

Istruzioni per l'uso

RealStar[®] PIV RT-PCR Kit 2.0

11/2019 IT

RealStar[®]

PIV RT-PCR Kit 2.0

Per uso con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



262013



96



11 2019



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	10
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale	12
6.2	Tipi di campioni	12
7.	Avvertenze e precauzioni	13
8.	Procedura	14
8.1	Preparazione del campione	14
8.2	Preparazione della Master Mix.....	15
8.3	Preparazione della reazione	17
9.	Programmazione dello strumento PCR in tempo reale	18
9.1	Impostazioni	18
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti)	18
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti	19
10.	Analisi dei dati.....	19
10.1	Validità dei test diagnostici	20
10.1.1	Test diagnostico valido	20
10.1.2	Test diagnostico non valido	20
10.2	Interpretazione dei risultati	21
10.2.1	Analisi qualitativa	21

11.	Dati di performance	21
11.1	Sensibilità analitica.....	22
11.2	Specificità analitica.....	25
11.3	Precisione	26
11.4	Valutazione diagnostica	30
12.	Limitazioni	31
13.	Controllo di qualità	32
14.	Assistenza tecnica	32
15.	Letteratura	32
16.	Marchi e brevetti.....	33
17.	Spiegazione dei simboli	34

1. Uso previsto

Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di virus parainfluenzale umano (PIV) delle specie 1, 2, 3 e 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Il test consente inoltre la differenziazione tra l'RNA specifico per il genere *Respirovirus* (PIV-1 e PIV-3) e per il genere *Rubulavirus* (PIV-2 e PIV-4).

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 PIV-1 + PIV-2	1	250
Arancia	Positive Control PIV-3 + PIV-4	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® PIV RT-PCR Kit 2.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare Altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2°C e +8°C non deve superare un periodo di due ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere il capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato (vedere il capitolo 8.1 Preparazione del campione)
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Vortex mixer
- Piastre di reazione o provette di reazione appropriate a 96 pozzetti con materiale di chiusura (ottico) corrispondente
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro (monouso)
- Guanti senza polvere (monouso)

NOTA



Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

NOTA



Si consiglia di utilizzare il rotore a 72 pozzetti con le appropriate provette di reazione da 0,1 ml, se si utilizza il Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o il Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informazioni generali

I virus parainfluenzali umani (PIV) sono virus a RNA a singolo filamento negativo della famiglia dei *Paramyxoviridae*. I PIV umani si suddividono in quattro specie appartenenti a due diversi generi: PIV-1 e PIV-3 sono assegnati al genere *Respirovirus*, mentre PIV-2 e PIV-4 sono assegnati al genere *Rubulavirus*. Per PIV-4 sono state descritte due sottospecie (PIV-4a e PIV-4b) poco dopo l'identificazione del virus nel 1959. Oggi si è rilevata l'esistenza di genotipi eterogenei per tutte le specie PIV.

Dopo il *virus respiratorio sinciziale umano* (RSV), le infezioni da PIV sono la seconda causa più comune di malattia delle basse vie respiratorie (LRTI) grave nei bambini piccoli. Studi sierologici hanno dimostrato che dal 90% al 100% dei bambini a partire dai 5 anni di età presentano anticorpi contro il PIV-3 e il 75% circa anticorpi contro il PIV-1 e il PIV-2. Le infezioni da virus parainfluenzali rappresentano un problema significativo anche negli anziani, in individui affetti da patologie cardiopolmonari e nei soggetti immunocompromessi. Re-infezioni ricorrenti si verificano nel corso di tutta la vita dell'individuo, ma in genere negli adulti si manifestano come malattia delle alte vie respiratorie (URTI) lieve.

In generale, i PIV umani sono stati associati a qualsiasi tipo di URTI e LRTI. Tra le specie e le sindromi cliniche specifiche, l'età dei pazienti e la stagione di insorgenza si sono spesso osservate le seguenti relazioni:

- PIV-1 è la principale causa di croup in neonati e bambini piccoli, ma causa anche infezioni lievi delle alte vie respiratorie, faringite e tracheobronchite in tutti i gruppi di età. Ai climi temperati, il PIV-1 provoca epidemie biennali di croup nei mesi autunnali.
- PIV-2 è generalmente associato a tassi di infezione inferiori rispetto a PIV-1 o PIV-3 e provoca URTI lieve e croup nei bambini, e occasionalmente LRTI. Come con PIV-1, le epidemie tendono a verificarsi principalmente nei mesi autunnali con frequenza annuale o biennale.
- PIV-3 è una delle principali cause di LRTI grave in neonati e bambini, spesso responsabile di croup, bronchite e polmonite in bambini di età inferiore a 1 anno.

Nei bambini più grandi e negli adulti può provocare URTI o tracheobronchite. Le infezioni da PIV-3 possono insorgere in qualsiasi stagione, con un picco di attività nei mesi primaverili e di inizio estate di ogni anno.

- PIV-4 è il virus meno comune del gruppo ed è generalmente associato a URTI lievi.

NOTA



A causa dell'evoluzione molecolare relativamente veloce dei virus RNA, sussiste un rischio intrinseco, per ogni sistema di test basato sulla RT-PCR, che un accumulo di mutazioni nel tempo possa portare a risultati falso-negativi.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di virus parainfluenzale umano (PIV) delle specie 1, 2, 3 e 4 (PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4). Il test consente inoltre la differenziazione tra l'RNA specifico per il genere *Respirovirus* (PIV-1 e PIV-3) e per il genere *Rubulavirus* (PIV-2 e PIV-4).

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

La tecnologia RT-PCR in tempo reale utilizza la reazione della trascrittasi inversa (RT) per convertire l'RNA in DNA complementare (cDNA), la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target particolari e sonde target-specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono marcate con un reporter fluorescente (fluoroforo) ed un quencher.

Le sonde specifiche per PIV-1 e PIV-3 sono marcate con il fluoroforo FAM™, mentre le sonde specifiche per PIV-2 e PIV-4 sono marcate con il fluoroforo Cy®5. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde collegate a coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo di PIV-1/3 (genere Respirovirus), PIV-2/4 (genere Rubulavirus), e del controllo interno nei corrispondenti canali di rilevamento dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende tre processi in un'unica provetta:

- Trascrittasi inversa dell'RNA target e del controllo interno in cDNA
- Amplificazione PCR del cDNA target e controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control PIV-1 + PIV-2
- Positive Control PIV-3 + PIV-4
- Water (PCR grade)

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

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

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, trascrittasi inversa, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire la trascrizione inversa, l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento dell'RNA specifico di PIV-1-4 e del controllo interno in una configurazione di reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

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

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Tipi di campioni

Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è stato validato per l'uso con il tipo di campione seguente:

- Tamponi respiratori umani raccolti in mezzo di trasporto universale (UTM)

Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è stato validato utilizzando l'AltoStar® Purification Kit 1.5 su l'AltoStar® Automation System AM16 per l'estrazione degli acidi nucleici e la purificazione.

Se si applica un'appropriata procedura di estrazione degli acidi nucleici, con il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è possibile utilizzare altri tipi di campione. L'idoneità della procedura di estrazione degli acidi nucleici e l'utilizzo di ulteriori tipi di campioni deve essere convalidata 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

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

La qualità dell'RNA 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 adatti per l'estrazione dell'acido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- AltoStar® Automation System AM16
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMag® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è stato validato utilizzando l'AltoStar® Purification Kit 1.5 su l'AltoStar® Automation System AM16 per l'estrazione degli acidi nucleici e la purificazione.

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato o come controllo di inibizione della RT-PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della RT-PCR.

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della RT-PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione del campione, impostare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
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 RT-PCR, aggiungere l'IC durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- ▶ Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se l'acido nucleico deve essere eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, devono essere aggiunti 6 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.
- ▶ Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, preparare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
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 Master Mix e esecuzione del saggio.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1.000 x g (~ 3.000 rpm).

9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

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

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

9.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

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

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
RNA specifico di PIV-1 ePIV-3	PIV-1/3	FAM™	(Nessuno)
RNA specifico di PIV-2 e PIV 4a/b	PIV-2/4	Cy®5	(Nessuno)
Controllo interno	IC	JOE™	(Nessuno)

9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

- Impostare il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Fase	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Durata [min:sec]
Trascrizione inversa	Mantenimento	1	-	55	20:00
Denaturazione	Mantenimento	1	-	95	02:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	55	00:45
			-	72	00:15

10. Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

10.1 Validità dei test diagnostici

10.1.1 Test diagnostico valido

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

Controllo	Canale		
	FAM™	Cy®5	JOE™
Controllo positivo per PIV-1 + PIV-2	+	+	+/-*
Controllo positivo per PIV-3 + PIV-4	+	+	+/-*
Controllo negativo	-	-	+

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

10.1.2 Test diagnostico non valido

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

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

10.2 Interpretazione dei risultati

10.2.1 Analisi qualitativa

Canale			Interpretazione dei risultati
FAM™	Cy ⁵	JOE™	
+	-	+*	Rilevato RNA specifico di PIV-1 e/o PIV-3.
-	+	+*	Rilevato RNA specifico di PIV-2 e/o PIV-4a/b.
+	+	+*	Rilevato RNA specifico di PIV-1 e/o PIV-3 <u>e</u> rilevato RNA specifico di PIV-2 e/o PIV-4a/b.
-	-	+	Nessun RNA PIV-1-specifico, PIV-2-specifico, PIV-3-specifico, PIV-4a-specifico, né PIV-4b-specifico rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di questi RNA specifici.
-	-	-	Inibizione della RT-PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

* Il rilevamento del controllo interno nel canale di rilevamento JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento FAM™ o del canale di rilevamento Cy⁵. Un elevato carico dell'RNA di PIV nel campione può portare a segnali di controllo interno ridotti o assenti.

11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è stata effettuata materiale di virus dei seguenti ceppi PIV: PIV-1: ATCC® VR-94™; PIV-2: ATCC® VR-92™; PIV-3: ATCC® VR-93™; PIV-4a: ATCC® VR-1378™; PIV-4b: ATCC® VR-1377™.

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è definita come la concentrazione (copie/ml) di molecole dell'RNA specifico di PV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a o PIV-4b che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali di specie PIV nel mezzo di trasporto universale. Materiale virale di PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4a e PIV-4b è stato fornito dall'American Type Culture Collection (ATCC).

Ogni diluizione è stata testata in 8 replicati in 3 giorni diversi (n totale = 24 per diluizione) utilizzando combinazioni di 3 lotti del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0, 3 lotti dell'AltoStar® Purification Kit 1.5 e 3 lotti dell'AltoStar® Internal Control 1.5. I test sono stati effettuati utilizzando 3 diversi strumenti AltoStar® Automation System AM16 e CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System.

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

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

Conc. in ingresso [copie/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	22	92
3,16E+01	24	12	50
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	3	13
1,00E+00	24	1	4

Tab. 2: Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico di PIV-2

Conc. in ingresso [copie/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	17	71
1,00E+01	24	9	38
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	3	13

Tab. 3: Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico di PIV-3

Conc. in ingresso [copie/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	17	71
3,16E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

Tab. 4: Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico di PIV-4a

Conc. in ingresso [copie/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	23	96
1,00E+02	24	14	58
3,16E+01	24	9	38
1,00E+01	24	7	29
3,16E+00	24	0	0
1,00E+00	24	0	0

Tab. 5: Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico di PIV-4b

Conc. in ingresso [copie/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	22	92
1,00E+02	24	9	38
3,16E+01	24	3	13
1,00E+01	24	2	8
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

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

- Per il rilevamento dell'RNA specifico di PIV-1, la sensibilità analitica è di 203 copie/ml [intervallo di confidenza del 95% (IC): 114 - 493 copie/ml]
- Per il rilevamento dell'RNA specifico di PIV-2, la sensibilità analitica è di 146 copie/ml [intervallo di confidenza del 95% (IC): 78 - 383 copie/ml]
- Per il rilevamento dell'RNA specifico di PIV-3, la sensibilità analitica è di 301 copie/ml [intervallo di confidenza del 95% (IC): 186 - 656 copie/ml]
- Per il rilevamento dell'RNA specifico di PIV-4a, la sensibilità analitica è di 456 copie/ml [intervallo di confidenza del 95% (IC): 256 - 1,096 copie/ml]
- Per il rilevamento dell'RNA specifico di PIV-4b, la sensibilità analitica è di 754 copie/ml [intervallo di confidenza del 95% (IC): 436 - 1,754 copie/ml]

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è assicurata dall'accurata selezione degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili per garantire che tutte le specie di PIV pertinenti fossero rilevate.

La specificità analitica del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è stata valutata analizzando patogeni correlati a PIV e/o che causano sintomi simili a PIV.

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

- Adenovirus umano 1
- Adenovirus umano 2
- Adenovirus umano 3
- Adenovirus umano 4
- Virus respiratorio sinciziale umano A
- Virus respiratorio sinciziale umano B
- Metapneumovirus umano A2
- Metapneumovirus umano B2
- Influenzavirus A
- Influenzavirus B
- Enterovirus (Coxsackievirus A3)
- Rhinovirus
- Coronavirus umano
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

Sono state inoltre testate specie PIV da 1 a 4. Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 non ha generato segnali falsi positivi nel canale di rilevamento specifico di PIV-1 e PIV-3 durante il test di PIV-2, PIV-4a e/o PIV-4b. Non sono stati inoltre osservati segnali falsi positivi nel canale di rilevamento specifico di PIV-2 e PIV-4 durante il test di PIV-1 e/o PIV-3.

11.3 Precisione

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

I dati di variabilità sono espressi in termini di coefficiente di variazione sulla base dei valori del ciclo soglia (C_t). Almeno 6 replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

Tab. 6: Dati di precisione (CV % [valori C_t]) per campioni UTM positivi alti a PIV-1

	Campione positivo alto a PIV-1 [CV% in base al valore C _t]
Variabilità intra-dosaggio	0,41 - 2,90
Variabilità inter-dosaggio	1,11 - 1,99
Variabilità inter-lotto	1,79
Variabilità totale	1,56

Tutti i campioni analizzati a 3x LoD (campioni positivi bassi) sono stati rilevati positivi.

Tab. 7: Dati di precisione (CV % [valori C_t]) per PIVcampioni UTM positivi alti a PIV-2

	Campione positivo alto a PIV-2 [CV% in base al valore C _t]
Variabilità intra-dosaggio	0,21 - 1,91
Variabilità inter-dosaggio	1,38 - 2,19
Variabilità inter-lotto	1,35
Variabilità totale	1,95

Tutti i campioni analizzati a 3x LoD (campioni positivi bassi) sono stati rilevati positivi.

Tab. 8: Dati di precisione (CV % [valori C_i]) per campioni UTM positivi alti a PIV-3

	Campione positivo alto a PIV-3 [CV% in base al valore C _i]
Variabilità intra-dosaggio	0,45 - 4,04
Variabilità inter-dosaggio	1,55 - 2,41
Variabilità inter-lotto	2,80
Variabilità totale	2,42

Tutti i campioni analizzati a 3x LoD (campioni positivi bassi) sono stati rilevati positivi.

Tab. 9: Dati di precisione (CV % [valori C_i]) per campioni UTM positivi alti a PIV-4a

	Campione positivo alto a PIV-4a [CV% in base al valore C _i]
Variabilità intra-dosaggio	0,35 - 0,77
Variabilità inter-dosaggio	1,40 - 1,88
Variabilità inter-lotto	1,07
Variabilità totale	1,96

Tutti i campioni analizzati a 3x LoD (campioni positivi bassi) sono stati rilevati positivi.

Tab. 10: Dati di precisione (CV % [valori C_t]) per PIVcampioni UTM positivi alti a PIV-4b

	Campione positivo alto a PIV-4b [CV% in base al valore C_t]
Variabilità intra-dosaggio	0,63 - 1,50
Variabilità inter-dosaggio	2,09 - 3,07
Variabilità inter-lotto	1,35
Variabilità totale	2,42

Tutti i campioni analizzati a 3x LoD (campioni positivi bassi) sono stati rilevati positivi.

Tab. 11: Dati di precisione (CV % [valori C_t]) per il rilevamento del controllo interno in campioni UTM negativi a PIV

	Controllo interno
Variabilità intra-dosaggio	0,33 - 0,94
Variabilità inter-dosaggio	0,82 - 2,07
Variabilità inter-lotto	0,47
Variabilità totale	1,64

11.4 Valutazione diagnostica

Il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 è stato valutato in uno studio comparativo con il RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) Kit marcato CE.

In retrospettiva, 80 campioni di tamponi respiratori sono stati analizzati in parallelo utilizzando un RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) Kit in combinazione con il MagNA PURE 96 DNA e il Viral NA Small Volume Kit (Roche) e il MagNA Pure 96 System (Roche) e utilizzando il RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 in combinazione con l'AltoStar® Purification Kit 1.5 e l'AltoStar® Internal Control 1.5 sull'AltoStar® Automation System AM16 e sul CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System. Per l'analisi qualitativa tutti i campioni con un risultato non valido per uno o entrambi i test sono stati esclusi. I risultati dei 72 campioni rimanenti sono riportati alla Tabella 12.

Tab. 12: Risultati della valutazione della sensibilità diagnostica e della specificità del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 in tamponi respiratori

		RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm)	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0	POSITIVO	32	1
	NEGATIVO	0	39

La sensibilità diagnostica e la specificità del RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 rispetto al RIDA® GENE Parainfluenza (r-biopharm) kit sono state, rispettivamente, del 100 % e del 97,5 %.

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 RT-PCR (ad es. eparina) può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma PIV 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 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® PIV RT-PCR Kit 2.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

14. Assistenza tecnica

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

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

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

15. Letteratura

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

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

16. Marchi e brevetti

RealStar® (altona Diagnostics); AltoStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); SmartCycler® (Cepheid); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute®, QIASymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.
















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

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

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2019 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:

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

