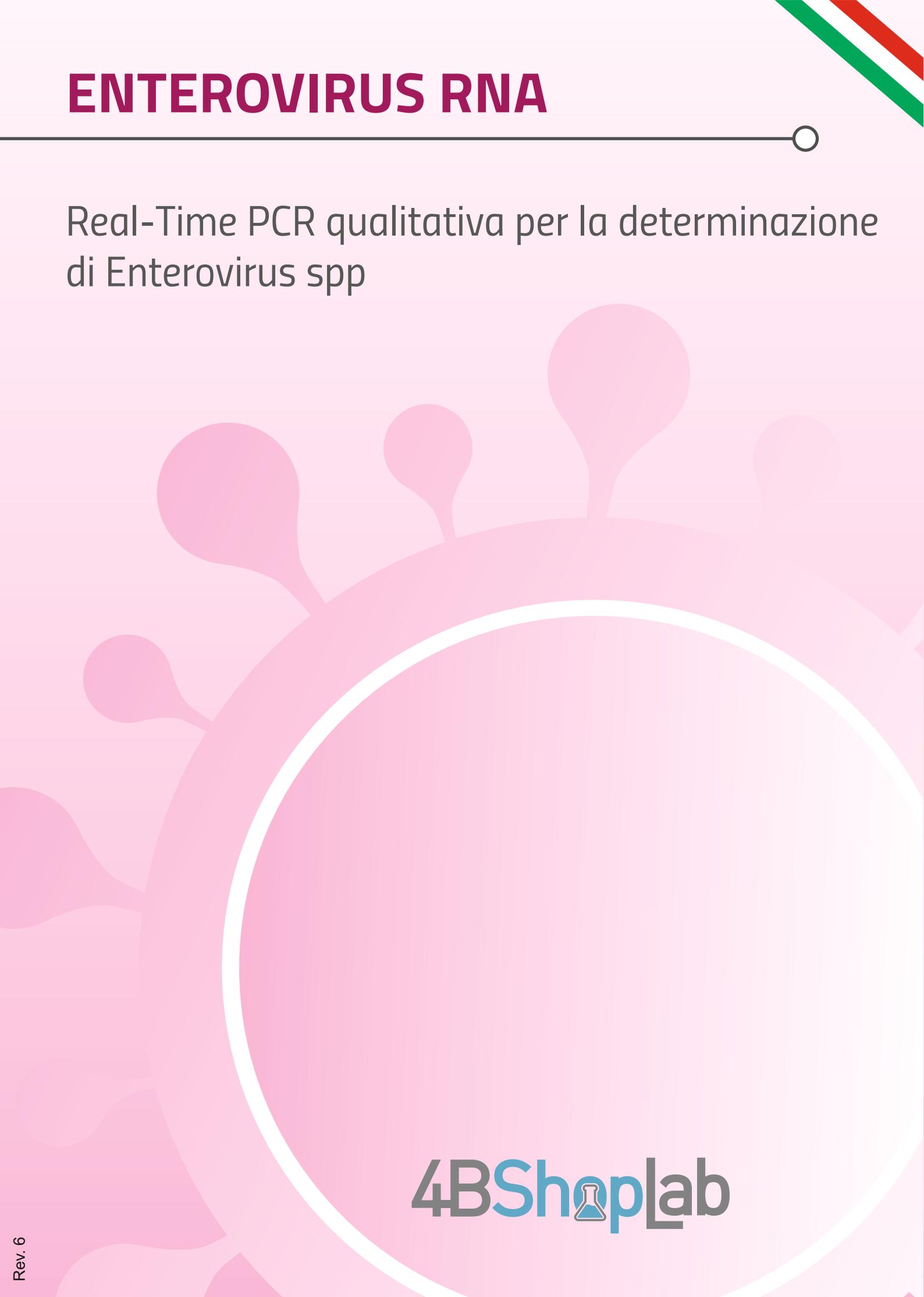


ENTEROVIRUS RNA



Real-Time PCR qualitativa per la determinazione di Enterovirus spp

4BShopLab

Enterovirus RNA

A. USO PREVISTO

Il kit di real-time PCR **Enterovirus RNA**, codificato **ENTERORNA.CE**, è finalizzato alla rilevazione dell'RNA di Enterovirus in campioni biologici umani (plasma e liquido cerebrospinale). La presenza di un controllo interno (IC) di 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™*), 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.

NOTA IMPORTANTE: Il kit Enterovirus RNA è in grado di determinare l'RNA degli Enterovirus appartenenti ai seguenti sierotipi: Poliovirus 1-3, Coxsackievirus A1-A22, A-24, Coxsackievirus B1-B6, Echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33, Enterovirus 68-71. I parechovirus umani (Echovirus 22 e 23) non vengono determinati con questo kit.

B. INTRODUZIONE

Gli enterovirus umani (fino ad oggi si conoscono 70 sierotipi appartenenti alla famiglia delle Picornaviridae) sono agenti patogeni ubiquitari con un'incidenza elevata a livello mondiale. Sebbene la maggioranza delle infezioni enterovirali umane sia asintomatica, questi virus possono causare un'ampia gamma di sindromi cliniche, dalle patologie delle vie respiratorie superiori a rash febbrile, meningite asettica, pleurodinia, encefalite, paralisi flaccida acuta e malattia simil-settica neonatale. L'enterovirus umano può anche essere implicato nella patogenesi di gravi malattie croniche, tra cui diabete mellito di tipo 1, miocardite, cardiomiopatia congestizia e malattie neuromuscolari. Inoltre, le infezioni enterovirali sono responsabili di un considerevole numero di pazienti affetti da meningite asettica ed encefalite che richiedono un'ospedalizzazione in estate e in autunno.

I virus enterici umani vengono escreti nelle feci dei pazienti infetti a concentrazioni elevate e trasmessi principalmente per via oro-fecale attraverso alimenti e acqua contaminati. Si stima che rappresentino la causa di circa il 30% - 90% dei casi di gastroenterite in tutto il mondo.

Gli enterovirus umani sono piccoli virus senza envelope che contengono un genoma a RNA lineare a singolo filamento (7,4 kb), comprendente due regioni non codificanti al 5' e al 3' e una singola, lunga fase di lettura aperta (ORF), codificante per una poliproteina composta da circa 2200 aminoacidi. La coltura cellulare è stato un metodo comune per isolare virus in acqua fino agli inizi degli anni '90. Più recentemente, la PCR è diventata il principale strumento per la determinazione di questi virus.

C. PRINCIPIO DEL TEST

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

L'**RNA enterovirale**, purificato dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene retrotrascritto in cDNA e 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 unica degli Enterovirus.

Il controllo interno (IC) eterologo funge da controllo 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 ENTERORNA.CE contiene reagenti per 50 test.

Componente	Contenuto	ENTERORNA. CE 50 reazioni
A CODIFICATO: ALL/MM-1 CODICE COLORE: AZZURRO	Master mix	N° 2 provette/0,4 ml
B CODIFICATO: ENT/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	Acqua MG	N° 2 provetta/1,5 ml
NTC CODIFICATO: ALL/NTC CODICE COLORE: BIANCO	Negativo Controllo	N° 1 provetta/1,5 ml
CTRL-H Controllo positivo alto (10 ⁴ copie/µl) CODIFICATO: ENT/CTRL-H CODICE COLORE: VIOLA	Controllo positivo basso liofilizzato qualitativo	N° 8 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
CTRL-L Controllo positivo basso (50 copie/µl) CODIFICATO: ENT/CTRL-L CODICE COLORE: ROSA	Controllo positivo basso liofilizzato qualitativo	N° 8 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
I.C. Controllo interno CODIFICATO: ENT/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 provetta/0,4ml	n°4 provette/0,4 ml	n°6 provette/0,4 ml
2. Componente B	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
3. Componente C	n°1 provetta/1,5 ml	n°2 provetta/1,5ml	n°3 provetta/1,5ml
4. NTC	n°1 provetta/1,5 ml	n°1 provetta/1,5 ml	n°1 provetta/1,5ml
5. IC	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
6. CTRL-H	n° 4 provetta	n° 4 provette	n° 6 provette
7. CTRL-L	n° 4 provetta	n° 4 provette	n° 6 provette
8. Inserto	n° 1	n° 1	n° 1
Numero di test	25	100	150
Codice	ENTERORNA.CE.25	ENTERORNA.CE.100	ENTERORNA.CE.150

E. CONSERVAZIONE E STABILITA'

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

Una volta risospeso il **Componente B** (codice ENT/CB) e il **Componente IC** (codice ENT/IC) sono stabili 4 mesi a -20°C. Una volta risospesi i **Componenti controllo positivo alto e basso** (codici ENT/CTRL-H e ENT/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 estrazione RNA
3. MG EtOH
4. Blocco termico
5. Microcentrifuga
6. Portaprovette
7. Puntale sterile con filtro con barriera aerosol
8. Microprovette da 0,2 ml o micropiastre per PCR raccomandate dai produttori di strumenti per PCR real-time
9. Guanti monouso non talcati
10. Termociclatore
11. Termociclatore per PCR real-time (*)
12. Fazzoletti di carta assorbente
13. Vortex o miscelatori similari

(*) **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 biologica 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 di 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, al momento dell'apertura dei flaconcini dei kit e dei componenti e dell'esecuzione del test.

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. Si raccomanda anche di non scambiare componenti tra 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 campioni di siero/plasma umano devono essere trattati al 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 sulle etichette, del componente C (Codice: 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 automatiche, 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. Il liquido cerebrospinale deve essere prelevato in asepsi mediante puntura lombare; deve essere limpido e non emolizzato.

2. Il sangue deve essere prelevato da una vena in asepsi, mentre il plasma deve essere preparato utilizzando le procedure standard per le analisi cliniche di laboratorio.

3. Non è stata osservata alcuna influenza nella preparazione del campione in presenza di citrato, EDTA.

Attenzione: l'eparina (≥ 10 UI/ml) condiziona le reazioni di PCR.

Non usare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. Inoltre, non usare campioni di pazienti eparinizzati.

4. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni.

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

6. I campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattescenti) devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati. I campioni contenenti residui di fibrina, particelle pesanti o filamenti e corpuscoli microbici devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati.

7. I campioni di plasma per estrazione di RNA devono essere raccolti secondo le comuni procedure di laboratorio, trasportati e conservati a $+2/+8$ °C per un periodo massimo di 4 ore. I campioni di plasma possono essere conservati congelati a -20 °C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70 °C per periodi più lunghi.

8. Se non utilizzati immediatamente, i campioni di liquido cerebrospinale e plasma devono essere aliquotati e conservati a -20 °/ -80 °C dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati congelati a -20 °/ -80 °C per diversi mesi. Qualsiasi campione congelato non deve essere congelato/scongelato più di una volta, perché questo potrebbe inficiare il risultato del test.

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

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 di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti 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:

NIC. 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.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti 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.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti 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 di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 minuti 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 ENTERORNA.CE è destinato all'uso insieme a QIAamp Viral RNA Codice 52906 (QIAGEN) e NucleoSpin RNA Virus Codice 740956 (Macherey-Nagel) e NA Body Fluid Kit Codice: D-2021 (Chemagen distribuito da Dia.Pro). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso del kit fornite dal produttore.
3. **Fase di retrotrascrizione:** Il kit ENTERORNA.CE è destinato all'uso esclusivamente con kit di retrotrascrizione dell'RNA (Dia.Pro srl, codice: RNART.CE). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dal produttore.
4. **Termociclatori real-time.** Il kit ENTERORNA.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con i termociclatori Real-Time ABI PRISM 7500 Sequence Detection System® (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystems™*), MX3000P® (Software MxPro version 4.01, Stratagene™**). Il kit è stato adattato per il suo utilizzo sui termociclatori real-time ABI 7500

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 delle provette 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. PROCEDURA D'ANALISI

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

N.1 Estrazione dell'RNA

La fase estrattiva dell'RNA genomico di Enterovirus deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

Estrazione Manuale

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Liquido cerebrospinale/plasma	QIAamp Viral RNA mini kit®	52906	Qiagen™
Liquido cerebrospinale/plasma	NucleoSpin RNA Virus	740956	MN™

Estrazione Automatica in combinazione con lo strumento DIA.FASTEX

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Liquido cerebrospinale/plasma	NA Body Fluid Kit	D-2021	Chemagen distribuito da Dia.Pro

L'isolamento dell'RNA deve essere eseguito esclusivamente in conformità al manuale d'istruzioni (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro).

ATTENZIONE: Utilizzare esclusivamente i seguenti volumi nelle procedure di estrazione:

Descrizione	Volume di campione (µl)	Volume di eluizione (µl)
NucleoSpin RNA Virus	150	30
QIAamp Viral RNA mini kit	140	30
NA Body Fluid Kit	230	50

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

NOTA IMPORTANTE:

10 µl di RNA estratto per ogni campione devono essere usati per la retrotrascrizione con RNART.CE (Diapro).

N.2 Retro-trascrizione dell'RNA Virale a cDNA

La fase di retro-trascrizione dell'RNA genomico di Enterovirus deve essere realizzata esclusivamente in combinazione con il seguente kit:

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
RNA	Kit di retro trascrizione dell'RNA	RNART.CE	Dia.Pro srl

La retrotrascrizione dell'RNA deve essere realizzata esclusivamente seguendo le istruzioni fornite dal produttore (Dia.Pro srl).

N.3 Impostazione della reazione

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

N.3.1 Preparazione del PCR

Importante: nel paragrafo O è riportato un esempio di schema di dispensazione, che occorre consultare prima di iniziare le operazioni descritte di seguito.

- 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 possibilmente analizzati 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

Numero di reazioni		x1	x12
A	Master mix	12,5 µl	150 µl
B	Primer/probe	2 µl	24 µl
C	Acqua MG	4.5 µl	54 µl
I.C.	Controllo interno	1 µl	12 µl
Volume tot		20 µl	240 µl

N.3.2 Procedura di Amplificazione

- Dispensare 20 µl di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastra.
- Aggiungere 5 µl di **campioni, 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 N4 (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.

N.4 Programmazione dello strumento

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

Nota importante: per Mx3000P impostare "Filter set gain settings": ROX = x1, FAM = x4, JOE = x4. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

N.4.1 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	50	95°C	15 sec
		60°C (*)	1 min

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

ATTENZIONE: prestare attenzione a configurare il termociclatore real-time con il profilo termico corretto, seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

N.4.2 Selezione dei Fluorofori

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

Determinazione	Reporter	Quencher
Enterovirus	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.

O. SCHEMA DEL TEST

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

Micropiastra o provette				
	1	2	3	4
A	CTRL-H 10 ⁴ copie/µl	Campione 6		
B	CTRL-L 50 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 l'RNA di Enterovirus, IC = controllo interno, campione 1,2,3...13 = campioni in esame.

P. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

P.1 Impostazione pre-analisi

Prima di iniziare l'analisi:

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

"Baseline"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Manual Baseline: start = 3, end = 15
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptive Baseline (non usare l'algoritmo da Mx4000 v1.00 a v3.00)

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

FAM "Threshold"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.10

JOE "Threshold"	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.02
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02

P.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	Requisiti
CTRL-H	$23 \leq Ct$ (ciclo di soglia) < 27
CTRL-L	$31 \leq Ct$ (ciclo di soglia) < 35

Q. 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 dell'RNA enterovirale come descritto nella tabella seguente:

FAM Enterovirus	JOE controllo interno	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	+	CORRETTO
	-	CORRETTO*
CAMPIONE NEGATIVO	$Ct < 42$	CORRETTO
	$Ct \geq 42$ o indeterminato	NON VALIDO**

* Una concentrazione iniziale elevata di RNA enterovirale nel campione (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 <i>Positivo</i>	IMPORTANTE: una concentrazione iniziale elevata dell' RNA di ENTEROVIRUS (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 ENTEROVIRUS 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 <i>Negativo</i>	
CTRL-H/CTRL-L	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	IMPORTANTE: una concentrazione iniziale elevata dell' RNA di ENTEROVIRUS (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 ENTEROVIRUS 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 ENTEROVIRUS 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. Quando i risultati del test sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico porre la massima attenzione per evitare trasferimenti di dati erronei.

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

R. PERFORMANCE

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

La valutazione delle performance è stata condotta presso i laboratori di DiaPro su materiali forniti dai laboratori medici di riferimento.

R.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 espressa 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 determinata con probabilità $\geq 95\%$ nei campioni in esame. Per il kit ENTERORNA.CE, il **LOD** è stato 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 per stabilire il limite di determinazione al 100%.

I risultati sono i seguenti:

Limite di determinazione	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	2.5 copie/ µl
MX3000P Stratagene	2.5 copie/ µl

Questo significa che sussiste una probabilità del 100% di determinare una concentrazione di 2,5E+00 copie/µl.

R.2 SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica è capacità del metodo di determinare solo la sequenza dell'RNA bersaglio.

La specificità analitica del test ENTEROVIRUS RNA 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 primer/probe e la sequenza target del genoma sono stati controllati con il software "BLAST", per verificare se una qualsiasi delle sequenze di nucleotidi depositate nelle banche dei genomi in tutto il mondo presenti qualunque omologia con l'enterovirus, nonché con il software "ClustalX" per confrontare le sequenze target del genoma dei diversi genotipi dell'enterovirus.
3. La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
4. L'RNA genomico isolato da virus potenzialmente in grado di interferire con Enterovirus sono stati forniti dalla Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Milano – Italia e successivamente analizzati.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	Risultato
Rhinovirus	negativo

R.3 SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ'

R.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 33 campioni di plasma negativi per l'RNA di Enterovirus:

VERI NEGATIVI	33
FALSI POSITIVI	0
CAMPIONI TOTALI	33
SPECIFICITÀ %	100

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

R.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 ENTERORNA.CE, questo parametro è stato studiato analizzando campioni di plasma positivi per l'RNA di Enterovirus in duplicato nello stessa sessione di analisi. Inoltre sono stati analizzati anche campioni del pannello QCMD 2008 Enterovirus (EVRNA08) e QCMD 2010 Enterovirus e Parechiovirus (EVRNA10). Successivamente, è stata calcolata la percentuale (%) di campioni positivi.

VERI POSITIVI	19
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	19
SENSIBILITÀ %	100

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

Sensibilità diagnostica	100 %
Specificità diagnostica	> 99.5 %

R.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 ENTERORNA.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. 8 replicati del CTRL-H e del CTRL-L sono stati analizzati nella stessa sessione (intra-assay) e in tre diverse sessioni (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 ENTERORNA.CE:

coefficiente di variazione intra-assay (CV%) ≤ 10%;
coefficiente di variazione inter-assay (CV%) ≤ 10%.

S. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utilizzatore di questo kit di leggere attentamente e comprendere l'inserito allegato alla confezione. È necessaria la massima osservanza del protocollo per ottenere risultati attendibili. In particolare, un'accurata operazione di pipettaggio del campione e del reagente, l'applicazione di un corretto flusso di lavoro e un'attenta programmazione della fase di termociclazione sono fondamentali per una determinazione accurata e riproducibile dell'RNA di Enterovirus.

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

T. BIBLIOGRAFIA

1. Evaluation of real-time PCR versus PCR with liquid-phase hybridization for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid. K Kay-Yin Lai, L Cook, S Wendt, L Corey, and KR Jerome. J Clin Microbiol, July 2003, p3133-3141.
2. Rapid detection of enterovirus infection by automated RNA extraction and real-time fluorescence PCR. HF Rabenau, AMK Clarici, G Muhlbauer, A Berger, A Vince, S Muller, E Daghofer, B I Santner, E Marth, H H Kessler. J Clin Virol 25 (2002), p155-164.
3. Rapid and Sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. M Nijhuis, N van Maarseveen, R Schuurman, S Verkuijlen, M de vos, K Hendriksen, and A M van Loon. J Clin Microbiol, Oct 2002, p3666-3670.
4. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. W A Verstrepen, S Kuhn, M M Kockx, M E van de Vyvere, and an H Mertens. J Clin Microbiol, Nov 2001, p4093-4096.

5. Simboli

LEGENDA			
	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto		Fabbricante
	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 conforme alla Norma ISO 13485. 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.





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

