

Istruzioni per l'uso

RealStar[®]

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

04/2019 IT

RealStar®

Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0

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)



164013



96



04 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	9
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale	11
7.	Avvertenze e precauzioni	11
8.	Procedura	13
8.1	Preparazione del campione	13
8.2	Preparazione della Master Mix.....	14
8.3	Preparazione della reazione	16
9.	Programmazione dello strumento PCR in tempo reale	17
9.1	Impostazioni	17
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti)	17
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti	18
10.	Analisi dei dati.....	18
10.1	Validità dei test diagnostici	19
10.1.1	Test diagnostico valido (qualitativo)	19
10.1.2	Test diagnostico invalido (qualitativo).....	19
10.2	Interpretazione dei risultati	20
10.2.1	Analisi qualitativa	20
11.	Dati di performance	21

11.1	Sensibilità analitica.....	21
11.2	Specificità analitica.....	23
11.3	Precisione	24
12.	Limitazioni	26
13.	Controllo di qualità	27
14.	Assistenza tecnica	27
15.	Letteratura	27
16.	Marchi e brevetti.....	28
17.	Spiegazione dei simboli	29

1. Uso previsto

Il RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione dell'RNA specifico di virus dell'influenza A, virus dell'influenza B e virus influenza A (H1N1)pdm09 (precedentemente designato come influenza A virus H1N1nv).

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	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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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, controllo interno e controllo positivo, 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)
- Tamponi appropriati per la raccolta di campioni
- 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

L'influenza è una patologia infettiva causata da virus a RNA della famiglia degli *Orthomyxoviridae* (virus dell'influenza). I virus dell'influenza sono caratterizzati dal cambiamento continuo degli antigeni di superficie principali emoagglutinina (H) e neuraminidasi (N) (drift antigenico). Questi virus infettano uccelli e mammiferi tramite gli aerosol. I virus dell'influenza A e dell'influenza B umana causano gravi infezioni prevalentemente localizzate nel tratto respiratorio, i cui sintomi più frequenti sono febbre e tosse. Nei casi più gravi, l'influenza causa una polmonite che può essere fatale, in particolare nei bambini e nelle persone anziane.

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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione dell'RNA specifico di virus dell'influenza A, virus dell'influenza B e virus influenza A (H1N1)pdm09 (precedentemente designato come influenza A virus H1N1nv).

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

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

Le sonde specifiche per l'RNA di influenza A sono marcate con il fluoroforo FAM™, le sonde specifiche per l'RNA di influenza B sono marcate con il fluoroforo Cy®5 e le sonde specifiche per l'RNA di influenza A (H1N1)pdm09 sono marcate con il fluoroforo ROX™. 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 dell'RNA specifico di influenza A influenza B e influenza A (H1N1)pdm09, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende tre processi in un'unica provetta:

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

Il RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

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

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, trascrittasi inversa, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire la trascrizione inversa, l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento dell'RNA specifico di influenza A, influenza B, influenza A (H1N1)pdm09 e del controllo interno in una singola reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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)

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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0.

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 indicati per l'estrazione dell'acido nucleico:

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

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

9.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di rampa	Predefinito
Riferimento passivo	Nessuno

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
influenza A specifico RNA	influenza A	FAM™	(Nessuno)
influenza B specifico RNA	influenza B	Cy®5	(Nessuno)
influenza A (H1N1)pdm09 specifico RNA	influenza A (H1N1)pdm09	ROX™	(Nessuno)
Controllo interno (IC)	IC	JOE™	(Nessuno)

9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

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

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

10. Analisi dei dati

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

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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 (qualitativo)

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

Controllo	Canale			
	FAM™	Cy®5	ROX™	JOE™
Controllo positivo [influenza A, influenza B e influenza A (H1N1)pdm09]	+	+	+	+/-*
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 invalido (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo 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	ROX™	JOE™	
+	+	+	+	Rilevato RNA specifico di influenza A, influenza B e influenza A (H1N1)pdm09.
+	-	-	+	Rilevato RNA specifico di influenza A.
-	+	-	+	Rilevato RNA specifico di influenza B.
-	-	+	+	Rilevato RNA specifico di influenza A (H1N1) pdm09. ¹
+	-	+	+	Rilevato RNA specifico di influenza A (H1N1) pdm09. ^{1,2}
-	-	-	+	Nessun RNA specifico di influenza A, influenza B né influenza A (H1N1)pdm09 rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico per influenza A, influenza A H1N1 _{nv} e influenza B.
-	-	-	-	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 di JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento di FAM™, Cy®5 o nel canale di rilevamento di ROX™. Un elevato carico dell'RNA di target nel campione può portare segnali del controllo interno ridotti o assenti.

¹ A causa della differente sensibilità dei sistemi di rilevamento per il target di influenza A (FAM™) e influenza A (H1N1)pdm09 (ROX™), in rari casi campioni debolmente positivi possono mostrare un segnale nel canale ROX™, ma non nel canale FAM™.

² I ceppi di (H1N1)pdm09 appartengono al gruppo del virus dell'influenza A. Pertanto i campioni positivi per (H1N1)pdm09 generano un segnale positivo nei canali FAM™ e ROX™.

11. Dati di performance

La valutazione delle performance di RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è stata effettuata usando RNA quantificato di virus dell'influenza A (H1N1)pdm09 (ceppo A/NY/02/2009), RNA di virus dell'influenza A H3N2 (ceppo Wisconsin/67/05) e RNA di virus dell'influenza B (ceppo Florida/04/06).

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole dell'RNA specifico di influenza A, influenza B o influenza A (H1N1)pdm09 che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali dell'RNA specifico di influenza A, influenza B o influenza A (H1N1)pdm09.

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

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	23	96
1,000	24	18	75
0,316	24	12	50
0,100	24	2	8
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

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

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	88
0,100	24	13	54
0,032	24	1	4
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

Tab. 3: Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico di influenza A (H1N1)pdm09

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
31,622	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	19	79
0,100	24	8	33
0,032	24	2	8
0,010	24	2	8
0,003	24	0	0

La sensibilità analitica del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è stata determinata dall'analisi Probit:

- Per il rilevamento dell'RNA specifico di influenza A, la sensibilità analitica è di 2,88 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 1,70-6,55 copie/μl]
- Per il rilevamento dell'RNA specifico di influenza B, la sensibilità analitica è di 0,39 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,26-0,81 copie/μl]
- Per il rilevamento dell'RNA specifico del virus influenza A (H1N1)pdm09, la sensibilità analitica è di 0,87 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,51-1,97 copie/μl]

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è assicurata dall'accurata selezione degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili per garantire che tutti i genotipi influenza A, influenza B e influenza A (H1N1)pdm09 pertinenti fossero rilevati.

La specificità analitica di RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è stata valutata analizzando un pannello dell'RNA/di DNA genomico estratto da patogeni che possono essere presenti nella stessa matrice del campione o che causano sintomi simili a quelli dei virus dell'influenza.

Il RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Enterovirus (Coxsackie)
- Adenovirus umano
- Metapneumovirus umano
- Virus parainfluenzale umano
- Virus respiratorio sinciziale umano A
- Rhinovirus
- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Streptococcus pneumoniae*

11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è stata determinata come variabilità intra-dosaggio (variabilità all'interno di un esperimento), variabilità inter-dosaggio (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra lotti di produzione diversi). La variabilità totale è stata calcolata combinando le tre analisi.

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

Tab. 4: Dati di precisione per il rilevamento dell'RNA specifico di influenza A, influenza B e influenza A (H1N1)pdm09

influenza A, influenza B e influenza A (H1N1)pdm09		Ciclo soglia medio (C _t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	influenza A	30,44	0,18	0,60
	influenza B	33,59	0,19	0,57
	influenza A (H1N1) pdm09	32,30	0,07	0,22
Variabilità inter-dosaggio	influenza A	30,45	0,13	0,42
	influenza B	33,82	0,28	0,83
	influenza A (H1N1) pdm09	32,14	0,10	0,31
Variabilità inter-lotto	influenza A	30,31	0,17	0,57
	influenza B	34,61	0,60	1,74
	influenza A (H1N1) pdm09	32,09	0,08	0,24
Variabilità totale	influenza A	30,35	0,18	0,59
	influenza B	34,27	0,70	2,04
	influenza A (H1N1) pdm09	32,13	0,09	0,28

Tab. 5: Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C _t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	29,15	0,06	0,19
Variabilità inter-dosaggio	29,09	0,08	0,28
Variabilità inter-lotto	29,09	0,08	0,28
Variabilità totale	29,11	0,08	0,27

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 influenza A, influenza B e/o influenza A (H1N1)pdm09 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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- Alcuni ceppi rari del virus dell'influenza B (per es. ceppo Lee o riassortanti dello stesso) presentano una mutazione specifica e, per questo motivo, vengono rilevati con una sensibilità leggermente inferiore rispetto ai ceppi del virus dell'influenza B privi di tale mutazione.
- Il ceppo influenzale A/Parana/720/2015 (H1N2v) verrà tipizzato come influenza A H1N1_{nv}, poiché contiene la stessa sequenza target di gene matrice.

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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

14. Assistenza tecnica

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

e-mail: support@altona-diagnostics.com

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

15. Letteratura

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

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

16. Marchi e brevetti

RealStar® (Altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™ (Bio-Rad); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); 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® Influenza Screen & Type RT-PCR Kit 4.0 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:

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

