

Istruzioni per l'uso

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

09/2021 IT

RealStar[®]

Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0

Per uso con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
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)



671013



96



09 2021



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

Contenuto

1.	Usò previsto	6
2.	Componenti del kit.....	6
3.	Conservazione.....	6
4.	Materiale e dispositivi richiesti e non forniti	7
5.	Informazioni generali	8
6.	Descrizione del prodotto	10
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale	11
7.	Avvertenze e precauzioni	12
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
9.4	Avvio della PCR in tempo reale	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	20
11.1	Sensibilità analitica.....	20
11.2	Specificità analitica.....	21
11.2.1	Reattività crociata.....	22
11.2.2	Inclusività	23
11.3	Precisione	23
11.4	Valutazione diagnostica	25
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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di virus della febbre gialla.

2. Componenti del kit

Tab. 1: Componenti del kit

Colore tappo	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiala]
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

* Da utilizzare come controllo negativo

Internal Control = Controllo interno

Positive Control = Controllo positivo

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

3. Conservazione

- Il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 2 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 della febbre gialla (YFV) è il prototipo del genere *Flavivirus*, che comprende circa 70 diversi virus trasmessi dagli artropodi [1]. Il genoma del YFV è un RNA monofilamento positivo da 11kb che codifica per una poliproteina, che viene elaborata in modo post- e co-traslazionale in tre proteine strutturali e in sette proteine non strutturali [2,3]. La febbre gialla è endemica nelle regioni tropicali dell'Africa e del Sud America [1].

Si distinguono tre forme di febbre gialla: 1) la febbre gialla dei centri urbani, nella quale il virus viene diffuso da una persona all'altra dalle zanzare peri-domestiche *Aedes aegypti*, 2) la febbre gialla intermedia, causata dal virus YFV, che è trasmessa dalle zanzare semi-domestiche sia alla scimmia, sia all'uomo, e 3) la febbre gialla della giungla (silvestre) in cui il virus YFV viene trasmesso da zanzare che vivono nei tronchi degli alberi a primati non umani e talvolta all'essere umano [1,2].

La maggior parte dei pazienti infetti dal virus YFV è asintomatico o presenta solo una malattia lieve. Nelle persone che sviluppano dei sintomi, l'incubazione è tipicamente di 3–6 giorni. I sintomi iniziali includono un improvviso scoppio di febbre, brividi, cefalea grave, dorsalgia, dolori diffusi in tutto il corpo, nausea e vomito, spossatezza e debolezza. Dopo una breve remissione dei sintomi che dura da qualche ora a un giorno, il 15% circa dei soggetti infetti progredisce sviluppando una forma più grave della malattia, caratterizzata da febbre alta, ittero, sanguinamento e infine shock e insufficienza multiorgano [4,5].

Non è stato ancora trovato nessun trattamento specifico in grado di offrire beneficio ai pazienti affetti da febbre gialla, se non le cure di supporto per trattare disidratazione, insufficienza respiratoria e febbre [1,4,6].

Tutti i vaccini attualmente in commercio contro il virus della febbre gialla sono vaccini a virus vivo attenuato tratti dal sottogenere 17D, che suscita una risposta immunitaria adattiva rapida, eccezionalmente forte e marcatamente duratura [4,5].

La diagnosi clinica di febbre gialla è difficile a causa della similitudine dei sintomi con un'ampia serie di malattie, tra cui febbre Dengue, altre malattie virali emorragiche, leptospirosi, epatite virale e malaria; pertanto, la conferma di laboratorio è essenziale [2].

- [1] Monath, Thomas P., e Pedro F.c. Vasconcelos. "Yellow fever." *Journal of Clinical Virology*, vol. 64, 2015, pp. 160–173., doi:10.1016/j.jcv.2014.08.030.
- [2] Domingo, C., et al. "Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, n. 12, ottobre 2012, pp. 4054–4060., doi:10.1128/jcm.01799-12.
- [3] Volk, D.e., et al. "Yellow Fever Envelope Protein Domain III NMR Structure (S288-K398)." ottobre 2008, doi:10.2210/pdb2jqm/pdb.
- [4] Monath, Thomas P e Alan D.t Barrett. "Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever." *Advances in Virus Research*, 2003, pp. 343–395., doi:10.1016/s0065-3527(03)60009-6
- [5] Deubel, Vincent, et al. "Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-Vaccinated fatal human case." *Journal of Medical Virology*, vol. 53, n. 3, 1997, pp. 212–217., doi:10.1002/(sici)1096-9071(199711)53:3<212::aid-jmv5>3.0.co;2-b.
- [6] Pan American Health Organization (PAHO)/ World Health Organization (WHO) "Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection" febbraio 2018

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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di virus della febbre gialla.

Questo kit è stato sviluppato per il rilevamento di tutti i ceppi descritti di virus della febbre gialla, compreso il ceppo vaccinale 17D.

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 YFV 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 YFV, 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:

- 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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è composto da:

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

* Da utilizzare come controllo negativo

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 YFV e del controllo interno in una singola reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 Diagnostics)
- 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*.
- I campioni devono essere sempre trattati come infettivi e/o con rischio biologico 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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

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 il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 1 minuto a circa 17.000 x g (~ 13.000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

Se possibile, evitare cicli di scongelamento-congelamento.

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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato 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
Internal Control (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 almeno un controllo positivo e almeno un controllo negativo [acqua (testata per PCR) inclusa nel kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0] siano utilizzati per ogni processo.
- ▶ 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).

Dopo il completamento della preparazione PCR, la miscela PCR nella piastra di reazione a 96 pozzetti/provetta di reazione ottica chiusa è stabile tra +20°C e +25°C per un massimo di 30 minuti.

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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

9.1 Impostazioni

- Programmare lo strumento con le seguenti impostazioni:

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
RNA specifico di YFV	YFV	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

9.4 Avvio della PCR in tempo reale

Posizionare la piastra di reazione a 96 pozzetti/le provette di reazione ottica nello strumento PCR in tempo reale e avviare il processo PCR in tempo reale in base al manuale dell'utente del rispettivo strumento.

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 il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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	+	+/-*
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™	JOE™	
+	+*	Rilevato RNA specifico di YFV.
-	+	Nessun RNA specifico di YFV rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di YFV.
-	-	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 YFV nel campione può portare a un segnale del controllo interno ridotto o assente.

11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è stata effettuata utilizzando uno specifico trascritto di virus della febbre gialla *in vitro*.

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è definita come la concentrazione (copie/μl dell'eluato) di molecole dell'RNA specifico di YFV che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle diluizioni seriali dell'RNA di YFV.

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

Conc. in ingresso [copie/μl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
31,600	24	24	100
10,000	24	24	100
3,160	24	24	100
1,000	24	24	100
0,316	24	21	87,5
0,100	24	9	37,5
0,032	24	4	16,7
0,010	24	2	8,3
0,003	24	0	0

La sensibilità analitica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è stata determinata dall'analisi probit:

- Per il rilevamento dell'RNA specifico di YFV, la sensibilità analitica è di 0,69 copie/μl [Intervallo di confidenza del 95% (CI): 0,41 - 1,56 copie/μl]

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 YFV pertinenti fossero rilevati.

11.2.1 Reattività crociata

La specificità analitica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 rispetto alla reattività crociata con patogeni diversi dal virus YFV è stata valutata analizzando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da virus correlati a YFV e ad altri patogeni che causano sintomi simili. Il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Virus Chikungunya
- Virus della febbre emorragica Crimea-Congo
- Virus Dengue, sierotipo 1
- Virus Dengue, sierotipo 4
- Virus Ebola
- Virus dell'epatite C
- Virus dell'encefalite giapponese
- Virus Lassa
- Virus Marburg
- Virus dell'encefalite della Murray Valley
- *Plasmodium falciparum*
- West Nile virus
- Virus Zika

Inoltre, la specificità analitica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è stata valutata per l'OMS dal Center for Disease Control and Prevention degli Stati Uniti, Divisione Vector-Borne Diseases (Fort Collins, Colorado, USA). Il CDC statunitense è un Centro Collaborante OMS di riferimento e ricerca sui virus trasmessi da artropodi. La valutazione è stata svolta secondo il "WHO Protocol for the Laboratory Evaluation of Yellow Fever Nucleic Acid Assays" (Protocollo OMS per la valutazione in laboratorio dei test sugli acidi nucleici del virus della febbre gialla). Il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Virus Chikungunya
- Virus Dengue, sierotipi 1-4
- Virus Ebola
- HIV
- Influenza A (H1N1)
- Virus dell'encefalite giapponese
- Virus Lassa
- Virus Marburg
- Virus del morbillo
- Virus di Powassan
- West Nile virus
- Virus Zika

11.2.2 Inclusività

L'inclusività del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 è stata valutata per l'OMS dal Center for Disease Control and Prevention degli Stati Uniti, Divisione Vector-Borne Diseases (Fort Collins, Colorado, USA). Il CDC statunitense è un Centro Collaborante OMS di riferimento e ricerca sui virus trasmessi da artropodi. La valutazione in laboratorio è stata svolta secondo il "WHO Protocol for the Laboratory Evaluation of Yellow Fever Nucleic Acid Assays" (Protocollo OMS per la valutazione in laboratorio dei test sugli acidi nucleici del virus della febbre gialla). Tutti i ceppi del virus YFV analizzati (per i dettagli vedere la Tabella 3) sono stati rilevati dal kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

Tab. 3: Ceppi testati da CDC/OMS per l'inclusività

Ceppo YFV	Posizione	Anno
Vaccino 17D-204	N/A	N/A
Asibi	Ghana	1927
14FA	Angola	1971
614819	Panama	1974
BA-55	Nigeria	1986
BC-7914	Kenya	1993
FMD-1240	Perù	2007
CAREC M2-09	Trinidad	2009
InHRR 10a-10	Venezuela	2010

11.3 Precisione

La precisione del RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 3 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 6 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 YFV (conc. 50 x LoD circa)

YFV	Ciclo soglia medio (C_t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	32,72	0,14	0,41
Variabilità inter-dosaggio	32,39	0,22	0,68
Variabilità inter-lotto	32,46	0,29	0,91
Variabilità totale	32,50	0,25	0,77

Tab. 5: Dati di precisione per il rilevamento di RNA specifico di YFV (conc. 3 x LoD circa)

YFV	Ciclo soglia medio (C_t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	36,25	0,58	1,60
Variabilità inter-dosaggio	36,19	0,33	0,91
Variabilità inter-lotto	36,16	0,42	1,16
Variabilità totale	36,21	0,41	1,14

Tab. 6: Dati di precisione per il rilevamento del controllo interno

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C_t)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-dosaggio	29,44	0,07	0,23
Variabilità inter-dosaggio	29,66	0,30	1,02
Variabilità inter-lotto	29,40	0,07	0,23
Variabilità totale	29,58	0,27	0,91

11.4 Valutazione diagnostica

Gli acidi nucleici estratti dai campioni di siero di 30 pazienti con infezione da YVF confermata sono stati analizzati in parallelo con il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 e con il test interno YFV real-time RT-PCR assay (basato su Domingo et al., 2012) dall'Istituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Brasile. Inoltre, sono stati analizzati 15 campioni di siero individuali di persone non infettate dal virus YFV.

Dei 30 campioni con positività confermata al virus YFV, tutti e 30 sono risultati positivi per RNA di YFV con il riferimento (vale a dire, il test interno YFV real-time RT-PCR assay basato su Domingo et al., 2012) e con il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0.

Dei 15 campioni negativi per YFV, tutti e 15 sono risultati negativi per RNA di YFV con il riferimento. Con l'uso del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0, 14 campioni sono risultati negativi per RNA di YFV e un campione è risultato positivo.

Tab. 7: Risultati della valutazione della sensibilità e della specificità diagnostica per YFV in campioni di siero

		YFV real-time RT-PCR assay (basato su Domingo et al., 2012)	
		+	-
RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0	+	30	1
	-	0	14

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti con il test interno YFV real-time RT-PCR assay (basato su on Domingo et al., 2012), la sensibilità e la specificità diagnostica del kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 per il rilevamento del virus YFV sono rispettivamente del 100% e del 93,3%.

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 di YFV 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 kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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 EN ISO 13485 di Altona Diagnostics GmbH, ogni lotto di kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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. 10ª edizione. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases. Terza edizione. Mosby, 2010.

16. Marchi e brevetti

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAasymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene); FAM™ (Thermo Fisher Scientific).

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

















Il kit RealStar® Yellow Fever Virus RT-PCR Kit 1.0 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.

© 2021 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Codice 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
	Nota
	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

