VZV DNA QUANTITATION (QT)

Real-Time PCR per la quantificazione del genoma del Virus VZV

4BShopLab

Rev. 6

VZV DNA

A. USO PREVISTO

Il kit di real-time PCR **VZV DNA Quantitation (QT)**, codificato **VZVDNAQT.CE**, è finalizzato alla determinazione quantitativa del DNA del virus Varicella-Zoster in campioni umani di plasma e liquido cerebrospinale. La presenza di un controllo interno (IC) di estrazione/amplificazione permette di monitorare l'intero processo.
L'utilizzo del kit è compatibile con strumenti 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 Applera Corporation o delle sue consociate negli USA e/o altri paesi.
** Biorad è un marchio registrato.
***Stratagene è un marchio registrato.

B. INTRODUZIONE

Il VZV appartiene alla famiglia degli herpes virus di tipo alfa ed è correlato ai virus herpes simplex di tipo 1 e 2. Il VZV causa la varicella durante l'infezione primaria e l'herpes zoster dopo la riattivazione del virus latente quiescente nei gangli delle radici dorsali. Mentre le infezioni da VZV sono normalmente lievi, a volte evolvono in gravi malattie, soprattutto nei pazienti immunocompromessi, nei soggetti affetti da HIV e nei trapiantati.
L'epidemiologia dell'infezione da VZV primaria varia geograficamente; nei climi temperati, il VZV infetta oltre il 90% dei bambini durante il primo decennio di vita, mentre nei paesi tropicali l'infezione primaria spesso ricorre in età adulta.
Il genoma del VZV è una molecola di DNA lineare a doppio filamento e codifica per almeno 69 geni unici, 3 dei quali sono presenti in due copie. Ampie porzioni di genoma presentano un'omologia considerevole con i genomi dell'HSV-1 e dell'HSV-Molti geni sono ben conservati (hanno struttura e funzione simile) tra gli herpes virus di tipo alfa.
Per la terapia dell'infezione da VZV o della riattivazione del VZV, il trattamento di elezione consiste nell'uso di aciclovir per endovena o di valaciclovir orale.
La PCR real-time che utilizza il sangue periferico è uno strumento diagnostico efficace per la determinazione e la quantificazione della replicazione attiva del VZV, soprattutto nei pazienti trapiantati.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit VZVDNAQT.CE si basa su una chimica real-time che utilizza primer e probe specifici.
Il **DNA** del **VZV,** 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 con reporter a colorante fluorescente specifico per una sequenza genomica unica del VZV.
Un controllo interno (IC) eterologo funge da controllo dell'amplificazione per ogni campione trattato singolarmente, con l'obiettivo di identificare eventuali inibitori della reazione.
Una curva standard è fornita per permettere la determinazione della carica virale.

D. COMPONENTI

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

Componente	Contenuto	VZVDNAQT.CE 50 reazioni
A **CODIFICATO:ALL/MM-4** **CODICE COLORE: TRASPARENTE**	Master mix	N°1 provette/0,825 ml
B **CODIFICATO: VZV/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 ($1.5x10^5$ copie/µl) **CODIFICATO: VZV/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 2. Componente B 3. Componente C 4. NTC 6. IC 7. STD 8. Foglietto illustrativo	n°1provetta/0,4ml n°1 provetta n°2 provetta/1,5 ml n°1 provetta/1,5 ml n°1 provetta n°3 provetta n° 1	n°2 provette/0,825ml n°4 provette n°4 provette/1,5 ml n°1 provetta/1,5 ml n°4 provette n°4 provette n° 1	n°3provette/0,825ml n°6 provette n°6 provette/1,5 ml n°1 provetta/1,5 ml n°6 provette n°6 provette n° 1
Numero di test	**25**	**100**	**150**
Codice	**VZVDNAQT.CE.25**	**VZVDNAQT.CE.100**	**VZVDNAQT.CE.150**

E. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Il kit codificato VZVDNAQT.CE deve essere conservato a +2…8 °C.
Una volta risospeso il **Componente B** (codice VZV/CB e il **Componente IC** (codice ALL/IC) sono stabili 3 mesi a -20°C. Una volta risospeso il componente STD (codice VZV/STD) è stabile 2 settimane a -20°C. Il componente STD conservato a -

20°C per un tempo≤ 15 giorni può essere utilizzato solo in associazione con il Componete B e ALL/IC conservato a -20°C per un tempo≤ 30 giorni.
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, 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 sangue deve essere prelevato da una vena in asepsi, mentre il plasma (o il siero) deve essere preparato utilizzando le tecniche standard per il trattamento dei campioni per analisi cliniche di laboratorio.
2. Il liquido cerebrospinale deve essere 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. Quando il kit è usato per lo screening delle unità di sangue si raccomanda fortemente l'etichettatura con codice a barre e la lettura elettronica.
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 utilizzato immediatamente, il plasma deve essere aliquotato e conservato 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.
8. I campioni di plasma per estrazione del DNA 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.
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 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:
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).
- Vortexare brevemente
- Preparare le 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 150000 copie/µl**	Aggiungere il volume del componente C (codice: ALL/C) come indicato sull'etichetta della provetta
STD 1	**15000 copie/ µl**	10 µl (STD) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
STD 2	**1500 copie/µl**	10 µl (STD 1) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
STD 3	**150 copie/µl**	10 µl (STD 2) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
STD 4	**15 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 VZVDNAQT.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 VZVDNAQT.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.
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 fuoruscita 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 di seguito riportate.

N.1 Estrazione del DNA

L’estrazione del DNA genomico del VZV 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	100
QIAamp DNA mini kit	200	100
NA Body Fluid Kit	200	100

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 VZVDNAQT.CE *può essere usato nella procedura d’isolamento 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 5 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 5 µl di IC alla miscela del tampone di lisi e campione) e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione (Protocollo per il Plasma).

N.2 Impostazione della reazione

Il kit **VZVDNAQT.CE** è destinato all’uso esclusivamente in combinazione con ABI 7500 standard (Software SDS versione 1.3.1, Applied Biosystem) e MX3000P (Software MxPro versione 4.01, Stratagene) e CFX96 software CFX manager versione 1.7 (Biorad).

N.2.1 Preparazione della PCR

Importante: *Nel paragrafo O è riportato un esempio di schema di dispensazione da 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 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 tot.		**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 lo scioglimento nel componente C (codice: ALL/C) rimangono stabili per non più di 3 ore se conservati su ghiaccio o a una temperatura compresa tra 2°C e 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 Mx3000P impostare "Filter set gain settings": 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 e BioRad CFX96), scegliere i fluorofori indicati nella tabella riportata qui sotto:

Determinazione	Reporter	Quencher
VZV	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 il profilo termico corretto, 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** 15000 copie/µl	Campione 4	
B	**STD 2** 1500 copie/µl	Campione 5	
C	**STD 3** 150 copie/µl	Campione 6	
D	**STD 4** 15 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 del VZV, 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** ***Nota importante: non usare l’algoritmo Mx4000 da v1.00 a v3.00***
BIORAD™ CFX96®	**Auto Calculated Baseline**

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

“Threshold” di fluorescenza FAM	
ABI™PRISM® 7500 SDS	**0.1**
STRATAGENE™ MX3000P®	**0.15**
BIORAD™ CFX96®	**300**

“Threshold” di fluorescenza JOE/VIC	
ABI™PRISM® 7500 SDS	**0.1**
STRATAGENE™ MX3000P®	**0.02**
BIORAD™ CFX96®	**200**

P.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sul calibratore STD 1 ogni volta che il kit viene usato per verificare se il suo valore Ct è quello previsto e riportato nella tabella seguente.

ABI™PRISM® 7500 SDS/ STRATAGENE™ MX3000P®	
Controllo FAM	**Requisiti**
STD 1	19.5 < Ct (Threshold Cycle) < 22

BIORAD™ CFX96®	
Controllo FAM	**Requisiti**
STD 1	20 < Ct (Threshold Cycle) < 22.5

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
Efficienza	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 del controllo interno convalidino la determinazione del VZV come descritto nella tabella seguente:

VZV 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 del VZV superiore a 10000 copies/µl (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO 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.

Per ogni campione positivo determinato mediante il kit VZVDNAQT.CE, è possibile applicare una quantificazione corretta del carico virale in un intervallo da 1.5E+08 to 1.0 E+00 copies/ul su ABI 7500, BioRad CFX96 e MX3000P Stratagene, pertanto il carico virale del VZV deve essere espresso come indicato nella tabella seguente:

ABI™PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®- BIORAD™ CFX96®	
Dati campione della sessione di analisi per il VZV (copie/µl)	**Carico virale del VZV (copie/µl)**
Quantità > 1.5E+08	Carico virale del VZV > 1.5E+08
1.0E+00 ≤ Qtà ≤ 1.5E+08	***QUANTIFICAZIONE***
Quantità < 1.0E+00	Carico virale del VZV < 1.0 E+00

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

I risultati ottenuti con il kit VZVDNA.CE devono essere interpretati dal responsabile di laboratorio, tenendo in considerazione i sintomi clinici dei pazienti e gli altri marker d’infezione del laboratorio
Sono possibili i seguenti risultati:

Tabella di risoluzione dei problemi

	FAM	**JOE/ VIC**	**Risultato**	**CONTROLLO**
CAMPIONE sconosciuto	+	+/-	RISULTATO CORRETTO *Positivo*	***IMPORTANTE***: Una concentrazione del DNA del VZV superiore a 10000 copies/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 funziona-mento 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 del VZV 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 *Negativo*	
STD	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	***IMPORTANTE***: 1. Una concentrazione del DNA del VZV superiore a 10000 copies/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 del VZV 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 del VZV 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 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 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 vengono trattati come campioni dei pazienti e si utilizza lo stesso volume,10µl, usato durante la fase di amplificazione.
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:

$$\text{Risultati (copie/ml)} \equiv \frac{\text{copie/µl (dati sessione di analisi) x vol campione di eluizione (µl)}}{\text{Volume di estrazione dei campioni (ml)}}$$

Esempio:

$$\text{Risultati (copie/ml)} \equiv \frac{1500 \times 100}{0.2}$$

Risultati (copie/ml) ≡ 7,5 E+05

S. PERFORMANCE

La valutazione delle prestazioni è stata effettuata in accordo con quanto riportato 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 espressa 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 ≥ 95% dei campioni in condizioni di laboratorio di routine).
Nel kit VZVDNAQT.CE, il limite quantitativo **LOD** è stato determinato mediante analisi di 24 replicati (8 replicati in tre run diversi), della diluizione massima dell'analita che può essere rilevata nel 100% di essi.

I risultati sono i seguenti:

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

Questo significa che sussiste una probabilità del 100% di rilevare una concentrazione di 5.0E-01 copie/µl con gli strumenti di cui sopra.

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 analista, con esattezza e precisione accettabili.
I limiti del range dinamico sono i limiti di quantificazione inferiore e superiore **(Limite di quantificazione).**
Per il kit VZVDNAQT.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).
Sugli strumenti ABI 7500, Mx3000P e BIORAD™ CFX96® Il **limite di quantificazione superiore** è di 8,17$\log_{10}$ (1.5E+08 copie/µl), mentre il **limite di quantificazione inferiore** è di 0,00$\log_{10}$ (1,0E+00 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 del VZV 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 bersaglio del genoma sono stati controllati con il software "BLAST" , per verificare se qualcuna delle sequenze di nucleotidi depositate nelle banche dei genomi in tutto il mondo presenti qualche omologia con VZV, e con il software "ClustalX", per confrontare le sequenze bersaglio del genoma dei diversi genotipi del VZV.
3. La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
4. Sono stati analizzati campioni di pazienti con infezioni dovute a organismi potenzialmente interferenti, ottenuti da un centro medico di riferimento.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	Risultato
CMV	negativo
HHV8	negativo
EBV	negativo
HHV6	negativo
HSV1	negativo
HSV2	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 negativi per il DNA del VZV.

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

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

S.3.2 Sensibilità diagnostica

La **sensibilità diagnostica** è la probabilità che il dispositivo dia 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 VZVDNAQT.CE, questo parametro è stato studiato analizzando 23 campioni di plasma positivi per il DNA del VZV in duplicato nello stessa sessione. Inoltre, sono stati testati anche campioni del pannello QCMD 2008 (VZVDNA08) e QCMD 2009 (VZV09).
Successivamente, è stata calcolata la percentuale (%) di campioni positivi.

VERI POSITIVI	23
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	23
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 VZVDNAQT.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. 4 punti di diluizione 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 stabiliti, abbiamo identificato il valore di accettabilità seguente per il kit VZVDNAQT.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 attentamente e comprendere l'inserto 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 del VZV.
La determinazione del DNA del VZV nel campione di un paziente ha vaste 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. Clinical relevance of quantitative varicella-zoster virus (VZV) DNA detection in plasma after stem cell transplantation. Kalpoe JS, Kroes ACM, Verkerk S, Claas ECJ, Barge RMY and Beersma. Bone Marrow Transplantation 2006; 38: 41-46.
2. Quantitation of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus genomes in human trigeminal ganglia. Pevenstein SR, Williams RK, Mcchesney D, Mont EK, Smialek JE, and Straus SE. J of Virology Dec.1999, 10514-10518.
3. Distribution of varicella-zoster (VZV) wild-type genotypes in northern and southern Europe: Evidence for high conservation of circulating genotypes. Loparev VN, Rubtcova EN, Bostik V, Tzaneva V, Sauerbrei A, Robo A, Sattler-Dornbacher E, Hanovcova I, Stepanova V, Splino M, Eremin V, Koskiniemi M, Vankova OE, Scott Schmid D.Virology 2009, 383: 216-225.
4. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. Davison AJ and Scott JE. J Gen Virol 1986, 67: 1759-1816.
5. Retrospective analysis of varicella zoster virus (VZV) copy DNA numbers in plasma of immunocompetent patients with herpes zoster, of immunocompromised patients with disseminated VZV disease, and of asymptomatic solid organ transplant recipients. Kronenberg A, Bossart W, Wuthrich RP, Cao C, Lautenschlager S, Wiegand ND, Mullhaupt B, Noll G, Mueller NJ, Speck RF. Transpl Infect Dis 2005: 7: 116-121.

5. Simboli

LEGENDA			
REF	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
IVD	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
LOT	Numero di lotto		Fabbricante
	Data di scadenza		Numero di test
CE	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

100% MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified

CE