

HSV2 DNA QUANTITATION (QT)

Real-Time PCR per la quantificazione del genoma dell'HSV2

4BShopLab

HSV2 DNA

A. USO PREVISTO

Il kit per PCR real-time **HSV2 DNA Quantitation (QT)**, codificato **HSV2DNAQT.CE**, è destinato alla determinazione quantitativa del DNA del virus Herpes Simplex di tipo 2 nel plasma umano e nel liquido cerebrospinale con controllo simultaneo della reazione di estrazione/amplificazione mediante un **controllo interno (IC)**.

Il kit è stato adattato per il suo utilizzo sui termociclatori real-time ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS versione 1.3.1, Applied Biosystems™*) oppure MX3000P (Software MxPro versione 4.01, Stratagene™***) e CFX96 (Software CFX manager versione 1.7, Biorad™**).

* 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.

** Biorad è un marchio registrato.

***Stratagene è un marchio registrato.

B. INTRODUZIONE

L'HSV-2 è un membro della sottofamiglia delle Alphaherpesvirinae. Le infezioni da virus Herpes simplex (HSV) sono molto comuni e la sieroprevalenza negli adulti va dal 10 al 25% per l'HSV-2. Le infezioni da HSV nei soggetti immunocompetenti normalmente non causano problemi di salute significativi. L'HSV-2 è comunemente associato all'herpes genitale. L'HSV può riattivarsi nel sistema nervoso centrale e causare un'ampia serie di sintomi clinici dalla meningite lieve (di Mollaret) all'encefalite grave con un tasso di mortalità anche del 70% in assenza di terapia. L'HSV-1 e l'HSV-2 hanno comportamenti diversi nel sistema nervoso centrale (SNC). L'HSV-2 è associato a meningite, sia durante infezioni primarie o in concomitanza a riattivazioni genitali cliniche e subcliniche. L'infezione primaria dei neonati o la riattivazione dell'HSV nei soggetti immunocompromessi può essere associata a un'incidenza maggiore di meningite, encefalite grave e pericolose infezioni oculari.

I genomi dell'HSV sono complessi e contengono due regioni uniche chiamate regione unica lunga (UL) e regione unica corta (US). Delle 74 sequenze di lettura aperta note, la UL contiene 56 geni virali, mentre la US ne contiene solo 12.

Gli herpes virus sono conosciuti per la loro capacità di determinare infezioni permanenti incurabili. Normalmente, il trattamento comporta l'uso di farmaci antivirali ad azione universale che riducono l'infezione, ma che non sono in grado di eliminarla completamente. L'antivirale utilizzato più frequentemente è l'aciclovir o il valaciclovir. La diminuzione del carico virale può ridurre la gravità fisica delle lesioni associate agli sfoghi e la quantità di cellule infette disseminate dall'organismo, diminuendo così la probabilità di trasmissione a terzi.

La diagnosi dell'HSV nei neonati, come pure nei bambini e negli adulti, è stata enormemente facilitata dalla disponibilità di strumenti diagnostici per la determinazione e la quantificazione del DNA virale. La PCR real-time quantitativa è un metodo rapido, sensibile e specifico per la diagnosi delle infezioni da HSV.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit HSV2DNAQT.CE si basa su una chimica real-time che utilizza primer e probe specifici.

Il **DNA** dell'**HSV2**, recuperato dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene amplificato utilizzando il sistema di amplificazione real-time. Il prodotto amplificato viene determinato e quantificato sulla base di una curva standard mediante probe marcato con sostanze fluorescenti (reporter dye), specifico per una sequenza genomica unica dell'HSV2.

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

Viene fornita una curva standard per permettere la determinazione del carico virale.

D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato come HSV2DNAQT.CE contiene reagenti per 50 test.

Componente	Contenuto	HSV2DNAQT.CE 50 reazioni
A CODIFICATO: ALL/MM-4 CODICE COLORE: TRASPARENTE	Master mix	N°1 provette/0,825 ml
B CODIFICATO: HSV2/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°4 provette/1,5 ml
NTC CODIFICATO: ALL/NTC CODICE COLORE: BIANCO	Controllo negativo	n°1 provette/1,5 ml
STD Standard di quantificazione (2.7x10 ⁵ copie/μl) CODIFICATO: HSV2/STD CODICE COLORE: ROSSO	Standard quantitativo liofilizzato	N° 6 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
I.C. Controllo interno CODIFICATO: ALL/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	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°2 provette/0,825 ml	n°3 provette/0,825 ml
2. Componente B	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
3. Componente C	n°2 provetta/1,5 ml	n°4 provette/1,5 ml	n°6 provette/1,5 ml
4. NTC	n°1 provetta/1,5 ml	n°1 provetta/1,5 ml	n°1 provetta/1,5 ml
6. IC	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
7. STD	n°3 provetta	n°4 provette	n°6 provette
8. Foglietto illustrativo	n° 1	n° 1	n° 1
Numero di test	25	100	150
Codice	HSV2DNAQT.CE.25	HSV2DNAQT.CE.100	HSV2DNAQT.CE.150

E. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Il kit codificato HSV2DNAQT.CE deve essere conservato a +2. .8°C.

Una volta risospeso il **Componente B** (codice HSV2/CB) e il **Componente IC** (codice ALL/IC) sono stabili 4 mesi a -20°C. Una volta risospeso il **Componente STD** (codice HSV2/STD) è stabile 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. Puntali sterili 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

(*) **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 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.
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 che non vengano scambiati componenti tra due 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 sangue/plasma/liquido cerebrospinale 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, con acqua Molecular Grade (componente C codificato: CC) in dotazione nel kit.

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

19. Il flusso di lavoro in laboratorio deve procedere in un'unica direzione (Workflow unidirezionale), muovendo verso le aree di amplificazione ed 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. Il sangue viene raccolto mediante prelievo venoso in asepsi mentre il plasma viene preparato utilizzando le tecniche standard per il trattamento dei campioni per analisi cliniche di laboratorio.

2. Il liquido cerebrospinale viene prelevato in asepsi mediante puntura lombare.

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. Se non utilizzati immediatamente i campioni di plasma e liquido cerebrospinale devono essere aliquotati e conservati a -20° -80°C dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati congelati a -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.

8. I campioni di plasma per l'estrazione del DNA devono essere raccolti in base alle procedure di laboratorio comuni. I campioni di plasma e liquido cerebrospinale devono essere trasportati e conservati a +2/+8°C per un periodo massimo di 4 ore, possono

essere congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni o a -70°C per periodi maggiori.

9. Per una conservazione ottimale dei campioni, si raccomanda di suddividerli in più aliquote (volume minimo 300 µl) e di conservarli congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi. Evitare cicli di congelamento/scongelamento ripetuti.

10. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelarli solo ed immediatamente prima dell'estrazione per evitare possibili casi di degradazione dell'acido nucleico.

11. I campioni di sangue periferico intero per estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA in conformità ai regolamenti del laboratorio, trasportati e conservati a +2°C/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni. Non congelare i campioni di tutto il sangue periferico per evitare lisi delle cellule e perdita del titolo virale.

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:

NTC. Pronto all'uso.

Curva Standard:

STD.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'STD 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).
- Preparare 4 provette prive di nucleasi per la preparazione della curva standard
- Per ottenere i punti della curva standard, preparare una diluizione seriale 1:10 di STD utilizzando il componente C come descritto nella tabella sottostante:

Preparazione della curva standard	
-----------------------------------	--

STD	Calibratore 270000 copie/µl	Volume del componente C (codice: ALL/C) come indicato sull'etichetta della provetta
STD 1	27000 copie/ µl	10 µl (STD) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
STD 2	2700 copie/µl	10 µl (STD 1) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
STD 3	270 copie/µl	10 µl (STD 2) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
STD 4	27 copie/ µl	10 µl (STD 3) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)

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 (alcool 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 HSV2DNAQT.CE è destinato all'uso solo insieme a QIAamp DNA Minikit Codice.51306 (QIAGEN) , Nucleospin Blood kit Codice: 740951 (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 fornite dai produttori.
3. **Termociclatori real-time.** Il kit HSV2DNAQT.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con i termociclatori real-time ABI 7500 software SDS versione 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P software MxPro versione 4.01 (Stratagene) , CFX96 RTS, software CFX manager versione 1.7 (Biorad). 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.

- 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.
- Dissolvere i componenti liofilizzati con la quantità appropriata di componente C (codice: ALL/C) come descritto nel relativo paragrafo (I).
- Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
- Seguire rigorosamente le istruzioni contenute nel manuale dello strumento fornito dai produttori per la corretta impostazione dei termociclatori real-time.
- Verificare che le micropipette siano impostate sul volume corretto.
- Controllare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
- In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

N. PROCEDURA D'ANALISI

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

N.1 Estrazione del DNA

La fase estrattiva del DNA genomico dell'HSV2 deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

Estrazione Manuale

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Plasma/liquido cerebrospinale	Nucleospin Blood	740951	MN™
Plasma/liquido cerebrospinale	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™

Estrazione Automatica in combinazione con lo strumento DIA.FASTEX

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

L'isolamento del DNA deve essere realizzato esclusivamente in conformità al manuale di 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 Blood	200	66
QIAamp DNA mini kit®	200	66
NA Body Fluid Kit	200	66

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

Nota importante: L'IC del kit HSV2DNAQT.CE può essere usato nella procedura d'isolamento del DNA come controllo di estrazione.

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

Per questa applicazione:

- **Nucleospin Blood e QIAamp DNA mini kit:** aggiungere 3 µl di IC alla miscela del tampone di lisi e campione e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione.

- **NA Body Fluid Kit:** aggiungere 3 µl di IC alla miscela del tampone di lisi e campione e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione.

N.2 Impostazione della reazione

Il kit HSV2DNAQT.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con ABI 7500 software SDS versione 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P software MxPro versione 4.01 (Stratagene) e CFX96 software CFX manager versione 1.7 (Biorad)

N.2.1 Preparazione della PCR

Importante: Un esempio di schema di dispensazione è riportato nella sezione O, alla quale bisogna far 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 la curva standard (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 per il controllo negativo (NTC).
- Preparare la **miscela di amplificazione** per **campioni, NTC e curva standard** 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 tot.		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 i **campioni** come indicato 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	Acqua MG	0,5 µl	6 µl
Volume totale		15 µl	180 µl

N.2.2 Procedura di amplificazione

- Dispensare 15 µl di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastra.
- Aggiungere 10 µl di **campioni, NTC e curva standard** alle provette di reazione.
- Chiudere bene le provette di reazione.
- Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 giri/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 nel supporto termoblocco del termociclatore real-time.
- Dopo le operazioni d'impostazione descritte nel paragrafo N3 (Programmazione dello strumento), iniziare la sessione di analisi del termociclatore.

Nota importante: i componenti liofilizzati dopo scioglimento nel componente C (acqua MG) sono stabili per non più di 3 ore, se conservati su ghiaccio oppure a una temperatura di 2°-8°C.

Alla fine della giornata di lavoro, smaltire il materiale rimasto dai punti di diluizione STD in modo appropriato.

Il volume non utilizzato di componente B, STD e I.C. può essere congelato a -20°C ed utilizzato come descritto nella Sezione E.

N.3 Programmazione dello strumento

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

Nota importante: per il set Mx3000P, "Impostazioni di guadagno del set filtrante": ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

N.3.1 Profilo termico

Il profilo termico è riportato nella seguente tabella:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	50°C	2 min
2	1	95°C	10 min

3	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.3.2 Scelta dei fluorofori

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali dei termociclatori real-time (ABI 7500, MX3000P Stratagene, BioRad CFX96), scegliere i fluorofori indicati nella tabella riportata qui sotto:

Determinazione	Reporter	Quencher
HSV2	FAM	Non fluorescente
Controllo interno (I.C.)	JOE/VIC	Non fluorescente
Passive Reference	ROX	Non presente

ATTENZIONE: prestare attenzione durante la configurazione del termociclatore real-time con le impostazioni corrette, seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

O. SCHEMA DEL TEST

Un esempio di schema di dispensazione per l'Analisi Quantitativa è riportato sotto:

Micropiastra o provette			
	1	2	3
A	STD 1 27000 copie/µl	Campione 4	
B	STD 2 2700 copie/µl	Campione 5	
C	STD 3 270 copie/µl	Campione 6	
D	STD 4 27 copie/µl	Campione 7	
E	NTC	Campione 8	
F	Campione 1	Campione 9	
G	Campione 2	Campione 10	
H	Campione 3	Campione 11	

Legenda: NTC = controllo negativo STD 1,2,3,4 = curva standard del DNA dell'HSV2, campione 1,2,3 = campioni in esame.

P. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

P.1 Impostazione preanalisi

Prima di iniziare l'analisi:

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

"Baseline"	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Auto Baseline
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptive Baseline <u>Non usare l'algoritmo Mx4000 da v1.00 a v3.00</u>
BIORAD™ CFX96®	Auto calculated Baseline

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

"Threshold" di fluorescenza FAM	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.15
BIORAD™ CFX96®	400

"Threshold" di fluorescenza JOE/VIC	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02
BIORAD™ CFX96®	350

P.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sui calibratori STD ogni volta che il kit viene usato per verificare se i loro valori Ct sono quelli previsti e riportati nella tabella seguente.

ABI™PRISM® 7500 SDS/ STRATAGENE™ MX3000P®	
Controllo FAM	Requisiti
STD 1	18.5 < Ct (Threshold Cycle) < 21.0

BIORAD™ CFX96®	
Controllo FAM	Requisiti
STD 1	19 < Ct (Threshold Cycle) < 21.5

Inoltre, vengono controllati i valori di slope e R² per verificare la qualità della sessione di analisi. Devono essere soddisfatti i requisiti seguenti.

Controllo FAM	Requisiti
Slope	-3,1 < slope < -3,9

Check FAM	Requirements
Efficiency	R ² > 0.98

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/VIC del controllo interno convalidino la determinazione dell'HSV2 come descritto nella tabella seguente:

HSV2 FAM	JOE/VIC controllo interno	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	20 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	CORRETTO*
CAMPIONE NEGATIVO	20 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**

*Una concentrazione del DNA dell'HSV2 superiore a 1000 copie/μl (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.

**In questo caso potrebbero essersi verificati problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficace o assente) o durante la fase di estrazione (presenza di inibitori o campione iniziale contenente un numero di cellule insufficienti) che possono portare a risultati non corretti o a falsi negativi. Il test deve essere ripetuto partendo dalla fase di estrazione utilizzando un nuovo campione.

Per ogni campione positivo rilevato con il kit HSV2DNAQT.CE, la quantificazione andava da 2,7E+08 a 5.0E-01 copie/ul, quindi il carico virale dell'HSV2 deve essere espresso come segnalato nella tabella sottostante:

ABI™PRISM® 7500 SDS - BIORAD™ CFX96® - STRATAGENE™ Mx3000P®	
Dati campione della sessione di analisi per l'HSV2 (copie/μl)	Carico virale HSV2 (copie/μl)
Quantità > 2,7E+08	Carico virale HSV2 > 2,7E+08
5.00 E-01 < Quantity < 2.7E+08	QUANTIFICAZIONE
Quantità < 5.00 E-01	Carico virale HSV2 < 5.00 E-01

NOTA IMPORTANTE: per la quantificazione dei campioni, consultare il paragrafo R.

I risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione la condizione clinica e le informazioni provenienti da altre analisi di laboratorio inerenti il paziente.

Sono possibili i seguenti risultati:

Tabella di risoluzione dei problemi

	FAM	JOE/VIC	Risultato	CONTROLLO
CAMPIONE sconosciuto	+	+/-	RISULTATO CORRETTO <u>Positivo</u>	IMPORTANTE: Una concentrazione del DNA dell'HSV2 superiore a 1000 copie/μl (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	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 dell'HSV2 e JOE/VIC 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>	
STD	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	IMPORTANTE: 1. Una concentrazione del DNA dell'HSV2 superiore a 1000 copie/μl (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti. 2. Un segnale JOE/VIC negativo è corretto quando il controllo interno IC è usato come controllo di estrazione

STD	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	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 dell'HSV2 e JOE/VIC 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.
STD	-	+	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	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 dell'HSV2 e JOE/VIC 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	Un segnale JOE/VIC negativo è corretto quando il controllo interno IC è usato come controllo di estrazione
NTC	+	+/-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: contaminazione	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 vengano decontaminati a regolari intervalli; 4. il kit sia stato conservato correttamente.

Note importanti:

1. *l'interpretazione dei risultati deve essere condotta dietro supervisione del responsabile di laboratorio, al fine di ridurre il rischio di errori di giudizio o di 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 i risultati del test corrispondono ai requisiti del **RISULTATO DEL TEST CORRETTO** indicati sopra, procedere alla sezione seguente.

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. QUANTIFICAZIONE

I calibratori STD sono trattati come campioni purificati e utilizzano lo stesso volume di 10µl.

La concentrazione dei calibratori STD viene espressa in copie/µl. La **concentrazione del genoma virale per ml** del campione di ogni paziente si calcola applicando la formula seguente:

Risultati (copie/ml) ≡

$$\frac{\text{copie/}\mu\text{l (dati sessione di analisi)} \times \text{volume campione di eluizione (}\mu\text{l)}}{\text{Volume di estrazione dei campioni (ml)}}$$

Esempio:

$$\text{Risultati (copie/ml)} \equiv \frac{1500 \times 66}{0.2}$$

$$\text{Risultati (copie/ml)} \equiv 4,95 \text{ E}+05$$

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 dai laboratori medici di riferimento.

S.1 SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica può essere espresso come **limite di determinazione** e come limite di quantificazione.

Limite di determinazione (Limit of detection-LOD): è la quantità minima del target che può essere determinate da un sistema 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 in maniera coerente (ad es. in $\geq 95\%$ dei campioni in condizioni di laboratorio di routine).

Nel kit HSV2DNAQT.CE il limite quantitativo **LOD** è stato determinato mediante analisi di 24 replicati (8 replicati in tre run diversi), della concentrazione minima dell'analita che può essere rilevata nel 100% di essi.

I risultati sono i seguenti:

Limite di rivelazione	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.3 copies/ µl
STRATAGENE™ MX3000P®	0.3 copies/ µl
BIORAD™ CFX96®	0.5 copies/ µl

Questo significa che esiste una probabilità del 100% che 0,5 copie/µl siano determinate su strumenti ABI™PRISM® 7500 SDS, STRATAGENE™ MX3000P® e BIORAD™ CFX96®

S.1.1 Limite di quantificazione

Il **limite di quantificazione** è stato stabilito misurando la **linearità**, il **range dinamico** e la **riproducibilità**.

La **linearità** è la misura del grado al quale una curva si avvicina ad una linea retta. Viene espressa con il valore **SLOPE**.

Il **range dinamico** è l'intervallo delle concentrazioni di analita per le quali il valore di output finale (ciclo di soglia Ct) del sistema è direttamente proporzionale alla concentrazione di analita, con esattezza e precisione accettabili.

I limiti del range dinamico sono i limiti di quantificazione inferiore e superiore (**Limite di quantificazione**).

Per il kit HSV2DNAQT.CE è stata preparata una curva di diluizione di limitazione con valore di copie/µl definito di un plasmide recante la sequenza virale target specifica. I punti di diluizione sono stati analizzati nel sistema analitico ed è stato determinato il loro Ct (ciclo di soglia).

E' stato così definito il **limite di quantificazione superiore** di $8,43 \log_{10}$ ($2,7 \text{E}+08$ copie/µl), e il **limite di quantificazione inferiore** di $-0,30 \log_{10}$ ($5,00 \text{E}-01$ copie/µl).

S.2 SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica è l'abilità di un metodo di rivelare e quantificare solo il marker bersaglio.

La specificità analitica dell'analisi del DNA dell'HSV2 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'HSV2, nonché con il software "ClustalX" per confrontare le sequenze target del genoma dei diversi genotipi dell'HSV2.

3. La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
4. I campioni di pazienti con infezioni dovute a organismi potenzialmente interferenti sono stati ottenuti da un centro medico di riferimento.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	Risultato
CMV	negativo
VZV	negativo
EBV	negativo
HHV6	negativo
HHV8	negativo
HSV1	negativo
Virus JC	negativo
Virus BK	negativo
HTLV II	negativo

S.3 SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ

S.3.1 Specificità diagnostica:

La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo dia un risultato positivo 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 10 campioni di plasma negativi per il DNA dell'HSV2.

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

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una specificità diagnostica del 100%.

S.3.2 Sensibilità diagnostica

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

Per il kit HSV2DNAQT.CE, questo parametro è stato studiato analizzando campioni di plasma positivi per il DNA dell'HSV2 in duplicato nello stesso run. Sono inoltre stati testati campioni del pannello di herpes simplex virus QCMD 2008 e QCMD 2010 (HSVDNA08 – HSVDNA10). Successivamente, è stata calcolata la percentuale (%) di campioni positivi.

VERI POSITIVI	20
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	20
SENSIBILITÀ %	100

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

Sensibilità diagnostica	100 %
Specificità diagnostica	100 %

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.

Nel kit HSV2DNAQT.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. La precisione è stata verificata durante la stessa corsa analitica (intra-assay) e in tre diverse corse analitiche (inter-assay) con una curva a 4 punti standard in 8 replicati.

È quindi stata calcolata la variabilità intra-assay e inter-assay.

In assenza di parametri internazionali stabiliti nella Direttiva Europea IVD CTS, abbiamo identificato il valore di accettabilità seguente per il DNA dell'HSV2:

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 attentamente e comprendere l'insero 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 e una quantificazione accurate e riproducibili del DNA dell'HSV2.

La determinazione che il plasma o il liquido cerebrospinale di una persona contiene DNA di HSV2 ha pesanti implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche.

Si raccomanda quindi che la discrezione, un supporto psicologico e un'appropriata terapia e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

U. BIBLIOGRAFIA

1. Weidmann M., Meyer-Konig U., Hufert F.T. J. clin. Microbiol., 2003; 41(4):1565-1568.
2. Molecular Diagnosis of Herpes simplex virus infections in the central nervous system. Tang Y., Shawn Mitchell P., Espy M.J., Smith T.F., Persing D.H. J. Clin. Microbiol., 1999; 37(7):2127-2136.
3. Management of herpes virus infection following transplantation. The British society for antimicrobial chemotherapy, 2000; 45:729-748.
4. Clinical validation of a new triplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and discrimination of herpes simplex virus type 1 and 2. Rail H., Bartlime A., Drerup J., Grewing T., Korn K. J. mol. Diagn, 2008;10(4):361-367.
5. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: a consensus report. Cinque P., Cleator G.M., Monteyne P., Sindic C.J., van Loon A.M. J. Neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1996; 61:339-345.
6. Effect of sequence polymorphisms on performance of two real-time PCR assay for detection of herpes simplex virus. Stevenson J., Hymas W., Hillyard D. J. Clin. Microbiol., 2005;43(5):2391-2398.
7. Real-time PCR for type-specific identification of herpes simplex in clinical samples: evaluation of type specific results in the context of CNS disease. Meylan S., Robert D., Estrade C., Grimbuehler V., Peter O., Meylan P.R., Sahli R. J. clin. Virol., 2008;41:87-91.

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 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.

CE



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

