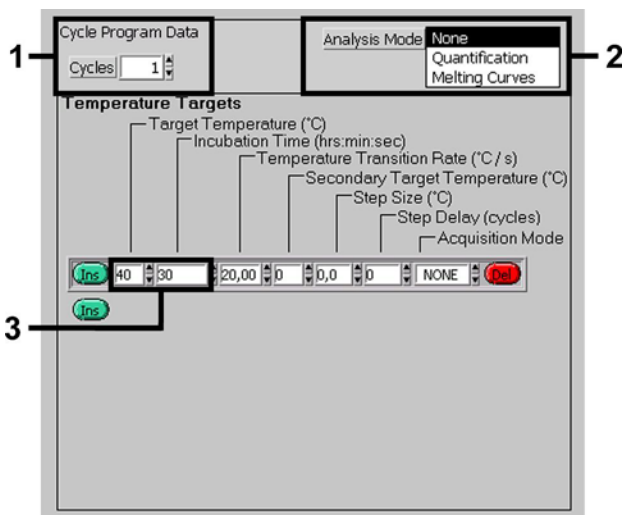


Fig. 6: Raffreddamento.

9. Analisi dei dati

Nelle analisi multicolore si verificano interferenze fra i canali del fluorimetro. Il software dello strumento *LightCycler* include un file chiamato *Color Compensation File* (File compensazione colore), che compensa queste interferenze. Per aprire questo file prima, durante o dopo la PCR occorre attivare il *Choose CCC File* (File seleziona CCC) oppure utilizzare il pulsante *Select CC Data* (Seleziona dati CC). Se non è installato il *Color Compensation File*, generare il file in base alle istruzioni riportate nel manuale dell'operatore del *LightCycler* (*LightCycler Operator's Manual*). Dopo aver attivato il *Color Compensation File*, nei canali F1, F2 e F3 del fluorimetro compaiono segnali separati. Per l'analisi dei risultati della PCR ottenuti con il kit *artus WNV LC RT-PCR* selezionare le opzioni di visualizzazione della fluorescenza F1 per la RT-PCR analitica del WNV e F3/Back-F1* per la RT-PCR del *Controllo interno*. Per l'analisi dei processi quantitativi seguire le istruzioni fornite nel paragrafo **8.3** Quantificazione e nella **Nota tecnica per la quantificazione sullo strumento *LightCycler*** disponibile nel sito www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX.

Si possono ottenere i seguenti risultati:

1. Un segnale viene rilevato nel canale F1 del fluorimetro.

Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene RNA di WNV.

In questo caso, la rilevazione di un segnale nel canale F3/Back-F1 è superflua, perché le elevate concentrazioni iniziali di RNA di WNV (segnale positivo nel canale -F1) possono dare origine a un segnale di fluorescenza ridotto o assente del *Controllo interno* nel canale F3/Back-F1 (fenomeno di competizione).

2. Nel canale F1 del fluorimetro non viene rilevato alcun segnale. Al tempo stesso viene rilevato un segnale dal *Controllo interno* nel canale F3/Back-F1.

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

* Se si utilizzano versioni precedenti (versione 3.3 e precedenti), l'opzione di visualizzazione F3/Back-F1 non è disponibile. In questo caso selezionare F3/F1.

In caso di RT-PCR negativa per WNV, il segnale del *Controllo interno* rilevato esclude la possibilità d'inibizione della PCR.

3. Non viene rilevato alcun segnale nel canale F1 o nel canale F3/Back-F1.

Non è possibile formulare una diagnosi.

Per informazioni riguardanti le cause degli errori e le possibili soluzioni, consultare **10. Risoluzione dei problemi**.

Alcuni esempi di reazioni PCR positive e negative sono riportati nella Fig. 7 e nella Fig. 8.

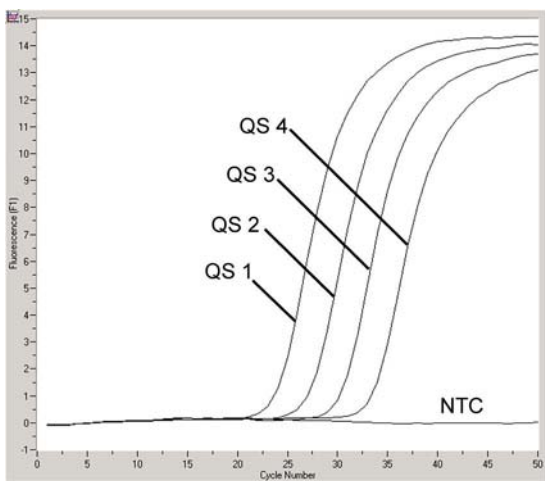


Fig. 7: Rilevazione degli *Standard di quantificazione (WNV LC/TM QS 1 – 4)* nel canale F1 del fluorimetro. NTC: controllo non-template (controllo negativo).

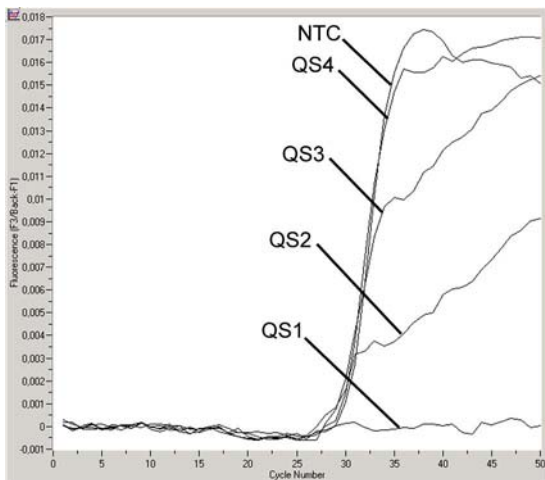


Fig. 8: Rilevazione del *Controllo interno (IC)* nel canale F3/Back-F1 del fluorimetro con amplificazione simultanea degli *Standard di quantificazione (WNV LC/TM QS 1 – 4)*. NTC: controllo non-template (controllo negativo).

10. Risoluzione dei problemi

Nessun segnale con i controlli positivi (WNV LC/TM QS 1 – 4) nel canale F1 del fluorimetro:

- Il canale del fluorimetro selezionato per l'analisi dei dati PCR non è conforme al protocollo.
 - Per l'analisi dei dati selezionare il canale F1 del fluorimetro per la RT-PCR analitica del WNV e il canale F3/Back-F1 del fluorimetro per la PCR del *Controllo interno*.
- Programmazione errata del profilo della temperatura dello strumento *LightCycler*.
 - Confrontare il profilo della temperatura con il protocollo (vedi **8.5 Programmazione dello strumento *LightCycler***).
- Errata configurazione della reazione PCR.
 - Controllare le fasi operative eseguite con lo schema di pipettamento (vedi **8.4 Preparazione della PCR**) e ripetere la PCR, se necessario.
- Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in **2. Conservazione** o il kit *artus WNV LC RT-PCR* è scaduto.
 - Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnale debole o assente del *Controllo interno* nel canale F3/Back--F1 del fluorimetro e assenza simultanea di un segnale nel canale F1:

- 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 **8.1 Estrazione dell'RNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.

- Accertarsi che durante l'estrazione dell'RNA e prima dell'eluizione sia stata eseguita l'ulteriore fase di centrifugazione consigliata per eliminare eventuali residui di etanolo (vedi **8.1 Estrazione dell'RNA**).
- RNA perso durante l'estrazione.
 - Se è stato aggiunto il *Controllo interno* alla procedura di estrazione, il mancato segnale del *Controllo interno* può indicare una perdita di RNA durante l'estrazione. Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi **8.1 Estrazione dell'RNA**) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
- Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in **2. Conservazione** o il kit *artus WNV LC RT-PCR* è scaduto.
 - Verificare sia le condizioni di conservazione che la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnali con i controlli negativi nel canale F1 del fluorimetro della PCR analitica.

- Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR.
 - Ripetere la PCR in replicati con reagenti non ancora utilizzati.
 - Se possibile, chiudere le provette per PCR subito dopo l'aggiunta del campione da testare.
 - Pipettare i controlli positivi rigorosamente per ultimi.
 - Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
- Si è verificata una contaminazione durante l'estrazione.
 - Ripetere l'estrazione e la PCR del campione da testare utilizzando nuovi reagenti.
 - Verificare che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

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

11. Specifiche

11.1 Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica del kit *artus* WNV LC RT-PCR sono state effettuate serie di diluizioni degli standard da 40 al valore nominale di 0,01265 di copie di RNA trascritte in vitro per microlitro dell'amplicone di WNV e poi analizzate con il kit *artus* WNV LC RT-PCR. Le analisi sono state eseguite in tre giorni diversi su otto replicati. I risultati sono stati determinati grazie a un'analisi probit. La Fig. 9 illustra graficamente l'analisi probit. Il limite di rilevabilità del kit *artus* WNV LC RT-PCR Kit è di 2,4 copie/ μ l ($p = 0,05$). Ciò significa che la probabilità di rilevare 2,4 copie/ μ l è pari al 95%.

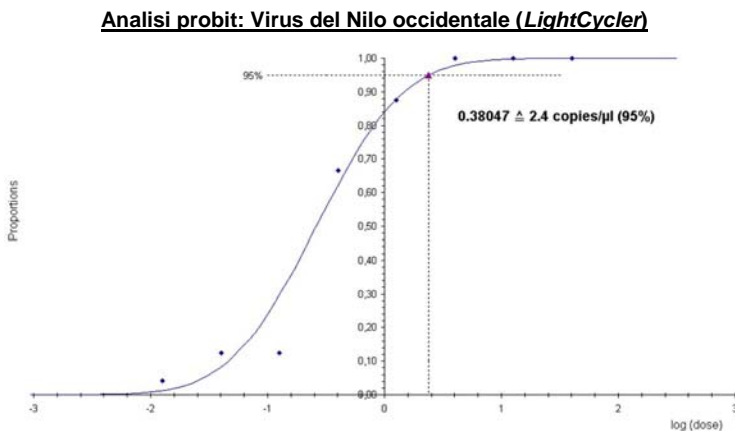


Fig. 9: Sensibilità analitica del kit *artus* WNV LC RT-PCR.

11.2 Specificità

La specificità del kit *artus* WNV LC RT-PCR viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti di reazione. I primer e le sonde sono stati controllati per accertare eventuali omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genetiche mediante analisi comparativa delle sequenze. La rilevabilità di tutti i ceppi importanti di WNV è stata così assicurata da un allineamento del database.

Inoltre, è stata studiata l'influenza del DNA genomico sulla rilevazione dei campioni WNV-positivi. È stato dimostrato che grandi quantità di DNA genomico in una PCR possono inibire la reazione di PCR. Il kit *artus* WNV LC RT-PCR non deve essere usato con campioni a bassa concentrazione cellulare.

Inoltre, la specificità è stata convalidata con 30 diversi campioni di plasma e fluido cerebrospinale WNV-negativi. Questi campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde specifici per WNV inclusi nel *WNV LC Master*.

Per determinare la specificità del kit *artus* WNV LC RT-PCR è stato testato il gruppo di controllo indicato nella seguente tabella (vedi Tabella 1) per rilevare una potenziale cross-reattività. Nessuno degli agenti patogeni testati è risultato reattivo.

Tabella 1: Test della specificità del kit con patogeni potenzialmente cross-reattivi.

Gruppo di controllo	WNV (F1)	Controllo interno (F3/Back-F1)
Virus dell'encefalite di Saint Louis	–	+
Virus dell'encefalite giapponese	–	+
Virus della febbre gialla	–	+
Virus della dengue tipo 1	–	+
Virus della dengue tipo 2	–	+
Virus della dengue tipo 3	–	+
Virus della dengue tipo 4	–	+
Virus dell'encefalite del pipistrello del genere Myotis del Montana	–	+
Virus Modoc	–	+
Virus dell'herpes umano 1 (virus herpes simplex 1)	–	+
Virus dell'herpes umano 2 (virus herpes simplex 2)	–	+
Virus dell'herpes umano 3 (virus della varicella-zoster)	–	+
Virus dell'herpes umano 5 (citomegalovirus)	–	+
Virus dell'immunodeficienza umana	–	+
Enterovirus 71	–	+
Coxsackievirus A7	–	+
Coxsackievirus A24	–	+
Coxsackievirus B3	–	+
Echovirus 30	–	+
Virus dell'epatite A	–	+
Virus dell'epatite B	–	+
Virus dell'epatite C	–	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	–	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	–	+
<i>Listeria welshmerii</i>	–	+
<i>Listeria ivanovii</i>	–	+

11.3 Precisione

I dati sulla precisione del kit *artus* WNV LC RT-PCR consentono di determinare la varianza totale del sistema di analisi. La varianza totale è costituita dalla **variabilità intra--assay** (variabilità di risultati multipli di campioni con la stessa concentrazione all'interno di uno stesso esperimento), dalla **variabilità inter--assay** (variabilità di risultati multipli del test ottenuti su diversi strumenti dello stesso tipo da diversi operatori all'interno dello stesso laboratorio) e dalla **variabilità inter--lotto** (variabilità di risultati multipli del test ottenuti utilizzando diversi lotti). In questo modo vengono calcolate 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 il kit *artus* WNV LC RT-PCR sulla base dello *Standard di quantificazione* alla minima concentrazione (QS 4; 40 copie/μl). Le analisi sono state eseguite con una serie di otto replicati. I dati sulla precisione sono stati calcolati in base ai valori Ct delle curve di amplificazione (Ct: ciclo soglia, vedi Tabella 2). Inoltre, i dati sulla precisione per i risultati quantitativi in copie/μl sono stati stabiliti utilizzando i corrispondenti valori Ct (vedi Tabella 3). Pertanto, la dispersione statistica totale di un campione qualsiasi alla concentrazione sopra indicata è pari a 0,79 % (Ct) o 10,12 % (conc.), mentre per la rilevazione del *Controllo interno* è pari a 4,28 % (Ct). Questi valori si basano sulla totalità di tutti i singoli valori della variabilità calcolata.

Tabella 2: Dati sulla precisione basati sui valori Ct

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-assay: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,07	0,01	0,22
Variabilità intra-assay: <i>Controllo interno</i>	0,14	0,02	0,46
Variabilità inter-assay: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,30	0,09	0,91
Variabilità inter-assay: <i>Controllo interno</i>	0,32	0,10	1,09
Variabilità inter-lotto: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,13	0,02	0,40
Variabilità inter-lotto: <i>Controllo interno</i>	1,28	1,63	4,62
Varianza totale: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	0,26	0,07	0,79
Varianza totale: <i>Controllo interno</i>	1,23	1,51	4,28

Tabella 3: Dati sulla precisione basati sui risultati quantitativi (in copie/μl).

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-assay: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,16	4,65	5,38
Variabilità inter-assay: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	5,63	31,73	13,95
Variabilità inter-lotto: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	2,53	6,40	6,31
Varianza totale: <i>WNV LC/TM QS 4</i>	4,07	16,56	10,12

11.4 Robustezza

Il controllo della robustezza serve per determinare la percentuale totale di errore del kit *artus* WNV LC RT-PCR. Sono stati aggiunti a 30 campioni di plasma e fluido cerebrospinale WNV -negativi 7,2 copie/μl di volume di eluizione dell'RNA a lunghezza intera del virus del Nilo occidentale (all'incirca tre volte la concentrazione del limite di sensibilità analitica). Dopo estrazione con il kit QIAamp Viral RNA Mini (vedi 8.1 Estrazione dell'RNA), questi campioni sono stati analizzati con il kit *artus* WNV LC RT-PCR. Sul totale dei campioni la percentuale di errore per WNV era pari a 0%. La robustezza del *Controllo interno* è stata ulteriormente verificata mediante estrazione ed analisi di 30 campioni di plasma e fluido cerebrospinale WNV-negativi. La percentuale totale di errore era pari allo 0%. Non sono state riscontrate inibizioni di alcun genere. Pertanto la robustezza del kit *artus* WNV LC RT-PCR è risultata pari al $\geq 99\%$.

11.5 Riproducibilità

Non sono disponibili test interlaboratorio aggiornati per la rilevazione del virus del Nilo occidentale mediante real-time PCR. I dati di riproducibilità vengono acquisiti nell'ambito di studi di convalida esterni e studi collaterali e nel confronto con altri prodotti nell'ambito di studi diagnostici (vedi 11.6 Valutazione diagnostica).

11.6 Valutazione diagnostica

Attualmente, il kit *artus* WNV LC RT-PCR è oggetto di una serie di studi di valutazione.

12. Limiti per l'uso del prodotto

- L'uso di tutti i reagenti è riservato esclusivamente alla 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 ottimali della PCR è necessario attenersi rigorosamente al protocollo.
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.
- Sebbene accada raramente, eventuali mutazioni nelle regioni altamente conservate del genoma virale coperte dai primer e/o dalla sonda del kit possono essere causa di una sotto-quantificazione o perfino della mancata individuazione del virus. La validità e le prestazioni del kit vengono revisionate ad intervalli regolari.

13. Informazioni sulla sicurezza

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e i relativi componenti.

Smaltire i campioni e i residui dei test secondo le locali disposizioni in materia di sicurezza.

14. Controllo di qualità

In conformità con il sistema globale di gestione per la qualità di QIAGEN ogni lotto del kit *artus* WNV LC RT-PCR è stato testato in base a specifiche prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

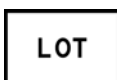
15. Riferimenti bibliografici

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

16. Spiegazione dei simboli



Data di scadenza



Codice del lotto



Produttore



Numero di catalogo



Numero di materiale



Manuale



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Componenti



Contiene



Numero



Codice GTIN



<N>

Contenuto sufficiente per <N> test



Limite di temperatura



Consultare le istruzioni per l'uso

QS

Standard di quantificazione

IC

Controllo interno

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Kit *artus* WNV LC RT-PCR

Marchi commerciali e disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (Gruppo QIAGEN); *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

L'acquisto di questo prodotto ne consente l'uso all'acquirente per l'esecuzione di servizi per la diagnostica umana in vitro. Con il presente non si concede nessun brevetto generico o licenza di altro tipo in aggiunta agli specifici diritti di utilizzo garantiti dall'acquisto.

L'ACQUISTO DI QUESTO PRODOTTO GARANTISCE ALL'ACQUIRENTE IL DIRITTO, SECONDO UNO O PIÙ DEI BREVETTI AMERICANI N° 6,174,670, 7,160,998, 6,569,627 E 6,245,514 E RELATIVI CORRISPONDENTI BREVETTI STRANIERI, DI UTILIZZARE IL PRODOTTO ESCLUSIVAMENTE PER ESEGUIRE TEST DIAGNOSTICI IN VITRO NEGLI ESSERI UMANI E NEGLI ANIMALI. CON IL PRESENTE DOCUMENTO NON SI CONCEDE ALCUN BREVETTO GENERICO O LICENZA DI ALTRO TIPO IN AGGIUNTA AGLI SPECIFICI DIRITTI DI UTILIZZO GARANTITI DALL'ACQUISTO.

Contratto di Licenza Limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione, da parte dell'acquirente o dell'utente del kit *artus* WNV LC RT-PCR, dei seguenti termini:

1. Il kit *artus* WNV LC RT-PCR deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *manuale del kit artus WNV LC RT-PCR* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit stesso. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *manuale del kit artus WNV LC RT-PCR* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato, e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

Kit QIAamp Viral RNA Mini

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

© 2007-2014 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046924IT 148051765



Sample & Assay Technologies