

Ottobre 2015

# Manuale del *artus*<sup>®</sup> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit



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

IVD

CE

REF



R1 MAT

4515265

altana Diagnostics GmbH,  
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, GERMANIA

1096239-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.....	5
Materiali in dotazione.....	6
Contenuto del kit.....	6
Materiali necessari ma non in dotazione.....	6
Avvertenze e precauzioni.....	7
Avvertenze.....	7
Precauzioni.....	8
Conservazione e manipolazione dei reagenti.....	9
Componenti del kit.....	9
Procedura.....	10
Estrazione del DNA.....	10
Protocollo: Rilevazione del DNA HSV-1-specifico e HSV-2-specifico.....	13
Interpretazione dei risultati.....	24
Validità del processo.....	24
Analisi qualitativa.....	25
Analisi quantitativa.....	26
Limiti della metodica.....	28
Controllo di qualità.....	29
Caratteristiche delle prestazioni.....	29

---

Sensibilità analitica .....	29
Specificità analitica .....	31
Range lineare .....	32
Precisione.....	33
Ripetibilità .....	36
Simboli.....	38
Guida alla risoluzione dei problemi.....	39
Informazioni per gli ordini .....	40

# Uso previsto

Il kit *artus*<sup>®</sup> HSV-1/2 Quant RG PCR (96) è un test diagnostico *in vitro*, che si basa sulla tecnologia real-time PCR per la rilevazione e la quantificazione simultanea del DNA specifico del virus dell'herpes simplex 1 (HSV-1) e del virus dell'herpes simplex 2 (HSV-2).

## Sommario e spiegazioni

Il kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR è un sistema pronto all'uso per la rilevazione del DNA HSV-1-specifico e HSV-2-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

Il virus dell'herpes simplex 1 (HSV-1) e il virus dell'herpes simplex 2 (HSV-2) fanno parte della famiglia degli *Herpesviridae* e, unitamente al VZV, sono classificati come *Alphaherpesvirinae*. I virus HSV-1 e HSV-2 presentano un genoma a DNA lineare a doppio filamento di circa 150 kbp. I virus HSV-1 e HSV-2 presentano un'identità nucleotidica di oltre l'80% nella loro regione codificante le proteine.

Le infezioni da virus dell'herpes simplex si verificano in tutto il mondo senza alcuna distribuzione stagionale. Il virus si diffonde per contatto diretto attraverso le secrezioni. La prevalenza dell'infezione da HSV-1 aumenta gradualmente a partire dall'infanzia, raggiungendo l'80% e oltre in età adulta, mentre la sieroprevalenza dell'HSV-2 rimane bassa fino all'adolescenza. Le infezioni da HSV-1 vengono contratte in gran parte come infezioni subcliniche o non riconosciute. Le infezioni primarie da HSV-2 si manifestano solitamente sotto forma di herpes genitalis. L'infezione primaria da HSV-1 o HSV-2 è seguita

---

dalla persistenza del virus in fase di latenza nei gangli delle radici nervose spinali. Periodicamente, il virus si riattiva e migra lungo gli assoni verso le sedi orali o genitali, causando l'infezione e, in alcuni casi, la formazione di lesioni. Sebbene normalmente asintomatiche, le infezioni da HSV possono causare un ampio spettro di manifestazioni cliniche, fra cui herpes orale, herpes genitale, herpes neonatale, encefalite e herpes oculare.

## Principio della metodica

L'HSV-1/2 RG Master A e l'HSV-1/2 RG Master B contengono reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di regioni bersaglio nel genoma dell'HSV-1 e HSV-2 e per la rilevazione diretta dell'amplicone specifico nei canali di fluorescenza Cycling Green (ciclo verde) e Cycling Red (ciclo rosso) degli strumenti Rotor-Gene Q.

Il kit *artus* HSV-1/2 Quant 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'HSV-1 sono legate al fluorocromo FAM™, mentre le sonde specifiche per il DNA dell'HSV-2 sono legate ad un fluorocromo che presenta le stesse caratteristiche di Cy®5. 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 HSV-1-specifico e HSV-2-specifico, nonché la rilevazione del controllo interno nei rispettivi canali dello strumento Rotor-Gene Q.

# Materiali in dotazione

## Contenuto del kit

<b>artus HSV-1/2 Quant RG PCR Kit</b>		<b>(96)</b>
<b>Numero di catalogo</b>		<b>4515265</b>
<b>N° di reazioni</b>		<b>96</b>
Blu	HSV-1/2 RG Master A	8 x 60 µl
Viola	HSV-1/2 RG Master B	8 x 180 µl
Verde	HSV-1/2 RG IC	1 x 1.000 µl
Rosso	HSV-1 QS*	4 x 250 µl
Arancio	HSV-2 QS*	4 x 250 µl
Bianco	H <sub>2</sub> O	1 x 500 µl
	Manuale	1

\* Il kit *artus HSV-1/2 Quant RG PCRKit* contiene 4 standard di quantificazione per HSV-1 (QS1–QS4) e 4 standard di quantificazione per HSV-2 (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. 10)

## 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* HSV-1/2 Quant 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'HSV-1/2 RG Master A e l'HSV-1/2 RG Master B al riparo dalla luce.

Il kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR include:

- Due reagenti master (HSV-1/2 RG Master A e HSV-1/2 RG Master B)
- Stampo del controllo interno (HSV-1/2 RG IC)
- Quattro standard di quantificazione per HSV-1 (HSV-1 QS1–QS4)
- Quattro standard di quantificazione per HSV-2 (HSV-2 QS1–QS4)
- Acqua grado PCR ( $\text{H}_2\text{O}$ )

I reagenti HSV-1/2 RG Master A e HSV-1/2 RG Master B contengono tutti i componenti (tampone, enzimi, primer e sonde) per consentire l'amplificazione, la rilevazione e la differenziazione del DNA HSV-1-specifico e HSV-2-specifico e del controllo interno in un'unica reazione.

Gli standard di quantificazione contengono concentrazioni standardizzate di DNA HSV-1-specifico e HSV-2-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 HSV-1-specifico e/o HSV-2-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)	
	HSV-1	HSV-2
QS1	10.000	10.000
QS2	1.000	1.000
QS3	100	100
QS4	10	10

## Procedura

### Estrazione del DNA

Le sequenze bersaglio specifiche dell'HSV-1 e dell'HSV-2 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* HSV-1/2 Quant 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* HSV-1/2 Quant 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 HSV-1/2 RG Master A e HSV-1/2 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/o il carrier RNA direttamente al campione.

## Protocollo: Rilevazione del DNA HSV-1-specifico e HSV-2-specifico

### Punti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere "Precauzioni", pag. 8.
- 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. 11). In questo caso, preparare una miscela master secondo la Tabella 2.

La miscela di reazione contiene 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)**

Componente	1 reazione	12 reazioni
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 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 HSV-1/2 RG Master A e HSV-1/2 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)**

Componente	1 reazione	12 reazioni
HSV-1/2 RG Master A	5 µl	60 µl
HSV-1/2 RG Master B	15 µl	180 µl
HSV-1/2 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 H<sub>2</sub>O (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 gli 8 standard di quantificazione (HSV1 QS1–QS4 & HSV2 QS1–QS4).

4. Chiudere le provette per PCR. Verificare che l'anello di bloccaggio (accessorio dello strumento Rotor-Gene) sia applicato sopra il rotore.
5. Per l'individuazione del DNA HSV-1-specifico e HSV-2-specifico, creare un profilo termico con le seguenti operazioni.

<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 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.

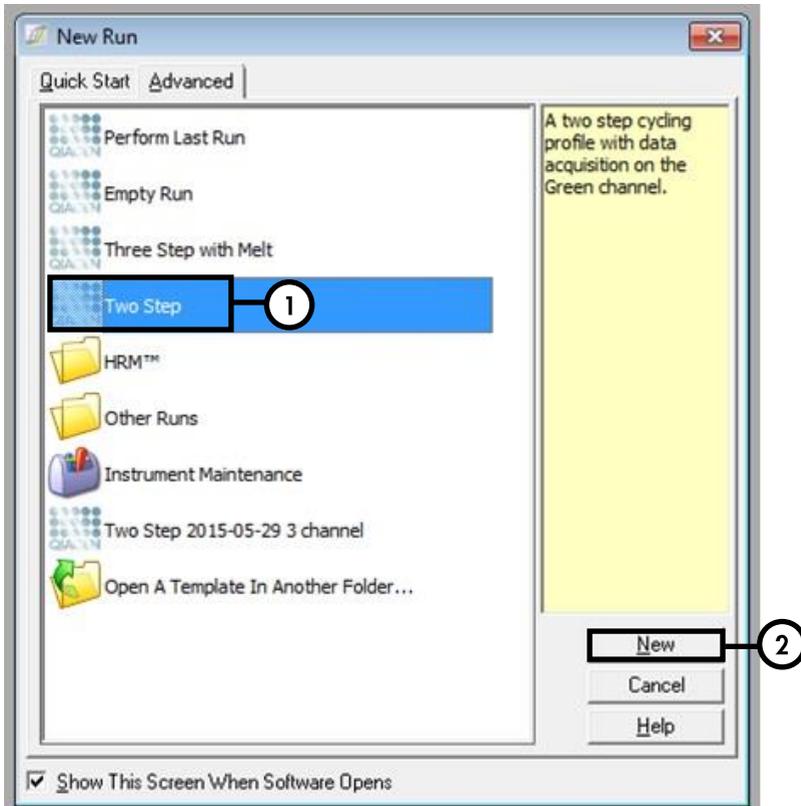


Figura 1. Finestra di dialogo “New Run Wizard”.

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**.

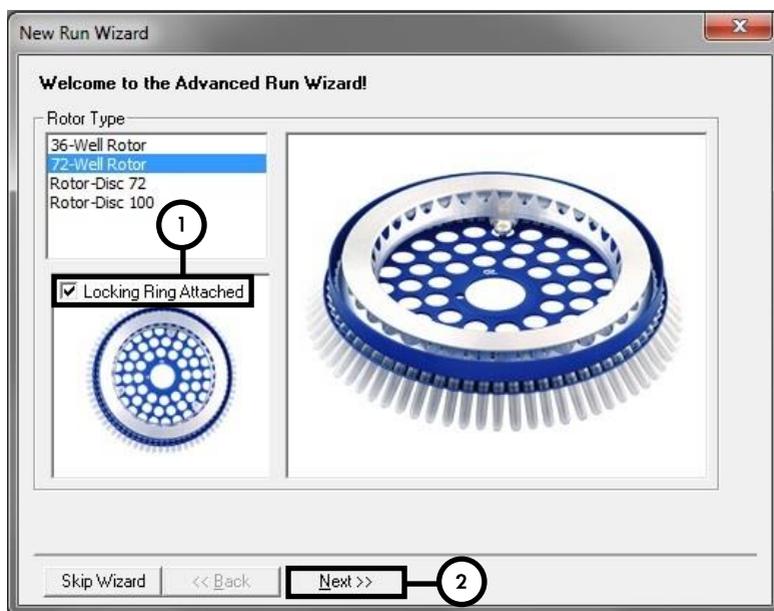


Figura 2. Finestra di dialogo "New Run Wizard".

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

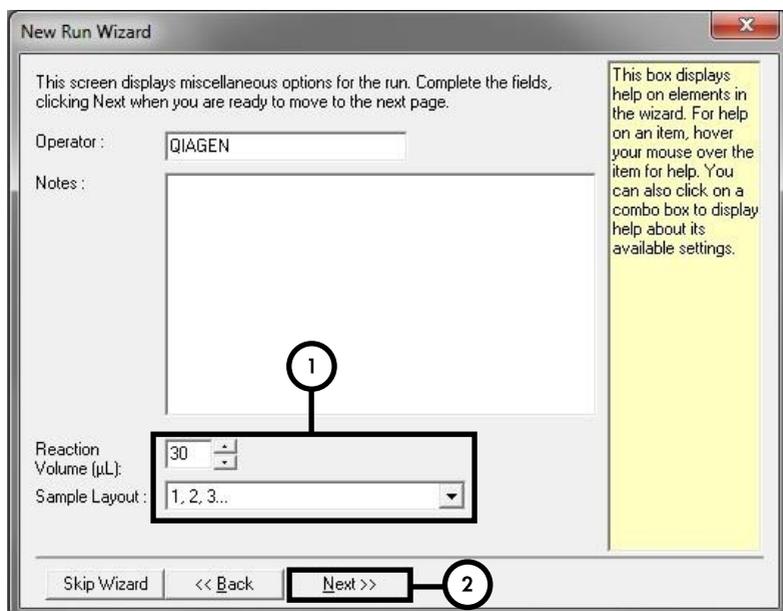


Figura 3. Impostazione dei parametri generali del test.

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.

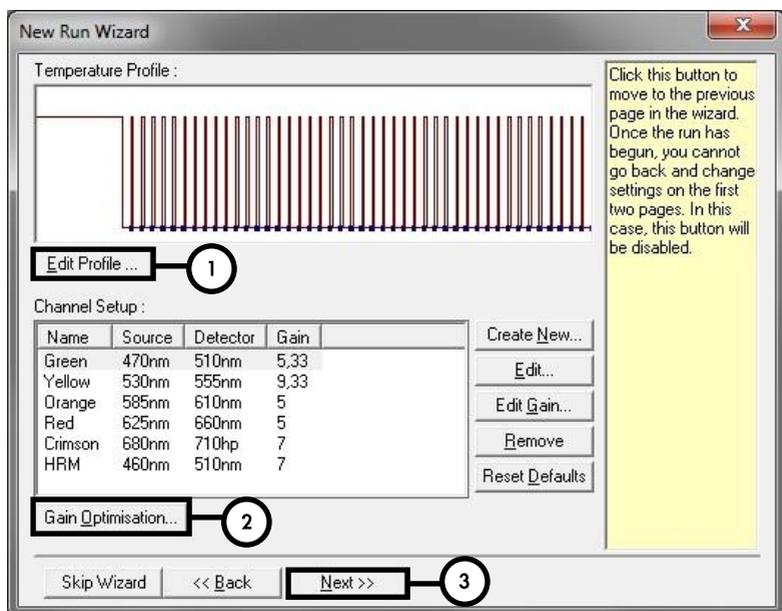


Figura 4. Modifica del profilo.

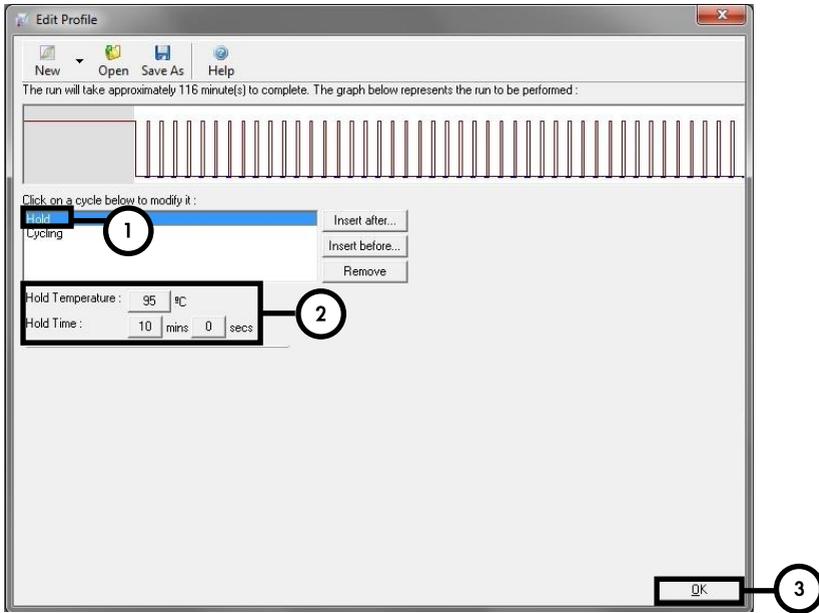


Figura 5. Attivazione iniziale dell'enzima hot-start.

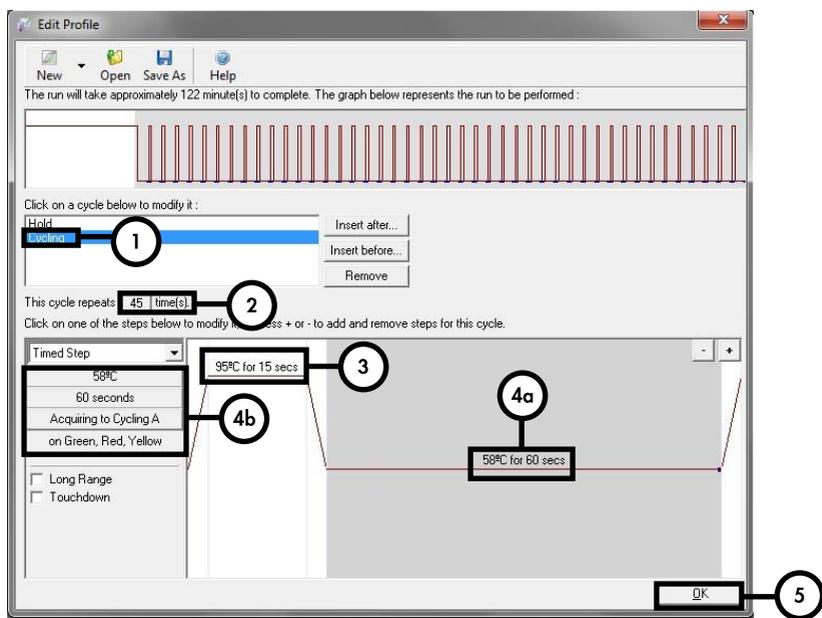


Figura 6. Amplificazione del DNA.

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 tutti e tre i canali (Green, Red 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.

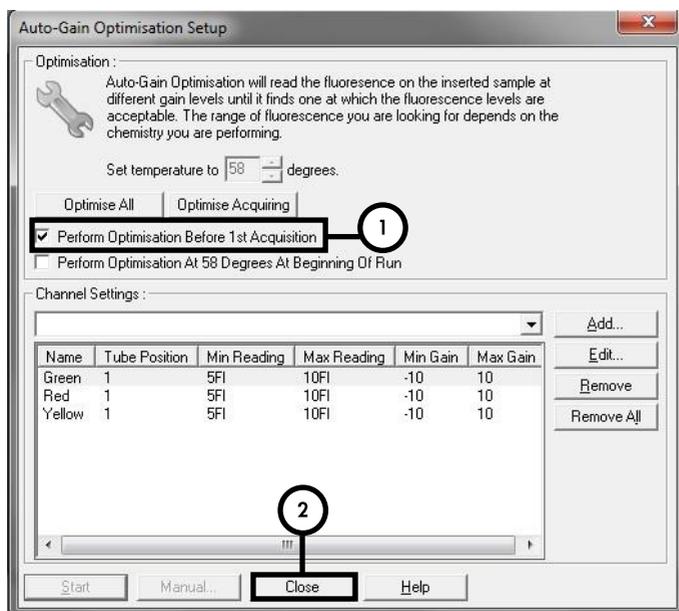


Figura 7. Regolazione della sensibilità dei canali di fluorescenza.

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** (Avvia processo).

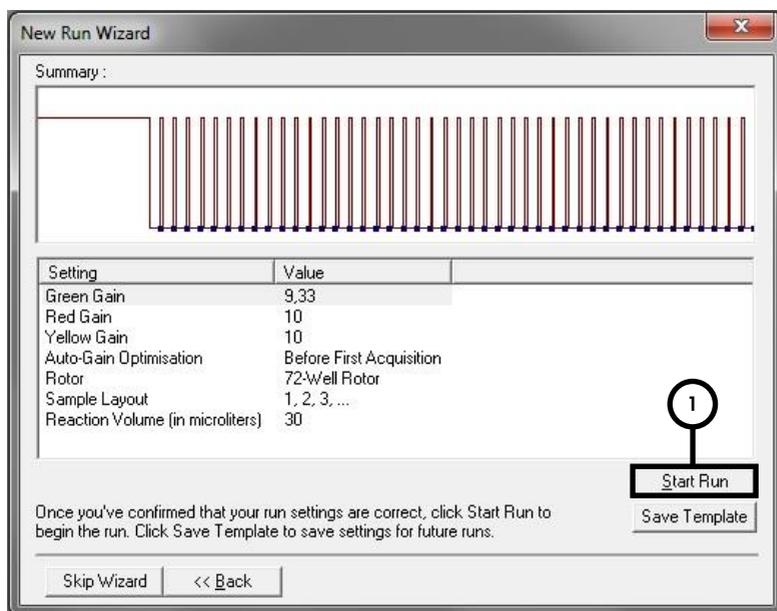


Figura 8. Avvio del processo.

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 Red	Cycling Yellow
Controllo positivo per HSV-1 (QS)	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
Controllo positivo per HSV-2 (QS)	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controllo negativo	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 ( $R^2$ )	>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 Red	Cycling Yellow	
A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO*	DNA HSV-1-specifico rilevato.
B	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO*	DNA HSV-2-specifico rilevato.
C	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	Non rilevato né DNA HSV-1-specifico né HSV-2-specifico. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA HSV-1-specifico o HSV-2-specifico.
D	NEGATIVO	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 né nel canale di rilevazione Cycling Green né nel canale di rilevazione Cycling Red. Alte cariche di HSV-1 o HSV-2 nel campione possono portare a una riduzione o assenza dei segnali del controllo interno.

## Analisi quantitativa

Il kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR contiene 4 standard di quantificazione (QS) per HSV-1 e 4 standard di quantificazione (QS) per HSV-2. Per generare una curva standard per l'analisi quantitativa dei dati occorre definire gli standard di quantificazione con le corrispondenti

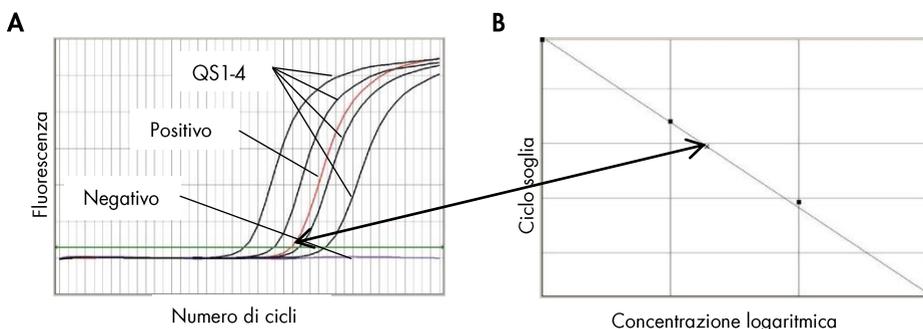
concentrazioni (vedere la Tabella 1, pag. 10). Per generare una curva standard per l'analisi quantitativa occorre utilizzare standard con concentrazioni note.

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

- $C_T$  = 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/ $\mu$ l e corrisponde alla concentrazione del DNA virale nell'eluato.

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

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

[copie/ml]

[copie/ $\mu$ l]

## 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'HSV-1 e/o dell'HSV-2 coperte da primer e/o sonde utilizzati nel test possono impedire la rilevazione della presenza del patogeno.
- Analogamente a ogni test diagnostico, i risultati ottenuti con il kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i riscontri clinici e di laboratorio.

# Controllo di qualità

Ogni lotto del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR è testato in base a specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto.

## Caratteristiche delle prestazioni

Le caratteristiche delle prestazioni specifiche del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR sono state stabilite utilizzando il DNA HSV-1-specifico (numero ATCC®: VR-1493) e il DNA HSV-2-specifico (numero ATCC: VR-540) con concentrazione nota.

### Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR è definita come la concentrazione (copie per  $\mu\text{l}$  di eluato) di DNA HSV-1-specifico o HSV-2-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 dell'HSV-1 e dell'HSV-2 con concentrazione nota (Tabelle 7 e 8).

**Tabella 7. Risultati della PCR utilizzati per calcolare la sensibilità analitica dell'amplificazione specifica dell'HSV-1**

Concentrazione in ingresso (copie/ $\mu\text{l}$ )	Numero di replicati	Numero di positivi	Percentuale di successo (%)
3,16	12	12	100
1,0	12	12	100
0,32	12	11	91,6
0,1	12	9	75
0,03	12	6	50
0,01	12	2	16,7

Concentrazione in ingresso (copie/ $\mu$ l)	Numero di replicati	Numero di positivi	Percentuale di successo (%)
0,003	12	0	0
0,001	12	0	0
NTC	12	0	0

**Tabella 8. Risultati della PCR utilizzati per calcolare la sensibilità analitica dell'amplificazione specifica dell'HSV-2**

Concentrazione in ingresso (copie/ $\mu$ l)	Numero di replicati	Numero di positivi	Percentuale di successo (%)
3,16	18	18	100
1,0	18	18	100
0,32	18	11	61,1
0,1	18	7	38,9
0,03	18	3	16,7
0,01	18	1	5,6
0,003	18	0	0
0,001	18	0	0
NTC	18	0	0

La sensibilità analitica del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR determinata mediante analisi probit per la rilevazione del DNA HSV-1-specifico è pari a 0,33 copie/ $\mu$ l di eluato (intervallo di confidenza al 95% [IC]: 0,16–1,3 copie/ $\mu$ l), mentre la sensibilità analitica per la rilevazione del DNA HSV-2-specifico è pari a 1,2 copie/ $\mu$ l di eluato (IC al 95%: 0,7–3,5 copie/ $\mu$ l).

## Specificità analitica

La specificità analitica del kit *artus* HSV-1/2 Quant 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 HSV siano rilevati. Inoltre, la specificità del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR è stata valutata testando un pannello di DNA/RNA genomico estratto da altri herpes virus o altri patogeni di rilevanza per pazienti immunodepressi (Tabella 9).

**Tabella 9. Organismi testati per valutare la reattività crociata**

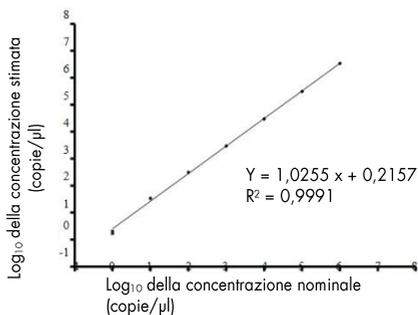
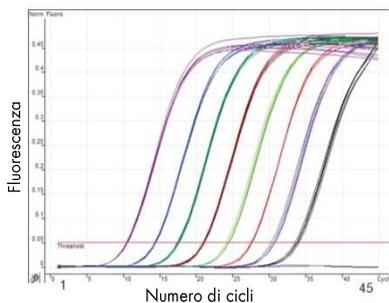
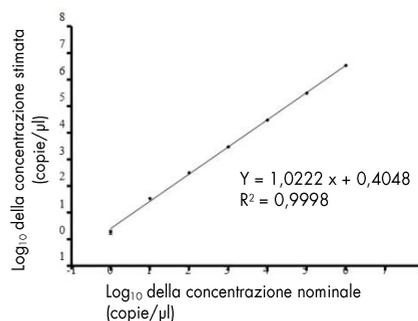
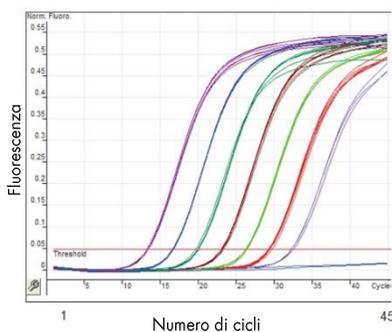
Organismo	Canale di rilevazione		
	Cycling Green (HSV-1)	Cycling Red (HSV-2)	Cycling Yellow (IC)
Virus della varicella-zoster	Negativo	Negativo	Valido
Virus di Epstein-Barr	Negativo	Negativo	Valido
Citomegalovirus	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'herpes umano 6 (A, B)	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'herpes umano 7	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'herpes umano 8	Negativo	Negativo	Valido
Virus BK	Negativo	Negativo	Valido
Virus JC	Negativo	Negativo	Valido
Parvovirus B19	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite A	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite B	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite C	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'immunodeficienza umana 1	Negativo	Negativo	Valido

---

Il kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR non ha presentato reattività crociata con nessuno degli organismi indicati.

## Range lineare

Il range lineare del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR è stato valutato analizzando una serie di diluizioni su base logaritmica del DNA HSV-1-specifico e HSV-2-specifico utilizzando concentrazioni da  $10^8$  copie/ $\mu$ l a 10 copie/ $\mu$ l (HSV-1) (Figura 10) e da  $10^7$  a 10 copie/ $\mu$ l (HSV-2). Sono stati analizzati almeno 6 replicati per ogni diluizione.

**A****B**

**Figura 10. Curve di amplificazione e analisi di regressione lineare di una serie di diluizioni di DNA HSV-1-specifico (A) e HSV-2-specifico (B).**

Il range lineare del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR copre un intervallo di almeno 7 ordini di grandezza per il DNA HSV-1-specifico e un intervallo di almeno 6 ordini di grandezza per il DNA HSV-2-specifico.

## Precisione

La precisione del kit *artus* HSV-1/2 Quant 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, varianza e coefficiente di variazione. I dati si basano sull'analisi di quantificazione delle concentrazioni predefinite di DNA HSV-1-specifico e HSV-2-specifico e sui valori del ciclo soglia ( $C_T$ ) per il controllo interno (Tabelle 10–13). 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. Precisione dell'amplificazione del DNA HSV-1-specifico**

Sistema specifico dell'HSV-1	Conc. media (copie/ $\mu$ l)			Coefficiente di variazione (%)
		Deviazione standard	Varianza	
Variabilità intra-assay	91	5,3	29	5,9
	8,8	1,5	2,2	16,7
Variabilità inter-assay	94,2	5,3	29,3	5,7
	8,9	1,2	1,4	13,1
Variabilità inter-lotto	90,3	5,1	25,5	5,6
	8,7	1,2	1,5	14,2
Varianza totale	92,7	5,5	30,7	6,0
	8,8	1,1	1,2	12,7

**Tabella 11. Precisione dell'amplificazione del controllo interno per l'HSV-1**

<b>Controllo interno</b>	<b>Ciclo soglia medio (C<sub>T</sub>)</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>Varianza</b>	<b>Coefficiente di variazione (%)</b>
Variabilità intra-assay	23,0	0,05	0,003	0,23
Variabilità inter-assay	22,9	0,12	0,01	0,51
Variabilità inter-lotto	23,5	0,61	0,37	2,6
Varianza totale	23,3	0,61	0,37	2,6

**Tabella 12. Precisione dell'amplificazione del DNA HSV-2-specifico**

Sistema specifico dell'HSV-2	Conc. media (copie/µl)	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay	108	5,9	35	5,5
	9,8	1,8	3,4	18,0
Variabilità inter-assay	99,2	9,4	87,7	9,4
	10	2,0	4,15	20,4
Variabilità inter-lotto	102,5	9,5	90,8	9,3
	9,0	2,0	4,0	22,2
Varianza totale	99,6	9,0	81,7	9,1
	9,5	2,1	4,5	22,3

**Tabella 13. Precisione dell'amplificazione del controllo interno per l'HSV-2**

Controllo interno	Ciclo soglia medio (C <sub>t</sub> )	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay	24,0	0,1	0,004	0,43
Variabilità inter-assay	23,8	0,3	0,13	1,27
Variabilità inter-lotto	24,0	0,14	0,02	0,59
Varianza totale	23,9	0,25	0,06	1,03

## Ripetibilità

La specificità, sensibilità e precisione di quantificazione del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR sono state valutate analizzando pannelli standardizzati per l'HSV. Per garantire la ripetibilità del kit *artus* HSV-1/2 Quant RG PCR, la specificità e la sensibilità sono state

valutate analizzando pannelli standardizzati per l'HSV-1 e l'HSV-2, nonché campioni diagnostici caratterizzati su una base regolare (un esempio è riportato nella Tabella 15).

**Tabella 15. Risultati dell'analisi di un pannello standardizzato per l'HSV (QCMD)**

Pannello standardizzato			Kit <i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR		
ID campione	Contenuto del campione	Conc. attesa (copie/ml)	Conc. rilevata di HSV-1 (copie/ml)	Conc. rilevata di HSV-2 (copie/ml)	Controllo interno
HSVDNA14-01	HSV-1	5.408	2460	–	Valido
HSVDNA14-02	Negativo per HSV	–	–	–	Valido
HSVDNA14-03	HSV-1	1.135	855	–	Valido
HSVDNA14-04	HSV-1	213	44	–	Valido
HSVDNA14-05	HSV-1	12.794	8.490	–	Valido
HSVDNA14-06	HSV-2	1.982	–	1.881	Valido
HSVDNA14-07	HSV-2	275	–	525	Valido
HSVDNA14-08	HSV-2	5.023	–	11.370	Valido
HSVDNA14-09	HSV-1	341	70	–	Valido
HSVDNA14-10	VZV	–	–	–	Valido

# Simboli

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

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

**Simbolo****Definizione**

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>Contenuto</b>	<b>Cat n°</b>
<i>artus</i> HSV-1/2 Quant RG PCR Kit (96)	Per 96 reazioni: Master A, Master B, 4 standard di quantificazione HSV-1, 4 standard di quantificazione HSV-2, controllo interno, H <sub>2</sub> O (acqua grado PCR)	4515265
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>Contenuto</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 1.000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106

---

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

---

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

#### **Contratto di Licenza Limitato per il kit *artus* HSV-1/2 Quant 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); FAM™, JOE™ (Life Technologies Corporation); Cy® (GE Healthcare).

HB-2016-001

© 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)