

Ottobre 2015

# Manuale del *artus*<sup>®</sup> HAdV RG PCR Kit



Versione 1  
Per l'uso con strumenti Rotor-Gene<sup>®</sup> Q

IVD

CE

REF

4530265



altona Diagnostics GmbH,  
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, GERMANIA

R1 MAT

1096380-IT

Distribuito da QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

# Indice

Uso previsto .....	4
Sommario e spiegazioni.....	4
Informazioni sull'agente patogeno.....	4
Principio della metodica .....	6
Materiali in dotazione.....	7
Contenuto del kit.....	7
Materiali necessari ma non in dotazione.....	7
Avvertenze e precauzioni .....	8
Avvertenze .....	8
Precauzioni .....	9
Conservazione e manipolazione dei reagenti .....	10
Componenti del kit .....	10
Procedura .....	11
Estrazione del DNA.....	11
Protocollo: Rilevazione del DNA HAdV-specifico.....	13
Interpretazione dei risultati.....	24
Validità del processo .....	24
Analisi qualitativa.....	25
Analisi quantitativa.....	26
Limiti della metodica .....	28
Controllo di qualità.....	28

---

Caratteristiche delle prestazioni.....	29
Sensibilità analitica .....	31
Specificità analitica .....	32
Range lineare .....	34
Precisione.....	34
Valutazione diagnostica.....	36
Ripetibilità .....	37
Simboli.....	39
Guida alla risoluzione dei problemi.....	40
Informazioni per gli ordini .....	41

---

## Uso previsto

Il kit *artus*<sup>®</sup> HAdV RG PCR (96) è un test diagnostico *in vitro*, che si basa sulla tecnologia real-time PCR per la rilevazione e la quantificazione del DNA specifico dell'adenovirus umano (HAdV).

## Sommario e spiegazioni

Il kit *artus* HAdV RG PCR è un sistema pronto all'uso per la rilevazione del DNA HAdV-specifico tramite la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (real-time PCR) su strumenti Rotor-Gene Q. Il test include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per verificare una possibile inibizione della PCR e confermare l'integrità dei reagenti del kit.

### Informazioni sull'agente patogeno

Gli adenovirus umani (HAdV), isolati per la prima volta negli anni '50 da tessuto adenoide espuntato, sono virus a DNA a doppio filamento privi di envelope della famiglia degli *Adenoviridae*, appartenenti al genere *Mastadenovirus*. Hanno una distribuzione mondiale e le infezioni causate da questi virus non presentano un andamento stagionale.

Gli HAdV sono classificati in 7 specie A–G. La specie B è suddivisa a sua volta nelle sottospecie B1 e B2. Fino ad oggi sono stati descritti almeno 56 diversi sierotipi (da HAdV-1 a HAdV-56). Gli adenovirus causano un ampio spettro di malattie, fra cui raffreddori, faringite, bronchite, polmonite, diarrea, congiuntivite (infezione agli occhi), febbre, cistite (infiammazione o infezione della vescica), eruzioni cutanee e malattie neurologiche.

---

I sintomi delle malattie causate da una determinata specie di adenovirus dipendono dal tropismo tissutale preferito del virus. Ad esempio, le malattie respiratorie sono spesso causate dalle specie B1, C o E, le malattie oculari dalle specie B, D o E, la gastroenterite è scatenata generalmente dalle specie A, F o G, mentre le infezioni renali e urinarie sono spesso riconducibili a HAdV della specie B2.

Le caratteristiche epidemiologiche degli adenovirus variano in base alla specie. Mentre alcuni adenovirus umani sono endemici in alcune parti del mondo e l'infezione viene normalmente contratta durante l'infanzia, altre specie causano infezioni sporadiche ed epidemie occasionali. Tutti gli HAdV si trasmettono per contatto diretto, trasmissione fecale-orale e occasionalmente attraverso l'acqua.

Le infezioni da HAdV sono per la maggior parte autolimitanti, mentre sporadicamente si sono verificate gravi polmoniti in soggetti altrimenti sani. Inoltre, alcune specie possono causare infezioni asintomatiche persistenti delle tonsille, delle adenoidi e dell'intestino degli ospiti infettati, tanto che la diffusione del virus si protrae per mesi o anni. La riattivazione di infezioni latenti in ospiti immunodepressi, ad esempio nei destinatari di trapianto, può scatenare malattie disseminate potenzialmente letali.

Gli HAdV sono molto resistenti a varie condizioni ambientali ed estremamente contagiosi, quindi è possibile che in mancanza di un accurato controllo delle infezioni e di buone pratiche di igiene si diffondano facilmente epidemie nosocomiali di malattie associate ad adenovirus, quali cheratocongiuntivite epidemica. In alcuni paesi è obbligatoria la segnalazione a livello governativo locale per alcuni casi di epidemia da HAdV.

---

## Principio della metodica

L'HAdV RG Master A e l'HAdV RG Master B contengono reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di regioni bersaglio nel genoma dell'HAdV e per la rilevazione diretta dell'amplicone specifico nel canale di fluorescenza Cycling Green (ciclo verde) degli strumenti Rotor-Gene Q.

Il kit *artus* HAdV RG PCR contiene inoltre un sistema di amplificazione eterologa per identificare potenziali errori durante l'analisi. Tale inibizione viene rilevata come controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow (ciclo giallo) degli strumenti Rotor-Gene Q.

Le sonde specifiche per il DNA dell'HAdV sono legate al fluorocromo FAM™. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è legata al fluorocromo JOE™. L'impiego di sonde legate a fluorocromi spettralmente distinguibili consente la rilevazione e la quantificazione simultanea del DNA dell'HAdV, nonché la rilevazione del controllo interno nei rispettivi canali dello strumento Rotor-Gene Q.

# Materiali in dotazione

## Contenuto del kit

<b>artus HAdV RG PCR Kit</b>		<b>(96)</b>
<b>Numero di catalogo</b>		<b>4530265</b>
<b>N° di reazioni</b>		<b>96</b>
Blu	HAdV RG Master A	8 x 60 µl
Viola	HAdV RG Master B	8 x 180 µl
Verde	HAdV RG IC	1 x 1.000 µl
Rosso	HAdV QS*	4 x 250 µl
Bianco	H <sub>2</sub> O	1 x 500 µl
	Manuale	1

\*Il kit *artus* HAdV RG PCR Kit contiene 4 standard di quantificazione (QS1–QS4).

## Materiali necessari ma non in dotazione

Prima dell'uso, assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

### Reagenti

- QIAamp DNA Mini Kit (kit QIAamp DNA Mini) (QIAGEN cat. n. 51304 o 51306; vedere "Estrazione del DNA", pag. 11)

### Materiali di consumo

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, for use with 72-well rotor (provette e tappi per strisce, 0,1 ml, da usare con rotore a 72 pozzetti) (QIAGEN, cat. n. 981103 o 981106)

- Provette per microcentrifuga a basso legame di DNA e prive di nucleasi per preparare miscele master
- Puntali per pipette privi di nucleasi con filtro

## Attrezzatura

- Strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex o Rotor-Gene Q 6plex
- Software Rotor-Gene Q versione 2.3.1 o superiore
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminum block for manual reaction setup (blocco di caricamento con 72 provette da 0,1 ml, blocco di alluminio per setup manuale della reazione) (QIAGEN, cat. n. 9018901)
- Pipette regolabili dedicate per la preparazione dei campioni
- Pipette regolabili dedicate per la preparazione della miscela master per PCR
- Pipette regolabili dedicate per la dispensazione del DNA stampo
- Agitatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml

## Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il test.

### Avvertenze

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione.

## Precauzioni

- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle tecniche real-time PCR e alle procedure della diagnostica *in vitro*.
- I campioni devono sempre essere trattati come se fossero infettivi e/o biologicamente pericolosi in accordo con procedure di laboratorio sicure.
- Mentre si maneggiano i campioni, indossare guanti di protezione monouso non talcati, camice da laboratorio e una protezione per gli occhi.
- Evitare qualsiasi contaminazione da microbi e nucleasi (DNasi/RNasi) del campione e dei componenti del kit.
- Usare sempre puntali per pipette monouso non contaminati da DNasi/RNasi con filtro.
- Mentre si maneggiamo i componenti del kit, indossare sempre guanti di protezione monouso non talcati.
- Usare aree di lavoro separate e isolate per la preparazione dei campioni, il setup della reazione e le operazioni di amplificazione/rilevazione. Il flusso di lavoro in laboratorio deve sempre procedere in modo unidirezionale. Indossare sempre guanti monouso in ogni area e sostituirli prima di entrare in un'area diversa.
- Destinare forniture e apparecchiature ad aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.
- Non aprire le provette/piastre di reazione dopo l'amplificazione per evitare la contaminazione con ampliconi.
- È possibile utilizzare ulteriori controlli in base alle linee guida o ai requisiti normativi locali, statali e/o federali o di enti di certificazione.
- Non utilizzare componenti del kit la cui data di scadenza sia stata superata.
- Smaltire i campioni e i materiali di scarto secondo le disposizioni locali in materia di sicurezza.

# Conservazione e manipolazione dei reagenti

## Componenti del kit

Il kit *artus* HAdV RG PCR viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento del ricevimento o se le provette sono state compromesse durante la spedizione, contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN. Al ricevimento, conservare tutti i componenti del kit ad una temperatura fra  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti dei reagenti master (più di due volte), perché ciò potrebbe ridurre le prestazioni del test. Congelare i reagenti in aliquote, se si prevede un uso intermittente. Non conservare i reagenti a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  per più di 2 ore. Tenere l'HAdV RG Master A e l'HAdV RG Master B al riparo dalla luce.

Il kit *artus* HAdV RG PCR include:

- Due reagenti master (HAdV RG Master A e HAdV RG Master B)
- Stampo del controllo interno (HAdV RG IC)
- Quattro standard di quantificazione (HAdV QS1–4)
- Acqua grado PCR ( $\text{H}_2\text{O}$ )

L'HAdV RG Master A e l'HAdV RG Master B contengono tutti i componenti (tampone, enzimi, primer e sonde) per consentire l'amplificazione e la rilevazione del DNA HAdV-specifico e del controllo interno in un'unica reazione.

Gli standard di quantificazione contengono concentrazioni standardizzate di DNA HAdV-specifico. Questi standard possono essere utilizzati singolarmente come controlli positivi oppure insieme per generare una curva standard, che può essere utilizzata per stabilire la concentrazione di DNA HAdV-specifico nel campione. Le concentrazioni degli standard di quantificazione sono riportate nella Tabella 1.

**Tabella 1. Concentrazione degli standard di quantificazione**

Standard di quantificazione	Concentrazione (copie/ $\mu$ l)
QS1	10.000
QS2	1.000
QS3	100
QS4	10

## Procedura

### Estrazione del DNA

Le sequenze bersaglio specifiche dell'HAdV vengono amplificate dal DNA. Le prestazioni del test dipendono dalla qualità del DNA stampo, pertanto si raccomanda di utilizzare un kit per la preparazione dei campioni che consenta di ottenere DNA idoneo per la PCR a valle.

Il kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, cat. n. 51304 o 51306) è raccomandato per l'estrazione del DNA da usare con il kit *artus* HAdV RG PCR. Effettuare l'estrazione del DNA seguendo le istruzioni del manuale del kit QIAamp DNA Mini (*QIAamp DNA Mini Handbook*).

Poiché i tamponi di lavaggio del kit QIAamp DNA Mini contengono etanolo, eseguire un'ulteriore fase di centrifugazione prima dell'eluizione. Posizionare la colonna QIAamp Mini in una provetta per prelievo da 2 ml nuova ed eliminare la vecchia provetta contenente il filtrato. Centrifugare per 10 minuti a 17.000 x g (~13.000 giri/min) in una centrifuga da banco.

---

**Importante:** L'utilizzo di carrier RNA è determinante per l'efficienza dell'estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.

**Importante:** L'etanolo è un forte inibitore della real-time PCR. Se il kit per la preparazione dei campioni fa uso di tamponi di lavaggio contenenti etanolo, occorre accertarsi di eliminare ogni traccia di etanolo prima di procedere all'eluizione dell'acido nucleico.

### Controllo interno

Il kit *artus* HAdV RG PCR contiene un controllo interno eterologo, che può essere usato o come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo della procedura di preparazione dei campioni (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo dell'inibizione della PCR.

Se il controllo interno è utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione dei campioni, aggiungere il controllo interno direttamente alla miscela di HAdV RG Master A e HAdV RG Master B, come descritto nella fase 2b del protocollo (pag. 14).

Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, il controllo interno non deve essere aggiunto direttamente al campione. Il controllo interno deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume di controllo interno da aggiungere alla miscela campione/tampone di lisi dipende esclusivamente dal volume di eluizione ed è pari precisamente al 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se si utilizza il kit QIAamp DNA Mini, il DNA viene eluito in 60 µl di tampone AE. Aggiungere quindi 6 µl di controllo interno alla miscela campione/tampone di lisi di ogni campione.

**Importante:** Non aggiungere il controllo interno e il carrier RNA direttamente al campione.

## Protocollo: Rilevazione del DNA HAdV-specifico

### Punti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere "Precauzioni", pag. 9.
- Dedicare il tempo necessario ad acquisire familiarità con il Rotor-Gene Q prima di avviare il protocollo. Fare riferimento al manuale utente dello strumento.
- Accertarsi che in ogni PCR siano inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo (acqua grado PCR).

### Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Verificare che il blocco di raffreddamento (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia stato preraffreddato a 2–8°C.
- Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli ripetutamente su e giù o agitandoli rapidamente su vortex) e centrifugati brevemente.

### Procedura

1. Inserire il numero desiderato di provette per PCR negli adattatori del blocco di raffreddamento.
2. Se si usa il controllo interno per controllare la procedura di estrazione del DNA e per verificare la possibile inibizione della PCR, seguire la fase 2a. Se si usa il controllo interno esclusivamente per controllare l'inibizione della PCR, seguire la fase 2b.  
Utilizzare il controllo interno secondo la fase 2b per tutti i campioni, i controlli e gli standard di quantificazione da analizzare.  
2a. Il controllo interno è già stato aggiunto all'estrazione (vedere "Controllo interno", pag. 12). In questo caso, preparare una miscela master secondo la Tabella 2. La miscela di reazione contiene tipicamente tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

**Tabella 2. Preparazione della miscela master (controllo interno usato per controllare l'estrazione del DNA e verificare l'inibizione della PCR)**

<b>Componente</b>	<b>1 reazione</b>	<b>12 reazioni</b>
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
<b>Volume totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

2b. Il controllo interno deve essere aggiunto direttamente alla miscela di HAdV RG Master A e HAdV RG Master B. In questo caso preparare una miscela master secondo la Tabella 3.

La miscela di reazione contiene tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

**Tabella 3. Preparazione della miscela master (controllo interno usato esclusivamente per verificare l'inibizione della PCR)**

<b>Componente</b>	<b>1 reazione</b>	<b>12 reazioni</b>
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
HAdV RG IC	1 µl	12 µl
<b>Volume totale</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>

\* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del controllo interno durante la preparazione della PCR è irrilevante. La sensibilità del sistema di rilevazione non viene influenzata.

3. Pipettare 20 µl della miscela master in ogni provetta per PCR. Aggiungere poi 10 µl del campione eluito di DNA e miscelare bene pipettando ripetutamente su e giù. Analogamente, aggiungere 10 µl di un controllo positivo o dello standard di quantificazione oppure 10 µl di acqua (acqua grado PCR) come controllo negativo. Accertarsi che in ogni processo siano inclusi almeno un controllo positivo e un controllo negativo. Per la quantificazione utilizzare tutti i 4 standard di quantificazione (QS1–QS4).

4. Chiudere le provette per PCR. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia applicato sopra il rotore.
5. Per rilevare il DNA HAdV-specifico creare un profilo termico come di seguito descritto.

<b>Impostazione dei parametri generali del test</b>	<b>Figure 1, 2, 3, 4</b>
<b>Attivazione iniziale dell'enzima hot-start</b>	<b>Figura 5</b>
<b>Amplificazione del DNA</b>	<b>Figura 6</b>
<b>Regolazione della sensibilità del canale di fluorescenza</b>	<b>Figura 7</b>
<b>Avvio del processo</b>	<b>Figura 8</b>

Tutte le specifiche sono relative al software del Rotor-Gene Q versione 2.3.1 e superiore. Per ulteriori informazioni sulla programmazione degli strumenti Rotor-Gene Q consultare il relativo manuale utente. Nelle illustrazioni queste impostazioni sono evidenziate da un riquadro nero in grassetto.

6. In primo luogo, aprire la finestra di dialogo **New Run Wizard** (Procedura guidata nuovo processo) con la versione **Advanced** (Avanzata) e selezionare **Two Step** (Due fasi) (Figura 1). Cliccare su **Next** (Avanti) per continuare.

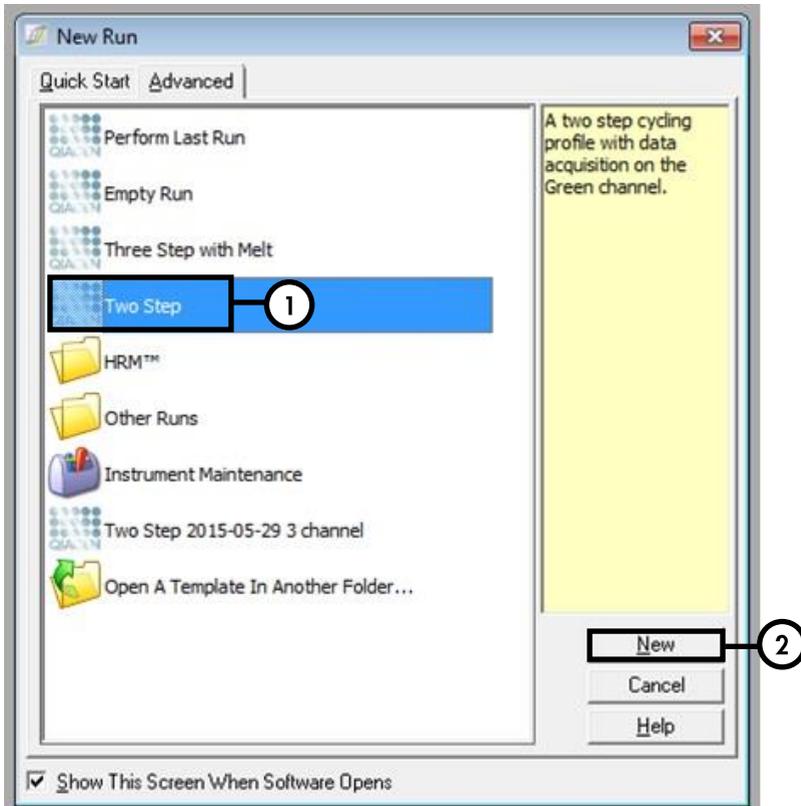


Figura 1. Finestra di dialogo “New Run Wizard”.

7. Nella successiva finestra di dialogo **New Run Wizard** (Figura 2) selezionare la casella **Locking Ring Attached** (Anello di bloccaggio applicato) e cliccare su **Next**.

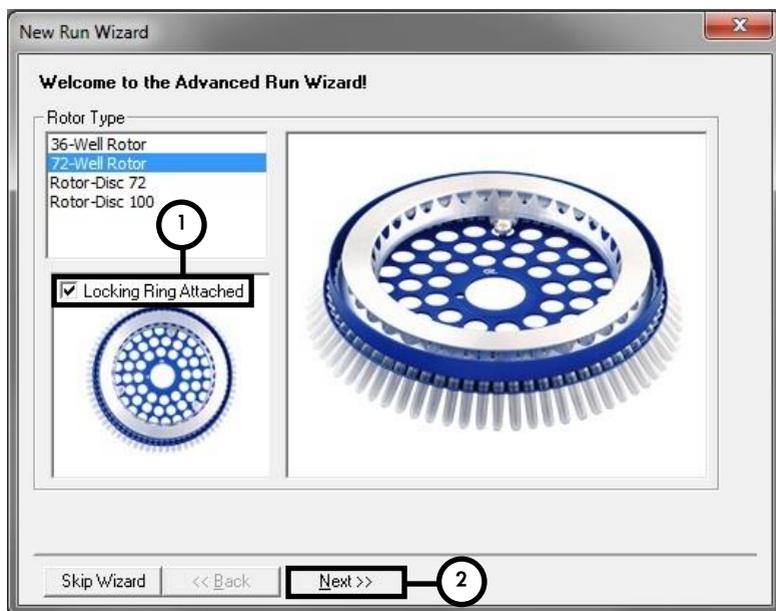


Figura 2. Finestra di dialogo "New Run Wizard".

8. Selezionare **30** per il volume della reazione PCR e cliccare su **Next** (Figura 3).

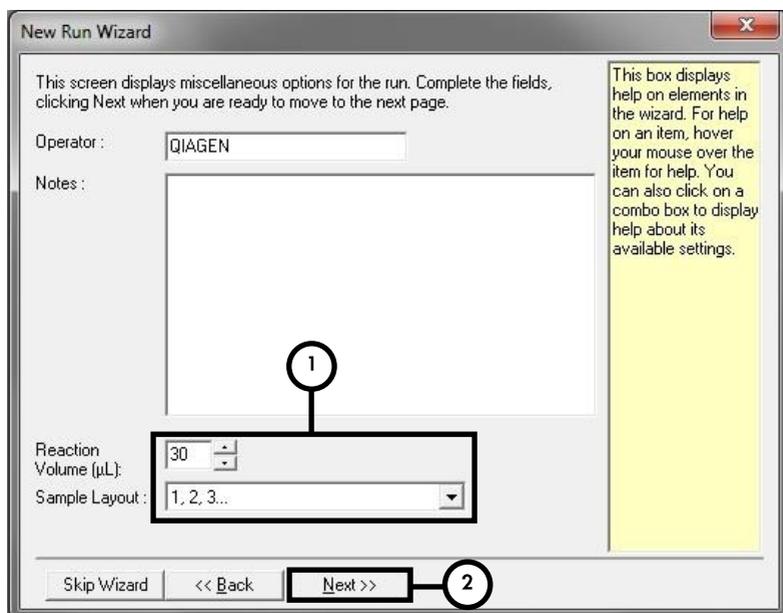


Figura 3. Impostazione dei parametri generali del test.

9. Cliccare sul pulsante **Edit Profile** (Modifica profilo) nella successiva finestra di dialogo **New Run Wizard** (Figura 4) e programmare il profilo termico, come illustrato nelle Figure 5–6.

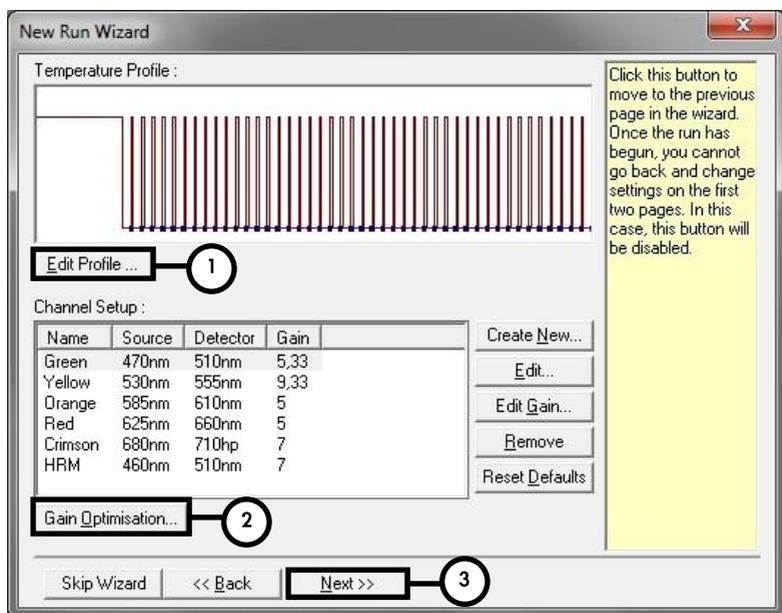


Figura 4. Modifica del profilo.

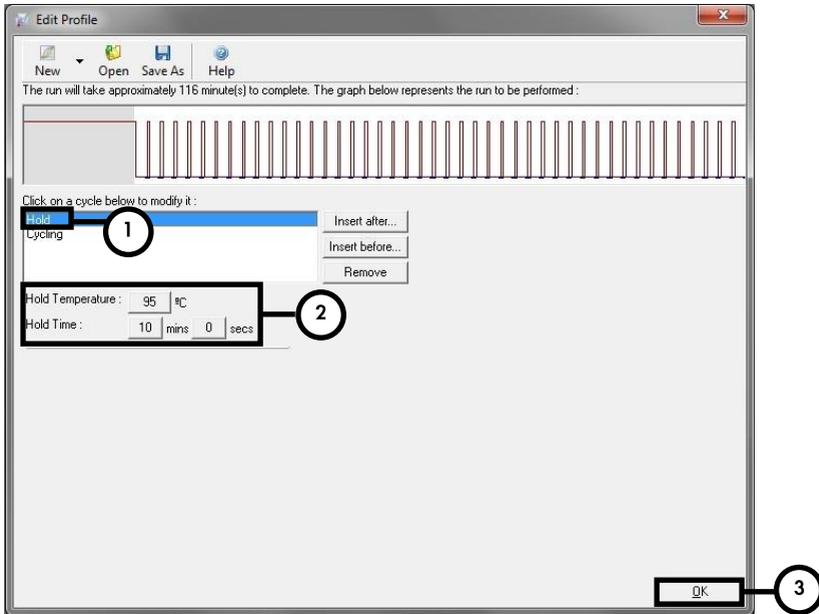


Figura 5. Attivazione iniziale dell'enzima hot-start.

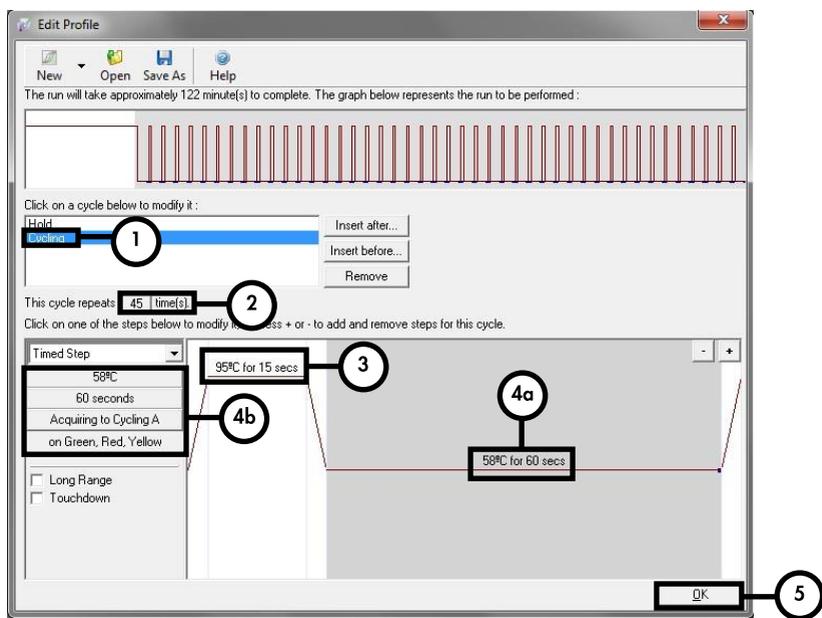


Figura 6. Amplificazione del DNA.

10. Il range di rilevazione dei canali di fluorescenza deve essere determinato in base all'intensità della fluorescenza nelle provette per PCR. Cliccare su **Gain Optimisation** (Ottimizzazione gain) nella finestra di dialogo **New Run Wizard** (vedere Figura 4, fase 2) per aprire la finestra di dialogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (Setup ottimizzazione auto-gain) (Figura 7). Selezionare la casella **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Esegui ottimizzazione prima della 1° acquisizione) (Figura 7). Accertarsi che siano stati selezionati entrambi i canali (Green e Yellow) per l'operazione **Auto-Gain Optimisation** (Figura 7). (Trovare i canali nel menu a tendina sotto **Channel Settings** (Impostazioni canali) e cliccare su **Add** (Aggiungi).) Cliccare su **Close** (Chiudi) nella finestra di dialogo **Auto-Gain Optimisation Setup** una volta completata la calibrazione del gain.

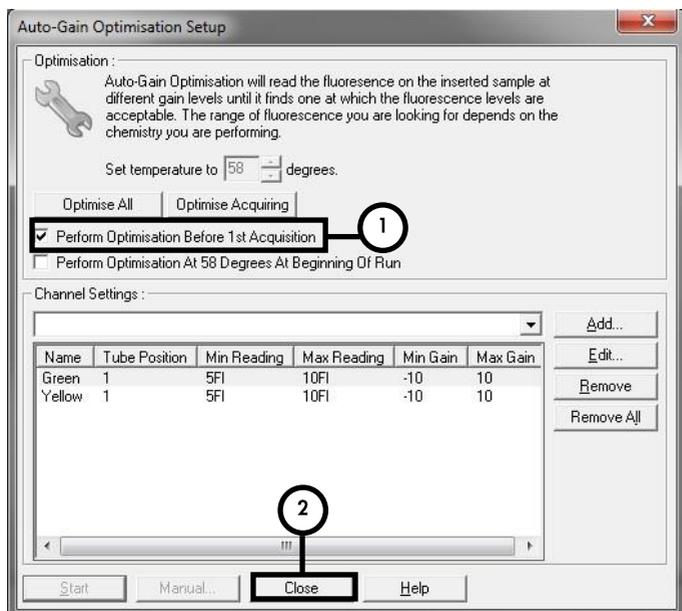


Figura 7. Regolazione della sensibilità dei canali di fluorescenza.

11. I valori del gain determinati con la calibrazione dei canali sono salvati automaticamente e sono elencati nell'ultima finestra del menu della procedura di programmazione (Figura 8). Cliccare su **Start Run** (Avvio processo).

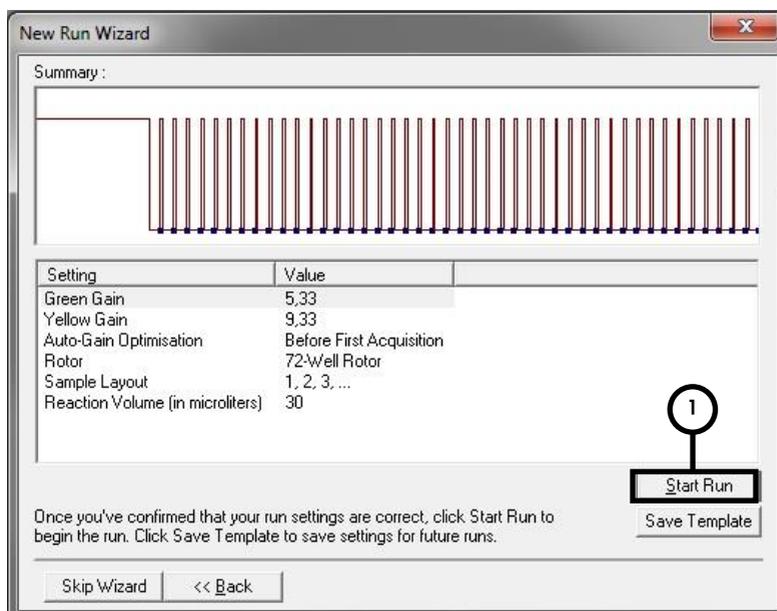


Figura 8. Avvio del processo.

12. Terminato il processo, analizzare i dati (vedere "Interpretazione dei risultati", pag. 24).

# Interpretazione dei risultati

## Validità del processo

### Processo qualitativo valido

Devono essere soddisfatte le seguenti condizioni di controllo affinché un processo qualitativo sia valido (Tabella 4).

**Tabella 4. Condizioni di controllo per un processo qualitativo valido**

ID controllo	Canale di rilevazione	
	Cycling Green	Cycling Yellow
Controllo positivo (QS)	POSITIVO	POSITIVO
Controllo negativo	NEGATIVO	POSITIVO

### Processo qualitativo non valido

Un processo qualitativo non è valido se il processo non è stato completato oppure se le condizioni di controllo per un processo qualitativo valido non sono state soddisfatte.

In caso di processo qualitativo non valido, ripetere la PCR o estrarre di nuovo il DNA dai campioni originali se non è rimasto DNA.

### Processo quantitativo valido

Un processo quantitativo è valido se tutte le condizioni di controllo per un processo qualitativo valido sono state soddisfatte (vedere la Tabella 4 sopra riportata). Inoltre, per risultati di quantificazione precisi deve essere generata una curva standard valida. Affinché il processo quantitativo sia valido, la curva standard deve avere i seguenti valori dei parametri di controllo (Tabella 5).

**Tabella 5. Parametri di controllo per una curva standard valida**

<b>Parametro di controllo</b>	<b>Valore valido</b>
Pendenza	-3,743/-2,765
Efficienza della PCR	85%/130%
R al quadrato (R <sup>2</sup> )	>0,98

#### Processo quantitativo non valido

Un processo quantitativo non è valido se il processo non è stato completato oppure se le condizioni di controllo per un processo quantitativo valido non sono state soddisfatte.

In caso di processo quantitativo non valido, ripetere la PCR o estrarre di nuovo il DNA dai campioni originali se non è rimasto DNA.

#### Analisi qualitativa

Un riepilogo dell'interpretazione dei risultati è riportato nella Tabella 6.

**Tabella 6. Riepilogo dell'interpretazione dei risultati**

ID campione	Canale di rilevazione		Interpretazione dei risultati
	Cycling Green	Cycling Yellow	
A	POSITIVO	POSITIVO*	DNA HAdV-specifico rilevato.
B	NEGATIVO	POSITIVO	DNA HAdV-specifico non rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA HAdV-specifico.
C	NEGATIVO	NEGATIVO	Inibizione PCR o errore del reagente. Ripetere la procedura utilizzando il campione originale o raccogliere e analizzare un nuovo campione.

\* La rilevazione del controllo interno nel canale Cycling Yellow non è richiesta per risultati positivi nel canale Cycling Green. Un'alta carica di HAdV nel campione può portare a una riduzione o assenza dei segnali del controllo interno.

## Analisi quantitativa

Il kit *artus* HAdV RG PCR contiene 4 standard di quantificazione (QS). Per generare una curva standard per l'analisi quantitativa dei dati occorre definire gli standard di quantificazione con le corrispondenti concentrazioni (vedere la Tabella 1, pag. 11). Per generare una curva standard per l'analisi quantitativa occorre utilizzare standard con concentrazioni note.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- $C_T$  = ciclo soglia
- $m$  = pendenza
- $N_0$  = concentrazione iniziale
- $b$  = intercetta

Le concentrazioni di campioni positivi di concentrazione sconosciuta possono essere desunte dalla curva standard (Figura 9).

$$N_0 = 10^{(C_T - b)/m}$$

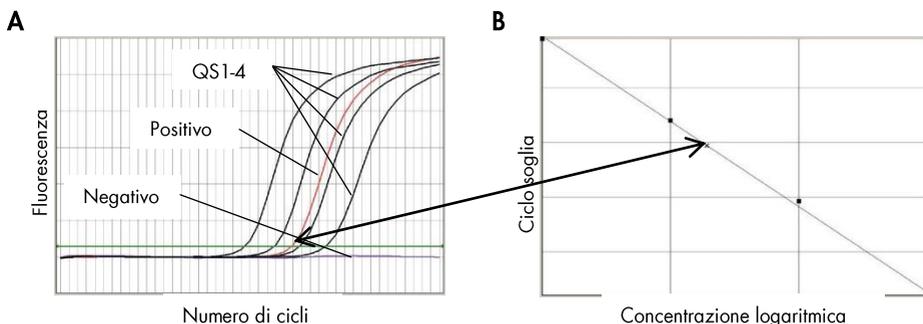


Figura 9. Standard di quantificazione, un campione positivo e un campione negativo visualizzati (A) in un grafico di amplificazione e (B) in un'analisi con curva standard.

**Nota:** La concentrazione del campione è visualizzata in copie/μl e corrisponde alla concentrazione del DNA virale nell'eluato.

Utilizzare la seguente formula per calcolare la carica virale del campione originale:

$$\text{Carica virale (campione)} \quad [\text{copie/ml}] = \frac{\text{Volume (eluato)} \quad [\mu\text{l}] \times \text{carica virale (eluato)} \quad [\text{copie}/\mu\text{l}]}{\text{Materiale campione immesso} \quad [\text{ml}]}$$

## Limiti della metodica

- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle tecniche real-time PCR e alle procedure della diagnostica *in vitro*.
- Le buone pratiche di laboratorio sono essenziali affinché le prestazioni di questo test siano corrette.
- Prestare la massima cura per conservare la purezza dei componenti del kit e della preparazione delle reazioni. Controllare accuratamente tutti i reagenti per verificare la presenza di eventuali impurità e contaminazione. Smaltire i reagenti se si sospetta che siano contaminati.
- Affinché le prestazioni di questo test siano ottimali sono necessarie adeguate procedure di prelievo, trasporto, conservazione e processazione dei campioni.
- Non utilizzare questo test direttamente sui campioni. Prima di utilizzare il test eseguire l'opportuna procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR può causare risultati falsi negativi o risultati non validi.
- Mutazioni potenziali nell'ambito delle regioni bersaglio del genoma dell'HAdV coperte da primer e/o sonde utilizzati nel test possono impedire la rilevazione della presenza dei patogeni.
- Analogamente a ogni test diagnostico, i risultati ottenuti con il kit *artus* HAdV RG PCR devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i riscontri clinici e di laboratorio.

## Controllo di qualità

Ogni lotto del kit *artus* HAdV RG PCR è testato in base a specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto.

---

## Caratteristiche delle prestazioni

Non essendo disponibili standard internazionali per l'adenovirus, la valutazione delle prestazioni quantitative del kit *artus* HAdV RG PCR è stata eseguita utilizzando il DNA genomico di un isolato di HAdV3 caratterizzato (specie B).

Per la valutazione delle prestazioni qualitative, il DNA genomico delle specie di adenovirus A–F è stato analizzato utilizzando il kit *artus* HAdV RG PCR. Il DNA genomico è stato ottenuto dall'ATCC® (American Type Culture Collection) e da isolati di coltura cellulare caratterizzati. Per l'analisi della specie G (sierotipo HAdV-52) è stato utilizzato un plasmide contenente la corrispondente sequenza bersaglio (Tabella 7).

**Tabella 7. Specie di adenovirus e sierotipi analizzati con il kit *artus* HAdV RG PCR**

<b>Specie di HAdV</b>	<b>Sierotipo di HAdV</b>	<b>Origine</b>	<b>Risultato ottenuto con il kit <i>artus</i> HAdV RG PCR</b>
Specie A	HAdV-12	ATCC-VR-863D	Positivo
	HAdV-31	Isolato di coltura cellulare caratterizzato	Positivo
	HAdV-18	Plasmide	Positivo
Specie B1	HAdV-3	ATCC-VR-3, ATCC-VR-857D	Positivo
	HAdV-7	Plasmide	Positivo
Specie B2	HAdV-35	ATCC-VR-718D	Positivo
	HAdV-11	Isolato di coltura cellulare caratterizzato	Positivo
	HAdV-55	Plasmide	Positivo
Specie C	HAdV-1	ATCC-VR-1	Positivo
	HAdV-2	Plasmide	Positivo
	HAdV-5	ATCC-VR-5D	Positivo
	HAdV-6	Isolato di coltura cellulare caratterizzato	Positivo
Specie D	HAdV-37	ATCC-VR-929D	Positivo
	HAdV-19	Plasmide	Positivo
Specie E	HAdV-4	ATCC-VR-1572D	Positivo
Specie F	HAdV-41	ATCC-VR-930D	Positivo
Specie G	HAdV-52	Plasmide	Positivo

## Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit *artus* HAdV RG PCR è definita come la concentrazione (copie per  $\mu\text{l}$  di eluato) di DNA HAdV-specifico che può essere rilevata con un tasso di positività di  $\geq 95\%$ . La sensibilità analitica è stata determinata analizzando una serie di diluizioni di DNA genomico dell'adenovirus quantificato (gruppo B, sottotipo 3) (Tabella 8).

**Tabella 8. Risultati della PCR utilizzati per calcolare la sensibilità analitica del kit *artus* HAdV RG PCR**

Concentrazione in ingresso (copie/ $\mu\text{l}$ )	Numero di replicati	Numero di positivi	Percentuale di successo (%)	Controllo interno
31,6	18	18	100	Valido
10,0	18	18	100	Valido
3,2	18	18	100	Valido
1,0	18	18	100	Valido
0,3	18	12	67	Valido
0,1	18	7	39	Valido
0,03	18	3	17	Valido
0,01	18	1	6	Valido
0,003	18	0	0	Valido

La sensibilità analitica del kit *artus* HAdV RG PCR determinata mediante analisi probit per la rilevazione del DNA HAdV-specifico è pari a 1,07 copie/ $\mu\text{l}$  (intervallo di confidenza al 95% [IC]: 0,58-2,99 copie/ $\mu\text{l}$ ).

## Specificità analitica

La specificità analitica del kit *artus* HAdV RG PCR è garantita dalla scelta accurata degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili allo scopo di garantire che tutti i genotipi rilevanti di adenovirus siano rilevati.

La specificità analitica del kit *artus* HAdV RG PCR è stata valutata testando un pannello di DNA/RNA genomico estratto da altri patogeni che causano sintomi simili alle infezioni da adenovirus e testando il DNA genomico umano (Tabella 9).

**Tabella 9. Organismi testati per dimostrare la specificità analitica del kit *artus* HAdV RG PCR**

Organismo	Canale di rilevazione	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
DNA genomico umano	Negativo	Valido
Virus della varicella-zoster	Negativo	Valido
Virus dell'Herpes simplex tipo 1	Negativo	Valido
Virus dell'Herpes simplex tipo 2	Negativo	Valido
Virus di Epstein-Barr	Negativo	Valido
Virus dell'herpes umano 6 (A, B)	Negativo	Valido
Virus dell'herpes umano 7	Negativo	Valido
Citomegalovirus	Negativo	Valido
Virus BK	Negativo	Valido
Virus JC	Negativo	Valido
Simian virus 40	Negativo	Valido
Virus dell'epatite A	Negativo	Valido
Virus dell'epatite B	Negativo	Valido

<b>Organismo</b>	<b>Canale di rilevazione</b>	
	<b>Cycling Green (HAdV)</b>	<b>Cycling Yellow (IC)</b>
Virus dell'epatite C	Negativo	Valido
Virus dell'immunodeficienza umana 1	Negativo	Valido
Parvovirus B19	Negativo	Valido
<i>Escherichia coli (EHEC)</i>	Negativo	Valido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	Valido
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negativo	Valido
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativo	Valido
<i>Neisseria meningitidis</i>	Negativo	Valido
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo	Valido

<b>Organismo</b>	<b>Canale di rilevazione</b>	
	<b>Cycling Green (HAdV)</b>	<b>Cycling Yellow (IC)</b>
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativo	Valido
Coronavirus	Negativo	Valido
Virus dell'influenza A (incl. H1N1-2009), B	Negativo	Valido
Virus respiratorio sinciziale A, B	Negativo	Valido
Virus della parainfluenza 1-4	Negativo	Valido
Metapneumovirus umano	Negativo	Valido
Rhinovirus	Negativo	Valido

Il kit *artus* HAdV RG PCR non ha presentato reattività crociata con nessuno degli organismi indicati.

## Range lineare

Il range lineare del kit *artus* HAdV RG PCR è stato valutato analizzando una serie di diluizioni su base logaritmica del DNA genomico dell'HAdV-2 quantificato (specie C) utilizzando concentrazioni da  $1 \times 10^9$  a  $0,1$  copie/ $\mu$ l. Sono stati analizzati sei replicati per ogni diluizione.

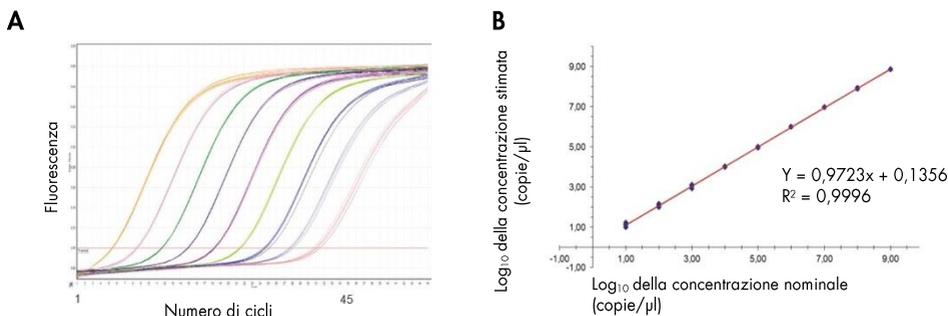


Figura 10. Curva di amplificazione (A) e analisi di regressione lineare (B) di una serie di diluizioni del DNA genomico dell'HAdV-2 (specie C).

Il range lineare del kit *artus* HAdV RG PCR copre un intervallo di almeno 8 ordini di grandezza per il DNA HAdV-specifico.

## Precisione

La precisione del kit *artus* HAdV RG PCR è stata determinata come variabilità intra-assay (variabilità nell'ambito di un solo esperimento), variabilità inter-assay

(variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra diversi lotti di produzione).

I dati relativi alla variabilità sono espressi in termini di deviazione standard e coefficiente di variazione. I dati si basano sull'analisi di quantificazione delle concentrazioni predefinite di DNA genomico dell'HAdV e sui valori del ciclo soglia ( $C_T$ ) per il controllo interno (rispettivamente Tabelle 10 e 11). Sono stati analizzati almeno 6 replicati per campione per la variabilità intra-assay, inter-assay e inter-lotto. La varianza totale è stata calcolata combinando le 3 analisi.

**Tabella 10. Dati sulla precisione per il sistema di rilevazione specifico per il DNA dell'HAdV del kit *artus* HAdV RG PCR**

Sistema specifico dell'HAdV	Conc. media (copie/ $\mu$ l)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay	26,88	4,87	18,13
Variabilità inter-assay	35,11	8,65	24,63
Variabilità inter-lotto	27,39	4,65	16,97
Varianza totale	32,37	8,44	26,09

**Tabella 11. Dati sulla precisione per il controllo interno del kit *artus* HAdV RG PCR**

<b>Controllo interno</b>	<b>Ciclo soglia medio (C<sub>T</sub>)</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>Coefficiente di variazione (%)</b>
Variabilità intra-assay	21,97	0,15	0,67
Variabilità inter-assay	22,12	0,19	0,87
Variabilità inter-lotto	22,05	0,25	1,12
Varianza totale	22,02	0,22	0,99

## Valutazione diagnostica

La sensibilità e specificità diagnostica del kit *artus* HAdV RG PCR vengono regolarmente valutate analizzando campioni di riferimento e campioni diagnostici precedentemente analizzati con metodi di riferimento (es. PCR interna, immunofluorescenza diretta (DFA), coltura rapida in "shell vial", microscopia elettronica, tecnologia Luminex®). Fino ad oggi sono stati analizzati presso vari laboratori 223 campioni ottenuti da strisci, aspirati nasofaringei, secrezioni bronchiali, campioni di feci, campioni di urine e strisci oculari per stabilire la sensibilità e specificità diagnostica del kit *artus* HAdV RG PCR. Di questi 223 campioni, 50 sono risultati positivi per l'HAdV, mentre 173 negativi per l'HAdV sulla base dei metodi di riferimento (Tabella 12). Quattro campioni sono risultati positivi per l'HAdV (valori C<sub>T</sub> pari rispettivamente a 35,2, 36,8, 40,0 e 37,9) con il kit *artus* HAdV RG PCR, mentre avevano precedentemente dato un risultato negativo con un'analisi PCR interna. Tutti i 50 campioni risultati positivi per il DNA dell'HAdV sono stati confermati HAdV-positivi con il kit *artus* HAdV RG PCR.

**Tabella 12. Valutazione diagnostica del kit *artus* HAdV-6 RG PCR**

		Kit <i>artus</i> HAdV RG PCR	
		NEGATIVO	POSITIVO
Metodo di riferimento	NEGATIVO	169	4*
	POSITIVO	0	50

\* Valori C<sub>t</sub>: 35,2, 36,8, 40,0 e 37,9.

## Ripetibilità

La specificità, sensibilità e precisione di quantificazione del kit *artus* HAdV RG PCR sono state valutate analizzando pannelli standardizzati per l'adenovirus. Per garantire la ripetibilità del kit *artus* HAdV RG PCR, la specificità e la sensibilità sono state valutate analizzando pannelli standardizzati per l'adenovirus, nonché campioni diagnostici caratterizzati su una base regolare.

**Tabella 13. Risultati dell'analisi di un pannello standardizzato per l'HAdV (QCMD) utilizzando il kit *artus* HAdV RG PCR**

ID campione	Pannello standardizzato		Kit <i>artus</i> HAdV RG PCR	
	Contenuto del campione	Conc. attesa (copie/ml)	Risultato	Controllo interno
14-01	HAdV-1	2.793	Positivo	Valido
14-02	HAdV-1	13.213	Positivo	Valido
14-03	HAdV-1	2.793	Positivo	Valido
14-04	HAdV-1	4.093	Positivo	Valido
14-05	HAdV-4	2.032	Positivo	Valido
14-06	HAdV-4	21.281	Positivo	Valido
14-07	Negativo	0	Negativo	Valido
14-08	HAdV-14	426.580	Positivo	Valido
14-09	HAdV-5	241	Positivo	Valido
14-10	HAdV-5	1.820	Positivo	Valido

# Simboli

Nelle presenti istruzioni per l'uso sono utilizzati i simboli riportati nella tabella seguente.

Simbolo	Definizione
	Contenuto sufficiente per 96 test
	Dispositivo medico per diagnostica <i>in vitro</i>
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Limite di temperatura

Simbolo	Definizione
	Produttore
	Data di scadenza
	Numero di materiale
	Codice GTIN
	Consultare le istruzioni per l'uso

## Guida alla risoluzione dei problemi

Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Informazioni per gli ordini

<b>Prodotto</b>	<b>Indice</b>	<b>Cat n°</b>
<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit (96)	Per 96 reazioni: Master A, Master B, 4 standard di quantificazione, controllo interno, H <sub>2</sub> O (PCR grade water)	4530265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Per 50 preparazioni del DNA: 50 colonne QIAamp Mini, proteinasi K, reagenti, tamponi, provette per prelievo (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Per 250 preparazioni del DNA: 250 colonne QIAamp Mini, proteinasi K, reagenti, tamponi, provette per prelievo (2 ml)	51306
<b>Rotor-Gene Q e accessori</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9002023

---

Rotor-Gene Q MDx 5plex  
Platform

Termociclatore per real-time PCR a 5  
canali (verde, giallo, arancio, rosso,  
cremisi), notebook, software, accessori,  
1 anno di garanzia su parti e  
funzionalità di laboratorio,  
installazione e addestramento non  
inclusi

9002022

<b>Prodotto</b>	<b>Indice</b>	<b>Cat n°</b>
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, Priority Package con software, installazione, addestramento, 3 anni di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio e 3 visite di manutenzione preventiva	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, Priority Package con software, installazione, addestramento, 2 anni di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio e 2 visite di manutenzione preventiva	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9001570

<b>Prodotto</b>	<b>Indice</b>	<b>Cat n°</b>
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, Priority Package con software, installazione, addestramento, 3 anni di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio e 3 visite di manutenzione preventiva	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, Priority Package con software, installazione, addestramento, 2 anni di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio e 2 visite di manutenzione preventiva	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Strumento per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e funzionalità di laboratorio, installazione e addestramento non inclusi	9001590

<b>Prodotto</b>	<b>Indice</b>	<b>Cat n°</b>
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione con pipetta a un canale; 72 provette da 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106

### Contratto di Licenza Limitato per il kit *artus* HAdV RG PCR

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto dei seguenti termini:

1. Questo prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nei protocolli forniti insieme al prodotto, nel presente manuale e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati forniti da utenti QIAGEN per altri utenti QIAGEN. Tali protocolli non sono stati completamente testati od ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non garantisce in alcun modo che non violino i diritti di terze parti.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di Licenza Limitato e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

L'acquisto di questo prodotto ne consente l'uso all'acquirente per l'esecuzione di servizi per la diagnostica umana *in vitro*. Con il presente non si concede nessun brevetto generico o licenza di altro tipo in aggiunta agli specifici diritti di utilizzo garantiti dall'acquisto.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene® (Gruppo QIAGEN); ATCC® (American Type Culture Collection Corporation); FAM™, JOET™ (Life Technologies Corporation); Luminex® (Luminex Corporation).

HB-2010-001

© 2015 Altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

---

Ordini [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Assistenza tecnica [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Sito web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

