



CHLAMYDIA TRACHOMATIS DNA

Real-Time PCR qualitativa per la determinazione di Chlamydia Trachomatis



4BShopLab

Chlamydia trachomatis DNA

A. USO PREVISTO

Il kit di real-time PCR **Chlamydia trachomatis DNA**, codificato **CTDNA.CE**, è finalizzato alla rilevazione del DNA di Chlamydia trachomatis in campioni biologici umani (tamponi uretrali/cervicali e urine). La presenza di un controllo interno (IC) di estrazione e/o amplificazione permette di monitorare l'intero processo.

L'utilizzo del kit è compatibile con strumenti real-time ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystems™*), oppure MX3000P® (Software MxPro version 4.01, Stratagene™***).

* Applied Biosystems è un marchio registrato e ABI PRISM® è un marchio di proprietà di Applied Biosystems Corporation o delle sue consociate negli USA e/o altri paesi.

***Stratagene è un marchio registrato.

B. INTRODUZIONE

Chlamydia trachomatis (CT), un batterio intracellulare obbligato, è tra i più comuni agenti patogeni a trasmissione sessuale. L'infezione da CT può causare uretrite, cervicite e malattia infiammatoria pelvica nelle donne. Oltre il 50% delle infezioni da Chlamydia trachomatis sono asintomatiche e possono non essere diagnosticate per periodi di tempo prolungati. Le infezioni cervicali non trattate o non diagnosticate nelle donne possono risalire nell'apparato genitale superiore, provocando infiammazioni pelviche e gravidanze ectopiche. Tanto negli uomini quanto nelle donne, le infezioni da clamidia non trattate o non diagnosticate possono causare sterilità.

La Chlamydia trachomatis si tratta e si cura facilmente con antibiotici. I trattamenti utilizzati più frequentemente sono una dose singola di azitromicina o una settimana di doxiciclina (due volte al giorno).

La CT contiene un singolo cromosoma di 1,043000 bp. Il genoma codifica per circa 875 proteine, ma non tutte sono necessariamente espresse. Oltre al cromosoma, la CT normalmente possiede un elemento genetico extracromosomico (plasmide criptico) di 7493 bp. Il plasmide si conserva molto bene, con una variazione della sequenza nucleotidica inferiore all'1%.

Le tecniche di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT) hanno superato la coltura cellulare e la determinazione antigenica per la diagnosi delle infezioni da Chlamydia trachomatis per le loro scarse sensibilità.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit CTDNA.CE si basa su una chimica real-time che utilizza primer e probe specifici.

Il **DNA di Chlamydia trachomatis**, purificato dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene amplificato utilizzando il sistema di amplificazione real-time. Il prodotto amplificato viene determinato mediante probe marcato con sostanze fluorescenti (reporter dye), specifico per una sequenza genomica di Chlamydia Trachomatis ad alta ripetizione (da 1 a 10 volte).

Il controllo interno (IC) eterologo funge da controllo di estrazione e/o di amplificazione per ogni singolo campione, con l'obiettivo di identificare eventuali inibitori della reazione.

Come controlli della reazione di PCR sono forniti un controllo positivo alto (CTRL-H) e un controllo positivo basso (CTRL-L).

D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato come CTDNA.CE contiene reagenti per 50 test.

Componente	Contenuto	CTDNA.CE 50 reazioni
A CODIFICATO: ALL/MM-1 CODICE COLORE: AZZURRO	Master mix	N° 2 provette/0,4 ml
B CODIFICATO: CT/CB CODICE COLORE: GIALLO	Primer/probe liofilizzati	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
C CODIFICATO: ALL/C CODICE COLORE: ROSSO	H ₂ O MG	N° 2 provette/1,5 ml
NTC CODIFICATO: ALL/NTC CODICE COLORE: BIANCO	Controllo negativo	N° 1 provette/1,5 ml
CTRL-H Controllo positivo alto (10 ⁴ copie/ul) CODIFICATO: CT/CTRL-H CODICE COLORE: VIOLA	Controllo positivo alto liofilizzato	N°8 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
CTRL-L Controllo positivo basso (10 copie/ul) CODIFICATO: CT/CTRL-L CODICE COLORE: ROSA	Controllo positivo basso liofilizzato	N°8 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
I.C. Controllo Interno CODIFICATO: CT/IC CODICE COLORE: VERDE	Controllo interno liofilizzato	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
Foglietto illustrativo	Istruzioni per l'uso	N° 1

Nota importante: su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100, 150 test, come riportato nella tabella sottostante:

1. Componente A	n°1 provette/0,4 ml	n°4 provette/0,4 ml	n°6 provette/0,4 ml
2. Componente B	n°1 provette	n°4 provette	n°6 provette
3. Componente C	n°1 provette/1,5 ml	n°2 provette/1,5 ml	n°3 provette/1,5 ml
4. NTC	n°1 provette/1,5 ml	n°1 provette/1,5 ml	n°1 provette/1,5 ml
5. IC	n°1 provette	n°4 provette	n°6 provette
6. CTRL-H	n°4 provette	n°4 provette	n°6 provette
7. CTRL-L	n°4 provette	n°4 provette	n°6 provette
8. Foglietto illustrativo	n° 1	n° 1	n° 1
Numero di test	25	100	150
Codice	CTDNA.CE.25	CTDNA.CE.100	CTDNA.CE.150

E. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Il kit codificato CTDNA.CE deve essere conservato a +2...8 °C.

Una volta risospeso il **Componente B** (codice CT/CB) e il **Componente IC** (codice CT/IC) sono stabili 4 mesi a -20°C. Una volta risospesi i **Componenti controllo positivo alto e basso** (codici CT/CTRL-H e LCT/CTRL-L) sono stabili 2 settimane a -20°C. Se i componenti risospesi devono essere usati più volte si raccomanda di preparare aliquote, ripetuti congelamenti e scongelamenti devono essere evitati. Solo uno scongelamento è ammesso.

F. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (0,5 µl < volume <1000 µl)
2. Kit di estrazione del DNA
3. MG EtOH
4. Blocco termico
5. Microcentrifuga
6. Portaprovette
7. Puntale sterile con filtro con barriera aerosol
8. Microprovette prive di nucleasi
9. Microprovette da 0,2 ml o micropiastre per PCR raccomandate dai produttori di strumenti per PCR real-time
10. Guanti monouso non talcati
11. Termociclatore per PCR real-time (*)
12. Fazzoletti di carta assorbente
13. Vortex o miscelatori similari
14. PBS

(*) **Attenzione:** deve essere effettuata regolarmente una calibrazione valida di pure dyes (Pure Spectra Component File) e background (Background Component File).

G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico esperto ed adeguatamente addestrato, dietro supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere specificamente addestrato all'uso dei termociclatori real-time, nonché alla manipolazione dei reagenti per biologia molecolare e deve avere familiarità con i protocolli di amplificazione per PCR real-time.
3. Per effettuare questo tipo di analisi, il kit deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale del settore (Ministero della Salute o ente similare).
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti non talcati ed occhiali. Evitare di utilizzare oggetti appuntiti (aghi) e taglienti (lame). Tutto il personale interessato deve essere addestrato alle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA, e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale impiegato nel trattamento dei campioni deve essere vaccinato contro HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente di laboratorio deve essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici a trasmissione per via aerea.
7. I componenti A e B sono fotosensibili. Occorre quindi proteggerli dall'esposizione a luce intensa.
8. Evitare vibrazioni sulla superficie del banco dove viene eseguita l'analisi.
9. Al ricevimento, riporre il kit in un frigorifero a temperatura controllata o in una camera fredda a una temperatura di +2/+8°C.
10. Non mischiare i componenti dei kit di diversi lotti. Non mischiare nemmeno i componenti dei kit dello stesso lotto.
11. Assicurarsi che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. In caso contrario, informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie alla sostituzione del kit.
12. Evitare la contaminazione crociata tra campioni, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione.
13. Evitare la contaminazione crociata tra reagenti del kit, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni uso.
14. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta del confezionamento esterno.

15. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i tamponi uretrali e cervicali e i campioni di urine umani devono essere manipolati secondo il livello 2 delle norme di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA, e nel rispetto delle norme riportate nella pubblicazione degli Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

16. Conservare ed estrarre i campioni separatamente da altri reagenti e usare una stanza separata per la loro manipolazione.

17. Dissolvere i reagenti liofilizzati con la quantità corretta, riportata sull'etichetta, del componente C (codificato: ALL/C) in dotazione nel kit.

18. Effettuare tutte le necessarie operazioni nel minor tempo possibile, conservando i componenti in ghiaccio o in un blocco refrigerante.

19. Il flusso di lavoro del laboratorio deve procedere in maniera unidirezionale, partendo dall'area di estrazione e spostandosi verso le aree di amplificazione e di analisi dati. Non riportare campioni, attrezzatura e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti.

20. Si raccomanda l'uso di materiale monouso in plastica per la preparazione dei componenti liquidi o per il trasferimento dei componenti nelle stazioni di lavoro robotizzate, per evitare la contaminazione crociata.

21. I materiali di rifiuto prodotti utilizzando il kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalle procedure di estrazione dei campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima dello smaltimento. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.

22. Spargimenti accidentali da campioni o da operazioni in corso devono essere eliminati con carta assorbente imbevuta di candeggina per uso domestico e poi con acqua. La carta assorbente utilizzata deve essere gettata negli appositi contenitori per rifiuti di laboratorio od ospedalieri.

23. Gli altri materiali di rifiuto generati (ad esempio: puntali usati per campioni) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti in conformità alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

H. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. I tamponi cervicali e uretrali devono essere raccolti in un recipiente adeguato per il trasporto che preservi l'acido nucleico dei batteri.

2. Per i campioni di urine, usare i primi 20-30 ml di primo getto, che si ritiene contenga la concentrazione più elevata di batteri rilevanti da un punto di vista diagnostico.

3. Per i campioni di urine, utilizzare provette di polipropilene senza aggiunta di conservanti.

4. I campioni uretrali, cervicali e di urine devono essere pretrattati prima dell'estrazione del DNA come descritto nel paragrafo M.

5. I campioni di urine e dei tamponi devono essere trasportati e conservati a +2/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni. Per una conservazione ottimale dei campioni, si raccomanda di suddividerli in più aliquote (volume minimo di 100 µl) e di conservarli congelati a -20/-80°C per un periodo massimo di 30 giorni dalla campionatura. Evitare cicli di congelamento/scongelamento ripetuti.

6. Se si utilizzano campioni congelati, scongelarli appena prima dell'estrazione per evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

7. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati.

I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

Master mix:

Componente A. Pronto all'uso. Miscelare bene nel Vortex prima dell'uso e centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.

ATTENZIONE: il componente A è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

Primer/probe:

Componente B.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il componente B liofilizzato con il volume del componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C < temp. amb. < 25°C).
- Vortexare brevemente

ATTENZIONE: il componente B è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

Acqua MG:

Componente C. Pronto all'uso.

Controllo negativo:

NTC. Pronto all'uso.

Controlli positivi:

Componente CTRL-H.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il CTRL-H liofilizzato con il volume del componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C < temp. amb. < 25°C).
- Vortexare brevemente

Componente CTRL-L.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il CTRL-L liofilizzato con il volume del componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C < temp. amb. < 25°C).
- Vortexare brevemente

Controllo interno:

I.C.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'IC liofilizzato con il volume del componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C < temp. amb. < 25°C).
- Vortexare brevemente

L. STRUMENTI E ACCESSORI USATI IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le **micropipette** devono essere calibrate e sottoposte a regolare decontaminazione (alcol ad uso domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti ad uso ospedaliero) nelle parti che possono accidentalmente venire in

contatto con il campione. Devono inoltre essere regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% e un'esattezza di +/-5%.

2. **Dispositivo di estrazione:** il kit CTDNA.CE è destinato all'uso esclusivo con QIAamp DNA Minikit Codice:51306 (QIAGEN) e Nucleospin Tissue kit Codice: 740952 (Macherey-Nagel). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.
3. **Termociclatori real-time.** Il kit CTDNA.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con gli strumenti real-time ABI 7500 (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystems) e MX3000P (Software MxPro version 4.01, Stratagene). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

M. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza stampata sull'etichetta esterna della scatola contenente il kit. Non utilizzare il kit se è scaduto.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili ad occhio nudo o aggregati. Controllare che sul fondo dei flaconi contenenti i componenti liofilizzati sia presente un aggregato ben formato. Accertarsi che il prodotto non si sia danneggiato durante il trasporto e che non sia presente alcuna fuoriuscita di liquidi all'interno della scatola.
3. Dissolvere i componenti liofilizzati con la giusta quantità di Componente C (acqua "Molecular Grade") come descritto nel relativo paragrafo (I).
4. Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
5. Seguire rigorosamente le istruzioni contenute nel manuale dello strumento fornito dai produttori per la corretta impostazione dei termociclatori real-time.
6. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume corretto.
7. Controllare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
8. In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

N. PRE-TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

Urine

- Centrifugare a 4500 rpm/min per 10 minuti
- Eliminare il surnatante e dissolvere il pellet nella quantità corretta di PBS sterile, a seconda delle dimensioni del pellet ottenuto (0,5-2 ml).
- Procedere all'estrazione del DNA.

Tamponi

- Centrifugare a 4500 rpm/min per 10 minuti
- Eliminare il surnatante e dissolvere il pellet nella quantità corretta di PBS sterile, a seconda delle dimensioni del pellet ottenuto (0,5-2 ml).
- Procedere all'estrazione del DNA.

O. PROCEDURA D'ANALISI

Il test deve essere eseguito secondo le istruzioni di seguito riportate.

0.1 Estrazione del DNA

La fase estrattiva del DNA genomico di Chlamydia trachomatis deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
-----------	-------------	----------------	------------

Tamponi uretrali/cervicali e urine	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™
Tamponi uretrali/cervicali e urine	NucleoSpin Tissue	740952	MN™

L'estrazione del DNA genomico di Chlamydia trachomatis dai campioni di urine deve essere eseguita dall'utilizzatore finale, in base alle istruzioni del produttore, con i seguenti kit:

• **QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)**

Note importanti: il protocollo "Purificazione del DNA dal tessuto" descritto nelle istruzioni del produttore deve essere applicato con le seguenti modifiche:

1. iniziare il protocollo dalla fase n°2a utilizzando un campione di 200 ul del pellet risospeso come descritto nel paragrafo M (Pretrattamento del campione) invece del campione di tessuto.
2. Nella fase n° 11 utilizzare 100 ul di tampone di eluizione invece di 200 ul.

• **NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)**

Nota importante: seguire il "Protocollo standard per tessuti umani o animali e cellule in coltura" (Protocollo 5.1), descritto nelle istruzioni del produttore, con le seguenti modifiche:

1. iniziare il protocollo dalla fase n°2 "Prelisi" utilizzando un campione di 200 ul del pellet risospeso come descritto nel paragrafo M (Pretrattamento del campione).

L'estrazione dai campioni dei tamponi deve essere eseguita dall'utilizzatore finale, in base alle istruzioni del produttore, con i seguenti kit:

• **QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)**

Note importanti: il protocollo "Purificazione del DNA dal tessuto" descritto nelle istruzioni del produttore deve essere applicato con le seguenti modifiche:

1. iniziare il protocollo dalla fase n°2a utilizzando un campione di 200 ul del pellet risospeso come descritto nel paragrafo M (Pretrattamento del campione) invece del campione di tessuto.
2. Nella fase n° 11 utilizzare 50 ul di tampone di eluizione invece di 200 ul.

• **NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)**

Nota importante: seguire il "Protocollo standard per tessuti umani o animali e cellule in coltura" (Protocollo 5.1), descritto nelle istruzioni del produttore, applicando le seguenti modifiche:

1. iniziare il protocollo dalla fase n°2 "Prelisi" utilizzando un campione di 200 ul del pellet risospeso come descritto nel paragrafo M (Pretrattamento del campione).
2. Nella fase n° 8 "Eluizione di DNA altamente puro" utilizzare 50 ul di tampone di eluizione invece di 100 ul.

Il DNA estratto dai campioni, non utilizzato nella sessione di analisi, deve essere adeguatamente conservato a temperatura controllata (da -20°C a -80°C).

Nota importante: : l'IC del kit CTDNA.CE può essere inserito nella procedura d'isolamento del DNA come controllo di estrazione.

Il valore Ct del controllo interno per i campioni negativi viene usato per stabilire se la procedura di estrazione del DNA è stata eseguita correttamente (vedere il paragrafo R).

Per questa applicazione, aggiungere 5 µl di I.C. alla miscela di tampone di lisi e campione e procedere seguendo il manuale d'istruzioni fornito dal produttore del kit di estrazione.

O.2 Impostazione della reazione

Il kit **CTDNA.CE** è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con ABI 7500 standard (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystem), e MX3000P (Software MxPro version 4.01, Stratagene).

O.2.1 Preparazione della PCR

Importante: nel paragrafo P è riportato un esempio di schema di dispensazione, al quale occorre fare riferimento prima di iniziare a leggere le seguenti istruzioni.

- Preparare i componenti come descritto nel paragrafo I.
- Preparare il numero richiesto di provette di reazione oppure una piastra di reazione a 96 pozzetti per i campioni in esame e per i controlli positivi (preparati come descritto nel paragrafo I).

Nota importante: usare solo provette ottiche o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori real-time .

- Prendere in considerazione il fatto che i campioni dovrebbero essere analizzati, se possibile, in duplicato.
- Includere almeno 1 provetta/pozzetto per il controllo negativo (NTC).
- Preparare la **miscela di amplificazione** per **campioni, NTC e controlli positivi (CTRL-H, CTRL-L)** come da tabella seguente:

Preparazione della miscela di amplificazione

(I.C. come controllo di amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
A	Master mix	12,5 µl	150 µl
B	Primer/probe	2 µl	24 µl
I.C.	Controllo interno	0,5 µl	6 µl
Volume totale		15 µl	180 µl

Nota importante: se il controllo interno è stato aggiunto durante la procedura d'isolamento del DNA, preparare la **miscela di amplificazione** per **campione, NTC e controlli positivi (CTRL-H, CTRL-L)** come descritto nella tabella seguente:

Preparazione della miscela di amplificazione

(I.C. come controllo di estrazione/amplificazione)

Numero di reazioni		x1	x12
A	Master mix	12,5 µl	150 µl
B	Primer/probe	2 µl	24 µl
C	H ₂ O MG	0,5 µl	6 µl
Volume totale		15 µl	180 µl

O.2.2 Procedura di amplificazione

- Dispensare 15 µl di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastre.
- Aggiungere 10 µl di **campione, NTC, CTRL-H e CTRL-L** alle provette di reazione.
- Chiudere bene le provette di reazione.
- Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 rpm/min.
- Non lasciare le provette di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti ed esposte alla luce (coprire le provette).
- Caricare le provette di reazione nel termoblocco dello strumento real-time.
- Dopo aver impostato lo strumento real-time come descritto nel paragrafo O3 (Programmazione dello strumento), procedere con la sessione di analisi.

Nota importante: Dopo risospensione nel componente C (H₂O MG), i componenti liofilizzati sono stabili per non più di 3 ore, se conservati in ghiaccio oppure a una temperatura di 2°-8°C. Il volume inutilizzato di componente B, CTRL-H, CTRL-L e I.C. può essere congelato a -20°C ed utilizzato come descritto nella Sezione E.

O.3 Programmazione dello strumento

Per la programmazione dello strumento, fare riferimento al manuale d'istruzioni della strumentazione fornito dai produttori.

Nota importante: per Mx3000 impostare "Filter set gain settings": ROX = x1, FAM = x8, JOE = x1. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

O.3.1 Profilo termico

Il profilo termico è riportato nella seguente tabella:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	50°C	2 min
1	1	95°C	10 min
2	45	95°C	15 sec
		60°C (*)	1 min

NOTA IMPORTANTE: (*) fase per la raccolta dei dati in tempo reale

ATTENZIONE: programmare il profilo termico corretto sullo strumento real-time seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

O.3.2 Scelta dei fluorofori

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali dei termociclatori real-time (ABI 7500 e MX3000P Stratagene), scegliere i fluorofori indicati nella tabella riportata qui sotto

Determinazione	Reporter	Quencher
Chlamydia trachomatis	FAM	Non fluorescente
Controllo interno (I.C.)	JOE	Non fluorescente
Passive Reference	ROX	Non presente

ATTENZIONE : prestare attenzione durante la programmazione e l'impostazione dello strumento real-time seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

P. SCHEMA DEL TEST

Qui sotto è riportato un esempio di schema di dispensazione per l'analisi qualitativa:

Micropiastre o provette

	1	2	3		
A	CTRL-H 10 ⁴ copie/µl	Campione 6			
B	CTRL-L 10 copie/µl	Campione 7			
C	NTC	Campione 8			
D	Campione 1	Campione 9			
E	Campione 2	Campione 10			
F	Campione 3	Campione 11			
G	Campione 4	Campione 12			
H	Campione 5	Campione 13			

Legenda: NTC = controllo negativo CTRL-H, CTRL-L = controlli positivi per il DNA di Chlamydia trachomatis, Campione 1,2,3 = campioni in esame.

Q. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Q.1 Impostazioni pre-analisi

Prima di iniziare l'analisi:

- impostare il "baseline" (livello di fluorescenza di base) come indicato qui sotto:

"Baseline"	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Auto Baseline
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptive Baseline (not use Mx4000 v1.00 to v3.00 algorithm)

- Impostare manualmente la "Threshold" di fluorescenza FAM/JOE.

FAM "Threshold"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0,13
BIORAD™ MiniOpticon®	0,08
STRATAGENE™ MX3000P®	0,13

JOE "Threshold"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0,08
BIORAD™ MiniOpticon®	0,01
STRATAGENE™ MX3000P®	0,02

Q.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sui CTRL-H/CTRL-L ogni volta che il kit viene usato per verificare se i rispettivi valori Ct sono quelli previsti e riportati nella tabella seguente.

Controllo FAM	Requisiti
CTRL-H	22 < Ct (ciclo soglia) < 26
CTRL-L	32 ≤ Ct (ciclo soglia) < 36

R. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione, si parte dal presupposto che la fluorescenza FAM (valore Ct positivo/negativo) e la fluorescenza JOE del controllo interno convalidino la determinazione del DNA di CT come descritto nella tabella seguente:

FAM C. trachomatis	JOE controllo interno	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	+	CORRETTO
	-	CORRETTO*
CAMPIONE NEGATIVO	Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**

*Una concentrazione iniziale elevata del DNA di C.trachomatis (segnale FAM positivo) può portare ad una fluorescenza RIDOTTA o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.

** Potrebbero essersi verificati problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficiente o assente) o durante la fase di estrazione (presenza di inibitori o campione iniziale contenente un numero di cellule insufficiente) con un risultato conseguentemente errato. La procedura di analisi deve essere ripetuta partendo dalla fase di estrazione con un nuovo campione proveniente dallo stesso paziente.

I risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione i sintomi clinici e gli altri parametri di laboratorio correlati alle condizioni del paziente. Sono possibili i seguenti risultati:

Tabella di risoluzione dei problemi

	FAM	JOE	Risultato	CONTROLLO
CAMPIONE sconosciuto	+	+/-	RISULTATO CORRETTO <u>Positivo</u>	IMPORTANTE: una concentrazione iniziale elevata del DNA di CT (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.

CAMPIONE sconosciuto	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: inibizione, errore nella procedura o mancato funzionamento degli strumenti	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM per la determinazione di CT e JOE per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente; 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta; 7. la procedura di estrazione sia stata eseguita correttamente.
CAMPIONE sconosciuto	-	+	RISULTATO CORRETTO <u>Negativo</u>	
CTRL-H/CTRL-L	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	IMPORTANTE: una concentrazione iniziale elevata del DNA di CT (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.
CTRL-H/CTRL-L	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM per la determinazione di Chlamydia trachomatis e JOE per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente; 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta.
CTRL-H/CTRL-L	-	+	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano corretti: FAM per la determinazione di Chlamydia trachomatis e JOE per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente.
NTC	-	+	RISULTATO CORRETTO	
NTC	+	+/-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: contaminazione	Verificare che: 1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. lo spazio di lavoro e gli strumenti siano decontaminati a intervalli regolari; 4. il kit sia stato conservato correttamente.

Note importanti:

1. *l'interpretazione dei risultati dovrebbe essere effettuata dietro supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio e interpretazioni errate.*
2. *Al momento della trasmissione dei risultati del test dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione a evitare trasferimenti di dati erronei.*

Se si presentano uno o più problemi tra quelli precedentemente descritti, dopo il controllo informare il supervisore di qualsiasi problema residuo per l'eventuale adozione di ulteriori misure.

S. PERFORMANCE

La valutazione delle performance è stata eseguita in conformità a quando indicato nelle specifiche tecniche interne o ITS.

La valutazione delle performance è stata condotta presso i laboratori di DiaPro su materiali forniti dal laboratorio medico di riferimento.

S.1 SENSIBILITÀ ANALITICA

Per i metodi qualitativi, la sensibilità analitica può essere espressa come **limite di determinazione**.

Limite di determinazione (Limit of detection-LOD): è la quantità minima del target che può essere determinata da un sistema di analisi con una probabilità dichiarata.

Per i test NAT, viene espresso come concentrazione minima dell'analita che, dopo ripetizioni multiple del test, fornisce un risultato positivo.

Il **limite di determinazione (LOD)** si stabilisce analizzando diluizioni seriali contenenti concentrazioni note dell'analita.

Il **LOD** è la concentrazione minima di analita che può essere determinate con probabilità $\geq 95\%$ nei campioni in esame.

Per il kit CTDNA.CE, il **LOD** deve essere stabilito analizzando diluizioni seriali di 1:2 (8 replicati per tre sessioni di analisi diverse) di un plasmide recante la sequenza virale target.

I risultati sono stati analizzati mediante un'analisi **Probit** per stabilire il limite di determinazione al 95%.

I risultati sono i seguenti:

Limite di determinazione LOD (p=0,05)	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0,53 copie/ µl
STRATAGENE™ MX3000P®	0,53 copie/ µl

Nota importante: il target è una sequenza di plasmide criptico, ripetuta da 1 a 10 volte nel genoma di *Chlamydia trachomatis*.

S.2 SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica è la capacità del metodo di determinare solo la sequenza del DNA target.

La specificità analitica dell'analisi del DNA di CT è stata studiata come segue:

1. il set di primer/probe è stato scelto analizzando la sequenza target del genoma con un software appropriato (LionSoft v.1.0 fornito da Biotools e Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
2. Il set di primer/probe e la sequenza target del genoma sono stati controllati con il software "BLAST" per verificare se alcune delle sequenze di nucleotidi depositate nelle banche dei genomi di tutto il mondo presentino qualsiasi omologia con *Chlamydia trachomatis*, nonché con il software "ClustalX" per confrontare le sequenze target del genoma dei diversi genotipi di *C.trachomatis*.
3. La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
4. Il DNA genomico isolato da organismi batterici potenzialmente interferenti con *Chlamydia trachomatis* è stato fornito dall'American Type Culture Collection (ATCC), Vircell e Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) ed è stato analizzato.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	Risultati
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	negativo
<i>Chlamydia psittaci</i>	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo
<i>Candida glabrata</i>	negativo
<i>Mycoplasma hominis</i>	negativo
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	negativo
<i>Acinetobacter spp</i>	negativo
<i>Escherichia coli</i>	negativo

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	negativo
<i>Proteus mirabilis</i>	negativo
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	negativo

S.3 SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ

S.3.1 Specificità diagnostica:

La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo dia un risultato negativo in assenza di un marker bersaglio. In questo modo, il risultato **vero negativo** è un campione sicuramente negativo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Questo parametro è stato studiato esaminando 39 campioni negativi per il DNA di *C. trachomatis* (22 campioni di urine e 17 tamponi cervicali):

VERI NEGATIVI	39
FALSI POSITIVI	0
CAMPIONI TOTALI	39
SPECIFICITÀ %	100

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una specificità diagnostica $\geq 99\%$.

S.3.2 Sensibilità diagnostica

La **sensibilità diagnostica** è la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato positivo in presenza del marker bersaglio. In questo modo, il risultato **vero positivo** è un campione sicuramente positivo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Per il kit CTDNA.CE, questo parametro è stato studiato esaminando 10 campioni di tamponi cervicali positivi per il DNA di *C. trachomatis*. I campioni sono stati studiati in duplicato nella stessa sessione di analisi e successivamente è stata calcolata la percentuale (%) di campioni positivi.

VERI POSITIVI	10
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	10
SENSIBILITÀ %	100

Inoltre, i pannelli QCMD 2007, QCMD 2003 e QCMD 2010 *Chlamydia trachomatis* (CTDNA07, CTDNA03 e CTDNA10) EQA sono stati testati con 20 campioni positivi (11 campioni di urine e 9 tamponi) e 5 campioni negativi (3 campione di urine e 2 tampone).

Sulla base dei risultati ottenuti, la sensibilità diagnostica del sistema è stata calcolata come **100%**.

Sensibilità diagnostica	100%
Specificità diagnostica	> 99,5%

S.4 PRECISIONE

La precisione mostra il grado di attendibilità del sistema. Ogni procedura di misurazione ha una variazione casuale intrinseca chiamata "errore casuale". L'errore casuale non ha un valore numerico, ma è determinato dalla dispersione della misurazione espressa come deviazione standard (DevST) e coefficiente di

variazione (CV%). Normalmente, la precisione di un test si riferisce alla concordanza tra le misurazioni ripetute dello stesso materiale. Per il kit CTDNA.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. Il CTRL-H e il CTRL-L in 8 replicati sono stati analizzati nella stessa sessione (intra-assay) e in tre sessioni diverse (inter-assay). Le variabilità intra-assay e inter-assay sono state calcolate sulla base dei risultati ottenuti.

In assenza di parametri internazionali stabiliti, abbiamo identificato il valore di accettabilità seguente per il kit CTDNA.CE:
coefficiente di variazione intra-assay (CV%) ≤ 10%;
coefficiente di variazione inter-assay (CV%) ≤ 10%.

T. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utilizzatore di questo kit di leggere con attenzione e comprendere l'insero allegato alla confezione. È necessaria la massima osservanza del protocollo per ottenere risultati attendibili. In particolare, il pipettaggio accurato di campioni e reagenti, l'applicazione di un flusso di lavoro corretto, insieme all'attenta programmazione delle fasi del termociclatore sono fondamentali per una determinazione accurata e riproducibile del DNA di *C.trachomatis*.

Si raccomanda quindi che riservatezza, supporto appropriato e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

U. BIBLIOGRAFIA

1. Detection of chlamydia trachomatis in endocervical specimens by polymerase chain reaction. Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, Purohit AP, Herman SA, Buonagurio DA, Dragon EA. J Clin Microbiol 1992; 30 (11): 2847-51.
2. A novel real-time PCR to detect Chlamydia trachomatis in first-void urine or genital swabs. Jaton K, Bille J, Greub G. J Med Microbiol 2006; 55: 1667-74.
3. Diagnostic value of the polymerase chain reaction for Chlamydia detection as determined in a follow-up study. Claas HCJ, Wagenvoort JHT, Niesters HGM, Tio TT, Van Rijsoort-vos JH, Quint WGV. J Clin Microbiol 1991; 29 (1): 42-45.
4. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia Trachomatis. Stephen RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Science 282: 754-59.
5. Diagnosis of Chlamydia trachomatis urethritis in men by polymerase chain reaction assay of first-catch urine. Bauwens JE, Clark AM, Loeffelholz MJ, Herman SA, Stamm WE. J Clin Microbiol Nov 1993; 31 (11): 3013-16.
6. A common Plasmid of Chlamydia trachomatis. Palmer L, Falkow S. Plasmid 1986; 16: 52-62.
7. Development and validation of a rotor-gene real-time PCR assay for detection, identification, and quantification of Chlamydia trachomatis in a single reaction. Jalal H, Stephen H, Curran MD, Burton J, Bradley M, Carne C. J clin Microbiol Jan 2006; 44 (1): 206-213.

5. Simboli

LEGENDA			
	Codice Del prodotto		Temperatura di conservazione
	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto		Produttore
	Data di scadenza		Numero di test
	Marchio di conformità CE		Data di produzione

Tutti i Prodotti IVD sono fabbricati dall'Azienda nell'ambito e sotto il controllo di un Sistema di Qualità certificato e approvato da un Organismo Notificato Europeo. Ogni lotto è sottoposto ad una procedura di Controllo di Qualità e rilasciato alle vendite solo se conforme alle specifiche tecniche comuni Europee e ai criteri di accettabilità definiti.

CE
0318



CONTATTI DISTRIBUTORE

4BShop Lab Srls

-  info@4BShopLab.com
-  www.4BShopLab.com
-  +39.0371.18.56.643

FABBRICANTE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl

 **MADE IN ITALY**

EN ISO 13485:2013 Certified

