

## Istruzioni per l'uso

# RealStar<sup>®</sup> HEV RT-PCR Kit 2.0

07/2017 IT



# RealStar<sup>®</sup>

## HEV 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)  
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)  
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)  
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)  
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



272013



96



07 2017



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

## Contenuto

<b>1.</b>	<b>Usò previsto .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Componenti del kit.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Conservazione.....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Materiale e dispositivi richiesti e non forniti .....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Informazioni generali .....</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Descrizione del prodotto .....</b>	<b>9</b>
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale .....	12
<b>7.</b>	<b>Avvertenze e precauzioni .....</b>	<b>12</b>
<b>8.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>14</b>
8.1	Preparazione del campione .....	14
8.2	Preparazione della Master Mix.....	15
8.3	Preparazione della reazione .....	17
<b>9.</b>	<b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b>	<b>18</b>
9.1	Impostazioni .....	18
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti) .....	18
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....	19
<b>10.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>19</b>
10.1	Validità dei test diagnostici .....	20
10.1.1	Test diagnostico valido (qualitativo) .....	20
10.1.2	Test diagnostico invalido (qualitativo).....	20
10.1.3	Test diagnostico valido (quantitativo) .....	21
10.1.4	Test diagnostico invalido (quantitativo) .....	21
10.2	Interpretazione dei risultati .....	22
10.2.1	Analisi qualitativa .....	22

10.2.2	Analisi quantitativa .....	22
<b>11.</b>	<b>Dati di performance .....</b>	<b>23</b>
11.1	Sensibilità analitica.....	24
11.2	Specificità analitica.....	24
11.3	Range lineare.....	25
11.4	Precisione .....	27
<b>12.</b>	<b>Limitazioni .....</b>	<b>28</b>
<b>13.</b>	<b>Controllo di qualità .....</b>	<b>29</b>
<b>14.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>29</b>
<b>15.</b>	<b>Letteratura .....</b>	<b>29</b>
<b>16.</b>	<b>Marchi e brevetti.....</b>	<b>30</b>
<b>17.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>31</b>

## 1. Uso previsto

Il RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la quantificazione dell'RNA specifico di virus dell'epatite E (HEV).

## 2. Componenti del kit

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiale]
Blu	Master A	8	60
Viola	Master B	8	240
Verde	Internal Control	1	1000
Rosso	QS1-4*	4	550
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

\* Il RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 contiene Standard di quantificazione (QS) a quattro diverse concentrazioni (vedere il capitolo 6. Descrizione del prodotto)

Internal Control (IC) = Controllo interno

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

### 3. Conservazione

- Il RealStar® HEV 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

Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus a filamento singolo con genoma a RNA avente circa 7.5 kb di lunghezza. È l'unico appartenente al genere *Hepevirus* della famiglia degli *Hepeviridae*. Consiste in un capside di forma icosaedrica privo di pericapside con un diametro di ca. 33 nm.

Le infezioni da HEV costituiscono un notevole problema di sanità pubblica. Si ritiene che nel mondo 2,3 miliardi di persone ne siano infette. L'HEV è responsabile del 50% ca. delle epatiti acute virali che si manifestano nelle nazioni in via di sviluppo di Asia, Africa e America Latina. Le infezioni acute interessano principalmente gli adulti, dai 15 ai 40 anni di età, e sono in genere lievi. Il tasso di mortalità è invece particolarmente elevato (10% - 40%) tra le donne gravide. Infezioni croniche da HEV sono state riscontrate in individui immunosoppressi. Studi condotti in regioni endemiche indicano tassi elevati di sieroprevalenza dal 15% al 60%.

L'HEV è stato classificato in quattro genotipi suddivisi in diversi sottotipi. Mentre i genotipi 1 e 2 dell'HEV sono iperendemicici in Asia e in Africa, dove provocano focolai e casi sporadici di epatite acuta, il genotipo 3 dell'HEV è prevalente nei paesi industrializzati, dove sono stati identificati casi sporadici di epatite acuta provocata dal virus.

### 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® HEV RT-PCR Kit 2.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la quantificazione dell'RNA specifico di virus dell'epatite E (HEV).

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 HEV sono marcate con il fluoroforo FAM™. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde marcate con coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo dell'RNA specifico di HEV, 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® HEV RT-PCR Kit 2.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4\*
- Water (PCR grade)

\* Standard di quantificazione (QS) in quattro concentrazioni diverse

Internal Control = Controllo interno

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 HEV e del controllo interno in una singola reazione.

Gli Standard di quantificazione contengono concentrazioni standardizzate dell'RNA specifico di HEV. Questi Standard di quantificazione sono stati calibrati rispetto al 1° Standard Internazionale dell'OMS per le analisi basate sulla tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) per l'RNA del virus dell'epatite E (codice PEI: 6329/10). Gli Standard di quantificazione possono essere utilizzati singolarmente come controlli positivi o insieme per generare una **curva standard**, che può essere utilizzata per determinare la concentrazione di RNA specifico dell'HEV in un campione.

Gli standard di quantificazione hanno le seguenti concentrazioni:

Standard di quantificazione	Concentrazione [UI/μl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

## 6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® HEV 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)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- 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® HEV 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 indicati per l'estrazione dell'acido nucleico:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (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® HEV 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® HEV 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	20 µl	240 µl
Controllo interno	2.5 µl	30 µl
<b>Volume Master Mix</b>	<b>27.5 µl</b>	<b>330 µl</b>

- ▶ 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	20 µl	240 µl
<b>Volume Master Mix</b>	<b>25 µl</b>	<b>300 µl</b>

### 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 25 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 25 µl di campione (eluato dall'estrazione dell'acido nucleico) o 25 µl del controllo (Standard di quantificazione, controllo positivo o negativo).

Preparazione della reazione	
Master Mix	25 µl
Campione o controllo	25 µl
<b>Volume totale</b>	<b>50 µl</b>

- ▶ Assicurarsi che almeno un controllo positivo (QS) e almeno un controllo negativo siano utilizzati ad ogni esecuzione del saggio.
- ▶ Ai fini della quantificazione, tutti gli standard di quantificazione (da QS1 a QS4) dovrebbero essere utilizzati.
- ▶ 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® HEV 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	50 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 HEV	HEV	FAM™	(Nessuno)
Controllo interno (IC)	IC	JOE™	(Nessuno)

### 9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

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

	Fase	Ripetizioni 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® HEV 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 (qualitativo)

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

Controllo	Canale	
	FAM™	JOE™
Controllo positivo (QS)	+	+/-*
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.

### 10.1.3 Test diagnostico valido (quantitativo)

Un test diagnostico **quantitativo** è **valido** se sono soddisfatte tutte le condizioni di controllo per l'esecuzione di un test diagnostico **qualitativo valido** [vedere il capitolo 10.1.1 Test diagnostico valido (qualitativo)]. I risultati della **quantificazione** sono **validi** se la **curva standard** generata raggiunge il seguente valore del parametro di controllo:

Parametro	Valore valido
R square ( $R^2$ )	$\geq 0,98$

#### NOTA



*Non tutti gli strumenti PCR in tempo reale visualizzano il valore di ( $R^2$ ). Per informazioni dettagliate, consultare il manuale dell'utente del rispettivo strumento.*

### 10.1.4 Test diagnostico invalido (quantitativo)

Un test diagnostico **quantitativo non è valido**, (i) se il test non è stato completato o (ii) se non sono soddisfatte le condizioni di controllo per un test diagnostico **quantitativo valido**.

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™	JOE™	
+	+	Rilevato RNA specifico di HEV.
-	+	Nessun RNA specifico di HEV rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di HEV.
-	-	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™. Un elevato carico dell'RNA di HEV nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

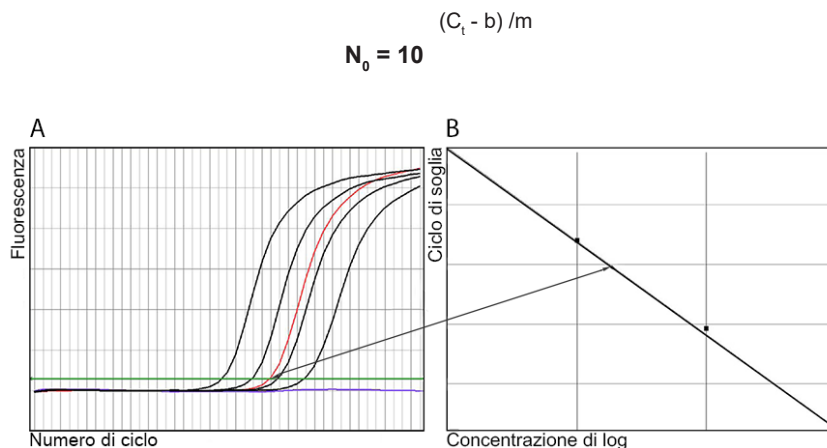
### 10.2.2 Analisi quantitativa

Il RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 include quattro standard di quantificazione (QS). Per generare una **curva standard** per l'analisi quantitativa, questi devono essere definiti come **standard** con concentrazioni appropriate (vedere il capitolo 6. Descrizione del prodotto). Utilizzando **standard** di concentrazioni note è possibile generare una curva standard per l'analisi quantitativa.

$$C_t = m \cdot \log(N_0) + b$$

$C_t$  = Ciclo soglia  
 $m$  = Pendenza  
 $N_0$  = Concentrazione iniziale  
 $b$  = Intercetta

È possibile quindi determinare la concentrazione non nota di campioni positivi a seconda della curva standard.



**Figura 1:** Standard di quantificazione (nero), un campione positivo (rosso) e un negativo (blu) visualizzati in diagramma di amplificazione [A] e analisi della curva standard [B]

Per determinare la **carica virale del campione originale**, è necessario applicare la seguente formula:

$$\text{Carica virale (campione) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (Eluato) [\mu l]} \cdot \text{Carica virale (Eluato) [UI/\mu l]}}{\text{Volume iniziale campione [ml]}}$$

#### NOTA



**La concentrazione del "Campione" è visualizzata in UI/μl e si riferisce alla concentrazione nell'eluato.**

## 11. Dati di performance

La valutazione della performance analitica del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 è stata effettuata utilizzando il "1° Standard internazionale dell'OMS per le analisi basate sulla tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) per l'RNA dell'HEV, codice PEI: 6329/10".

## 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (limite di rilevabilità: LoD) del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 è definita come la concentrazione (UI/μl dell'eluato) di molecole dell'RNA specifico di HEV che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali del "1° Standard internazionale dell'OMS per le analisi basate sulle tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) per l'RNA dell'virus dell'epatite E (HEV)".

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

Conc. in ingresso [UI/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	24	100
0,100	24	22	92
0,0316	24	9	38
0,010	24	4	17
0,003	24	2	8

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

- Per il rilevamento dell'RNA specifico di HEV, la sensibilità analitica è di 0,20 UI/μl [intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,12 - 0,45 UI/μl]



## 11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® HEV 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 tutti i genotipi HEV pertinenti fossero rilevati.

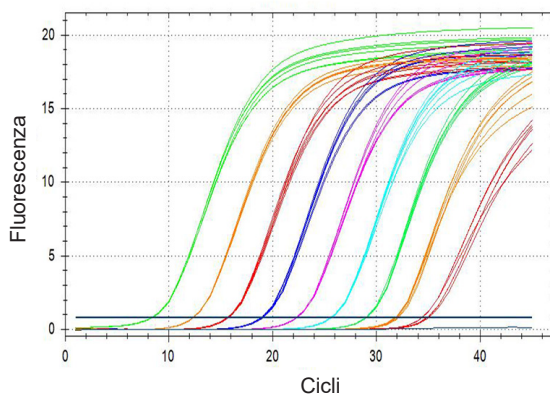
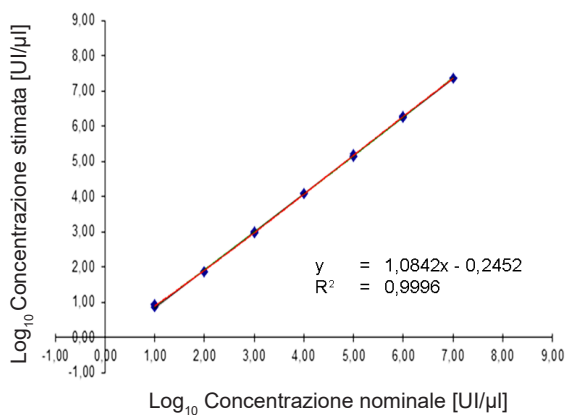
La specificità analitica del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 è stata valutata analizzando un pannello dell'RNA/DNA genomico estratto da virus correlati a HEV e da altri patogeni che causano sintomi simili a quelli del virus HEV.

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

- Virus Epstein-Barr
- Virus epatite A
- Virus epatite B
- Virus epatite C
- Parvovirus umano B19
- Citomegalovirus
- Virus herpes simplex 1
- Virus herpes simplex 2
- Virus varicella-zoster
- Virus dell'immunodeficienza umana 1

## 11.3 Range lineare

Il range lineare del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 è stato valutato analizzando una serie di diluizioni logaritmiche dell'RNA specifico di HEV utilizzando concentrazioni che vanno da 1E+08 a 1E+00 UI/μl. Sono stati analizzati almeno sei replicati per diluizione.

**A****B**

**Figura 2:** Curve di amplificazione [A] e regressione lineare [B] di una serie di diluizioni dell'RNA specifico di HEV analizzata

Il range lineare del RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 è stato determinato tra  $1\text{E}+01$  e  $1\text{E}+07$  UI/ $\mu\text{l}$ .

## 11.4 Precisione

La precisione del RealStar® HEV 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 deviazione standard e coefficiente di variazione. I dati si basano sull'analisi di quantificazione di concentrazioni definite della RT-PCR specifica per HEV e sul valore del ciclo di soglia ( $C_t$ ) in termini di Controllo interno. Almeno sei replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

**Tab. 2:** Dati di precisione per il rilevamento dell'RNA specifico di HEV

HEV	Conc. media [UI/ $\mu$ l]	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	5,18	0,43	8,28
Variabilità inter-dosaggio	6,06	0,35	5,70
Variabilità inter-lotto	5,62	0,56	10,02
Variabilità totale	5,77	0,56	9,68

**Tab. 3:** Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio ( $C_t$ )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	30,55	0,05	0,16
Variabilità inter-dosaggio	30,38	0,07	0,23
Variabilità inter-lotto	30,47	0,11	0,37
Variabilità totale	30,44	0,10	0,33

## 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 insufficienti, risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma HEV coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una sottoquantificazione e/o il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del RealStar® HEV 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® HEV 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); 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® HEV 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.

© 2017 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

## 17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Lotto
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Indice
	Numero
	Componente
	Global Trade Identification Number
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione
	Note
	Versione

**Note:**



**Note:**

**Note:**



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

