

## Istruzioni per l'uso

**RealStar<sup>®</sup>**

**Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0**

03/2019 IT



# RealStar®

## Lassa Virus 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)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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)



642013



2 x 48



03 2019



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>12</b>
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale .....	14
<b>7.</b>	<b>Avvertenze e precauzioni .....</b>	<b>15</b>
<b>8.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>17</b>
8.1	Preparazione del campione .....	17
8.2	Preparazione della Master Mix.....	18
8.3	Preparazione della reazione .....	20
<b>9.</b>	<b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b>	<b>21</b>
9.1	Impostazioni .....	21
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti) .....	21
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....	22
<b>10.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>22</b>
10.1	Validità dei test diagnostici .....	23
10.1.1	Test diagnostico valido (qualitativo) .....	23
10.1.2	Test diagnostico invalido (qualitativo).....	23
10.2	Interpretazione dei risultati .....	23
10.2.1	Analisi qualitativa .....	24
<b>11.</b>	<b>Dati di performance .....</b>	<b>25</b>

11.1	Sensibilità analitica.....	25
11.2	Specificità analitica.....	26
11.3	Precisione .....	28
<b>12.</b>	<b>Limitazioni .....</b>	<b>30</b>
<b>13.</b>	<b>Controllo di qualità .....</b>	<b>31</b>
<b>14.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>31</b>
<b>15.</b>	<b>Letteratura .....</b>	<b>31</b>
<b>16.</b>	<b>Marchi e brevetti.....</b>	<b>32</b>
<b>17.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>33</b>

## 1. Uso previsto

Il RealStar® Lassa Virus 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 Lassa (LASV) in plasma umano EDTA come aiuto nella diagnosi nei soggetti con segni e sintomi di infezione da virus Lassa in associazione a fattori di rischio epidemiologici.

Il RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è destinato a essere utilizzato da personale qualificato in laboratori adeguatamente equipaggiati seguendo le linee guida sulla biosicurezza dei laboratori.

## 2. Componenti del kit

Il RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 contiene 2 diversi dosaggi RT-PCR con 48 reazioni ciascuno. Il sistema contiene due diversi controlli positivi: uno per il sistema di amplificazione e rilevamento specifici per il gene GPC e uno per amplificazione e rilevamento specifici per il gene L.

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiale]
Blu	Master A GPC Gene	4	60
Viola	Master B GPC Gene	4	180
Blu chiaro	Master A L Gene	4	60
Viola chiaro	Master B L Gene	4	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rosso	Positive Control GPC Gene	1	250
Arancione	Positive Control L Gene	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® Lassa Virus 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 Lassa (LASV), un membro della famiglia dei *Arenaviridae*, è un virus a RNA monofilamento con pericapside. Il LASV è endemico in Africa occidentale, principalmente in Benin, Sierra Leone, Guinea, Liberia e Nigeria (1). L'ospite naturale del LASV è il *Mastomys natalensis*, un piccolo roditore endemico dell'Africa subsahariana. Questi roditori vivono in stretta prossimità con l'uomo, entrando con frequenza nelle case alla ricerca di cibo. Il virus può essere trasmesso attraverso il contatto diretto o il cibo contaminato (2). La trasmissione da uomo a uomo è possibile sia entro la comunità, sia in ambito sanitario, tramite gli aerosol, il contatto con fluidi corporei contaminati o il riutilizzo di dispositivi medici contaminati (3).

L'80% circa di tutte le infezioni da LASV resta clinicamente impercettibile; l'1% delle infezioni porta al decesso (3). Il LASV può causare la febbre emorragica di Lassa (LHF) che ha un elevato tasso di letalità che arriva al 15-20% tra i pazienti ricoverati (4). I tassi di letalità per le donne in gravidanza sono ancora più elevati, in particolare nel terzo trimestre di gravidanza (5). La LHF è associata a focolai epidemici nosocomiali.

Non è ancora disponibile un vaccino contro il LASV. Per il trattamento della LHF si somministra il farmaco antivirale Ribavirina per via parenterale. L'efficacia del trattamento è elevata, se viene avviata entro sei giorni dalla comparsa dei sintomi, ma si riduce rapidamente con il ritardo della somministrazione (6). Le terapie di supporto includono ossigenazione, trattamento delle infezioni secondarie, appropriato equilibrio idrosalinico e se indicato trasfusioni.

Il LASV può essere rilevato precocemente dopo l'infezione (7) e durante il decorso della malattia, mentre i test sierologici non rilevano il virus prima della comparsa dei sintomi (8). Il rilevamento dell'RNA virale con RT-PCR convenzionale seguita da rilevamento su gel è attualmente il gold-standard per la diagnosi di LHF. La coltura cellulare richiede un contenimento BSL-4 e pertanto deve essere effettuata unicamente in laboratori estremamente specializzati (8). Sono disponibili diversi test ELISA (saggio di immunoassorbimento enzimatico), sebbene i metodi sierologici non siano utili per l'identificazione dei casi acuti di LHF. Inoltre, i pazienti con LHF grave non sempre sviluppano anticorpi (8, 9). Gli strumenti di diagnosi molecolare

che sfruttano la tecnica della RT-PCR in tempo reale sono particolarmente adatti alla diagnosi molecolare delle infezioni virali perché sono rapidi, sensibili e possono essere effettuati su campioni inattivati (10, 11), ma non è ancora disponibile in commercio un test commercial RT-PCR in tempo reale per il rilevamento della LASV. La considerevole diversità di sequenze tra ceppi di LASV rappresenta un problema per lo sviluppo di strumenti di diagnosi molecolare. La probabilità di risultati falsi negativi può essere ridotta utilizzando più sequenze genomiche come regioni target, per es. il gene L e il gene GPC.

- [1] O. Ogbu, E. Ajuluchukwu & C.J. Uneke (2007), Lassa fever in West African sub-region: an overview, *J Vect Borne Dis*, 44(1):1-11.
- [2] Lecompte E, Fichet-Calvet E, Daffis S, Koulémou K, Sylla O, Kourouma F, Doré A, Soropogui B, Aniskin V, Allali B, Kouassi Kan S, Lalis A, Koivogui L, Günther S, Denys C, Jan ter Meulen J. (2006), *Mastomys natalensis* and Lassa fever, West Africa, *Emerg Infect Dis*, 12(12):1971-4.
- [3] Edward H. Stephenson Dr., Edgar W. Larson, Joseph W. Dominik (1984), Effect of environmental factors on aerosol-induced infection, *J Med Virol*, 14(4):295-303.
- [4] McCormick, J. B., P. A. Webb, J. W. Krebs, K. M. Johnson e E. S. Smith (1987), A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* 155:437-444.
- [5] Price ME, Fisher-Hoch SP, Craven RB, McCormick JB (1988), A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ* 297:584 –587.
- [6] McCormick JB, Walker DH, King IJ, Webb PA, Elliott LH, Whitfield SG, Johnson KM (1986), Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans. *Am J Trop Med Hyg* 35:401–407.
- [7] Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994), Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR, *J Clin Microbiol*, 32(12):2898-903.
- [8] Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, Coulibaly M, Kanu J, Conteh AS, Wagoner KD, McMullan LK, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG (2000), Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation, *J Clin Microbiol*, 38(7):2670-7.

- [9] Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB. (1985), Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. Lancet i:250 –252.
- [10] Nikisins S, Rieger T, Patel P, Muller R, Gunther S, Niedrig M. (2015), International external quality assessment study for molecular detection of Lassa virus. PLoS Negl Trop Dis 9:e0003793.
- [11] Zheng Pang, Aqian Li, Jiandong Li, Jing Qu, Chengcheng He, Shuo Zhang, Chuan Li, Quanfu Zhang, Mifang Liang, and Dexin Li (2014), Comprehensive Multiplex One-Step Real-Time TaqMan qRT-PCR Assays for Detection and Quantification of Hemorrhagic Fever Viruses, PLoS One, 9(4): e95635.

#### 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® Lassa Virus 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 Lassa (LASV) in plasma umano EDTA come aiuto nella diagnosi nei soggetti con segni e sintomi di infezione da virus Lassa in associazione a fattori di rischio epidemiologici.

Il RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è destinato a essere utilizzato da personale qualificato in laboratori adeguatamente equipaggiati seguendo le linee guida sulla biosicurezza dei laboratori.

Il RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è costituito da due test, uno che mira al gene GPC LASV e un altro che mira al gene L LASV. Entrambi i test includono un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione della PCR e confermare l'integrità dei reagenti.

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.

Master Mix gene GPC: Le sonde specifiche per il gene GPC LASV sono marcate con il fluoroforo FAM™. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

Master Mix gene L: Le sonde specifiche per il gene L LASV sono marcate con il fluoroforo FAM™. 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 Gene GPC Lassa (per il gene GPC o per il gene L), nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test per entrambi i dosaggi comprende tre processi in un'unica provetta:

- Trascrizione 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® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è composto da:

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

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

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

Ogni 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 del target e del controllo interno in una singola reazione.

Il set di geni GPC Master A e Master B contiene tutti i componenti per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento dell'RNA specifico del gene GPC del virus Lassa virus e il controllo interno in una singola reazione.

Il set di geni L Master A e Master B contiene tutti i componenti per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento dell'RNA specifico del gene L del virus Lassa virus e il controllo interno in una singola reazione.

## 6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® Lassa Virus 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)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- 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)

## 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*.
- Campioni clinici e campioni devono essere sempre trattati come infettivi e/o pericolosi secondo le procedure di laboratorio sicure. Fare riferimento alle linee guida dei CDC "Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals" (Le linee guida dei CDC, Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals, May 2005. [https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05\\_19\\_05.pdf](https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf)).
- 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. Fare riferimento anche alle linee guida dei CDC, Interim Guidance for Managing Patients with Suspected Viral Haemorrhagic Fever in U.S. Hospitals, May 2005. [https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05\\_19\\_05.pdf](https://www.cdc.gov/hai/pdfs/bbp/vhfinterimguidance05_19_05.pdf).



## 8. Procedura

### 8.1 Preparazione del campione

Il tipo di campione che segue è validato per l'uso con il kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0:

- Plasma umano EDTA.

Per una linea guida relativa all'elaborazione dei campioni, fare riferimento alle "Linee guida nazionali sulla prevenzione e il controllo delle febbri emorragiche virali" (National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers, Nigeria Centre for Disease Control (NCDC), aprile 2017. [https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18\\_1501495944.pdf](https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf)).

L'RNA estratto è il materiale di partenza per il RealStar® Lassa Virus 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)
- 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® Lassa Virus 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® Lassa Virus 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 (Master Mix gene GPC e Master Mix gene L) 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
<b>Volume Master Mix</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 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 (Master Mix gene GPC e Master Mix gene L) secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Volume Master Mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 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 20 µl di Master Mix gene GPC o Master Mix gene L 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
<b>Volume totale</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Assicurarsi che almeno un controllo positivo (controllo positivo gene GPC per il Master Mix gene GPC e controllo positivo gene L per il Master Mix gene L) e almeno un controllo negativo siano utilizzati per ogni Master Mix e esecuzione del saggio.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con il Master Mix gene GPC e il Master Mix gene L 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 1000 x g (~ 3000 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® Lassa Virus 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	Nessuno

### 9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Master Mix	Nome sonda	Reporter	Quencher
RNA specifico di gene GPC LASV	Gene GPC	LASV	FAM™	(Nessuno)
RNA specifico di gene L LASV	Gene L	LASV	FAM™	(Nessuno)
Controllo interno	Gene GPC e Gene L	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® Lassa Virus 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 (gene GPC)	+	+/-*
Controllo positivo (gene L)	+	+/-*
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		Canale		Interpretazione dei risultati
Test specifico gene GPC		Test specifico gene L		
FAM™	JOE™	FAM™	JOE™	
+	+*	+**	+*	Rilevato RNA specifico di LASV.
+	+*	-	+/-***	Rilevato RNA specifico di LASV.
-	+/-***	+**	+*	Rilevato RNA specifico di LASV.
-	+	-	+	Nessun RNA specifico di LASV rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di LASV.
-	+	-	-	Inibizione della RT-PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.
-	-	-	+	Inibizione della RT-PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.
-	-	-	-	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 del canale di rilevamento FAM™. Un elevato carico dell'RNA di LASV nel campione può portare a un segnale del controllo interno ridotto o assente.

\*\* I campioni fortemente positivi per l'LCMV (virus della coriomeningite linfocitaria) possono risultare falsamente positivi per l'RNA specifico del gene L di LASV.

\*\*\* Se si rileva un segnale nel canale di rilevamento FAM™ per uno dei due test (test per gene GPC o gene L) il campione può essere considerato positivo per l'RNA del LASV. Se il test non presenta un segnale nel canale di rilevamento FAM™ è irrilevante che presenti o meno un segnale nel canale JOE™ (IC).



## 11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni del RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è stata effettuata usando trascritti *in vitro* specifici rispettivamente per il gene L e il gene GPC.

### 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole dell'RNA specifico di LASV che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata con l'analisi delle serie di diluizioni dei trascritti *in vitro* specifici del gene L e del gene GPC del virus Lassa.

**Tab. 1:** Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico del *gene L LASV*

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	23	23	100
1,000	24	22	91,67
0,316	24	9	37,5
0,032	48	4	8,33
0,010	48	3	6,25
0,003	48	1	2,08

**Tab. 2:** Risultati della RT-PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento dell'RNA specifico del *gene GPC LASV*

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
31,620	24	24	100
10,000	24	24	100
3,162	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	13	54,17
0,100	24	5	20,83
0,032	24	1	4,17
0,010	24	0	0
0,003	24	0	0

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

- Per il rilevamento dell'RNA specifico del gene L LASV, la sensibilità analitica è di 3,14 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 1,67 - 7,60 copie/μl]
- Per il rilevamento dell'RNA specifico del gene GPC LASV, la sensibilità analitica è di 1,00 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (IC): 0,64 - 2,12 copie/μl]

## 11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® Lassa Virus 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 LASV pertinenti fossero rilevati.

La specificità analitica di RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è stata valutata analizzando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da patogeni correlati al virus Lassa, patogeni che possono essere presenti nella stessa matrice del campione o patogeni che causano sintomi simili a quelli dell'infezione da virus Lassa.

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

- Virus della febbre emorragica  
Crimea-Congo
- Virus Chikungunya
- Virus Dengue 1
- Virus Dengue 2
- Virus Dengue 3
- Virus Dengue 4
- Virus Ebola
- Virus dell'epatite A
- Virus dell'epatite B
- Virus dell'epatite C
- Virus dell'immunodeficienza  
umana 1
- Virus Marburg
- Virus della febbre della Rift Valley
- West Nile virus
- Virus della febbre gialla
- Virus Zika
- *Plasmodium falciparum*

La specificità analitica relativa alla reattività del kit RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è stata valutata con un pannello dell'RNA genomico estratto da diversi sottogeneri del virus Lassa (ceppi).

Il kit RealStar® Lassa virus RT-PCR Kit 2.0 è in grado di rilevare l'RNA dei seguenti sottogeneri analizzati per diversi ceppi:

- Sottogenere II (Nig08-04; Nig08-A37)
- Sottogenere III (Nig08-A18; Nig-CSF; Nig-SL-NL)
- Sottogenere IV (Lib05-4094; BA366; Josiah)
- Sottogenere V (AV)

### 11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Lassa Virus RT-PCR Kit 2.0 è stata determinata per il test specifico del gene GPC e per il test specifico del gene L 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 dei valori del ciclo soglia ( $C_t$ ). Almeno sei replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

**Tab. 3:** Dati di precisione per il rilevamento dell'RNA specifico di gene L LASV

Gene L LASV	Ciclo soglia medio ( $C_t$ )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	31,51	0,16	0,51
Variabilità inter-dosaggio	30,98	0,16	0,53
Variabilità inter-lotto	31,32	0,24	0,76
Variabilità totale	31,16	0,30	0,97

**Tab. 4:** Dati di precisione per il rilevamento dell'RNA specifico di gene GPC LASV

Gene GPC LASV	Ciclo soglia medio ( $C_t$ )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	31,65	0,22	0,70
Variabilità inter-dosaggio	32,14	0,18	0,57
Variabilità inter-lotto	31,96	0,37	1,16
Variabilità totale	31,98	0,31	0,96

**Tab. 5:** Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno usando il Master Mix per il gene L

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C <sub>t</sub> )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	32,46	0,16	0,50
Variabilità inter-dosaggio	32,24	0,27	0,83
Variabilità inter-lotto	32,51	0,13	0,41
Variabilità totale	32,34	0,27	0,83

**Tab. 6:** Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno usando il Master Mix per il gene GPC

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C <sub>t</sub> )	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	30,72	0,22	0,71
Variabilità inter-dosaggio	30,67	0,17	0,55
Variabilità inter-lotto	30,65	0,17	0,54
Variabilità totale	30,68	0,18	0,59

## 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. Fare riferimento alla "Interim Guidance by the WHO" (Interim Guidance, World Health Organization, 2014, <https://www.who.int/emergencies/diseases/lassa-fever/collection-of-blood-samples-for-lassa.pdf?ua=1>) e alle "National Guidelines on Prevention and Control of Viral Haemorrhagic Fevers" (Nigeria Centre for Disease Control (NCDC), Aprile 2017. [https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18\\_1501495944.pdf](https://ncdc.gov.ng/themes/common/docs/protocols/18_1501495944.pdf)).
- 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 LASV 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® Lassa Virus 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® Lassa Virus 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](mailto: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® Lassa Virus 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:**



**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)

