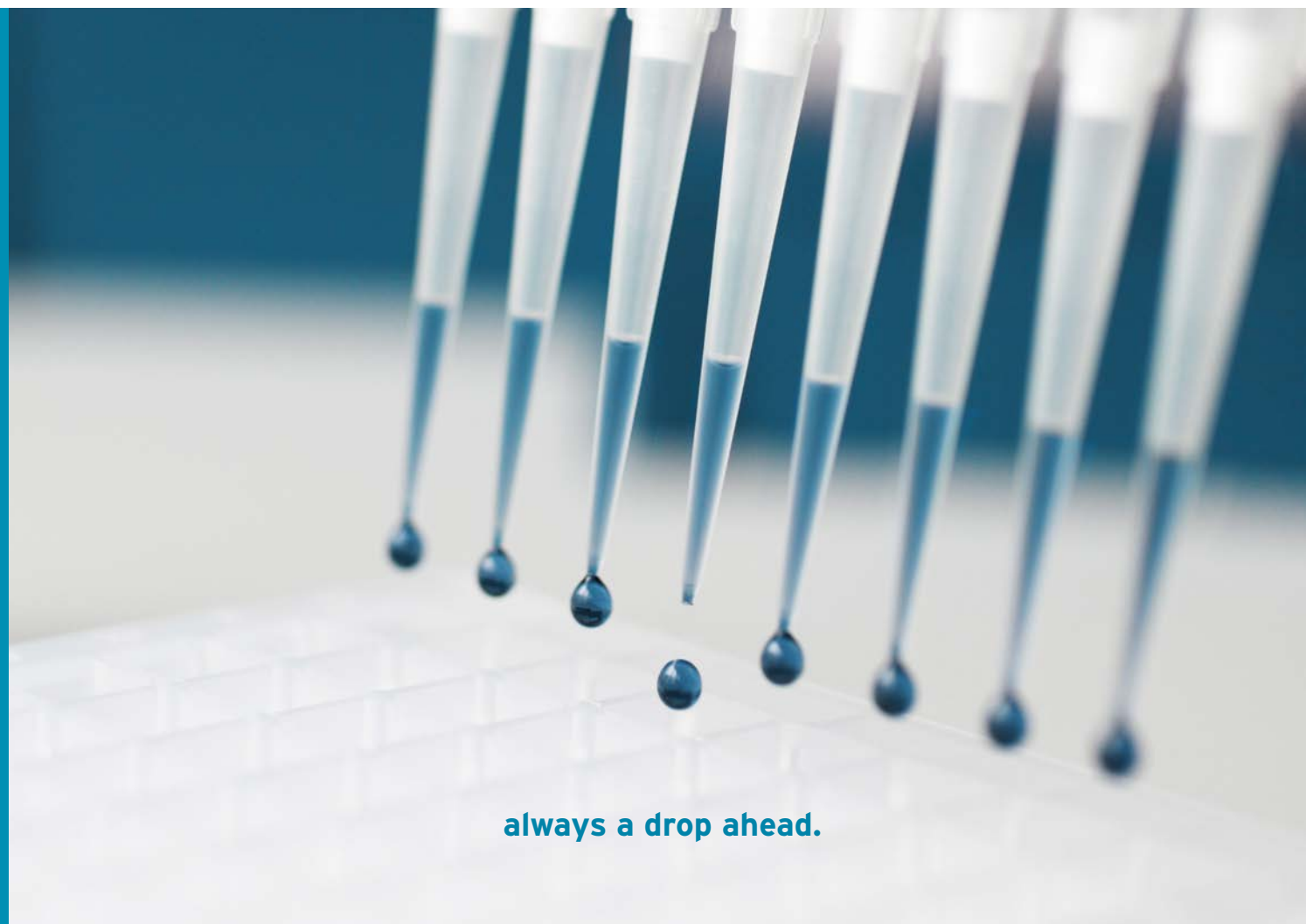


**RealStar<sup>®</sup>  
Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0**

08/2014



**altona** Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg  
Germania

phone +49 40 548 06 76 - 0  
fax +49 40 548 06 76 - 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)

**always a drop ahead.**

# RealStar<sup>®</sup>

## Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0

Da utilizzare con:

Mx 3005P<sup>™</sup> QPCR System (Stratagene)

VERSANT<sup>®</sup> kPCR Molecular System AD (Siemens)

ABI Prism<sup>®</sup> 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000/6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

CFX96<sup>™</sup> system/Dx real-time system (BIO-RAD)



Per uso diagnostico *in-vitro*



Codice prodotto: 441013



96 rxns



Conservare a -25°C ... -15°C



Agosto 2014



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstraße 12 • D-22767 Hamburg

**Indice**

<b>1. Uso previsto</b>	<b>6</b>
<b>2. Componenti del kit</b>	<b>6</b>
<b>3. Conservazione</b>	<b>6</b>
<b>4. Materiale e dispositivi necessari ma non forniti</b>	<b>7</b>
<b>5. Informazioni di base</b>	<b>8</b>
<b>6. Descrizione del prodotto</b>	<b>11</b>
<b>7. Avvertenze e precauzioni</b>	<b>13</b>
<b>8. Istruzioni per l'uso</b>	<b>14</b>
8.1 Preparazione dei campioni	14
8.2 Preparazione della miscela master	15
8.3 Preparazione della reazione	17
<b>9. Programmazione degli strumenti PCR Real-Time</b>	<b>18</b>
9.1 Impostazioni	18
9.2 Rilevatori fluorescenti (coloranti)	18
9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti	19
<b>10. Analisi dei dati</b>	<b>19</b>
10.1 Validità dei processi dei test diagnostici	20
10.1.1 Processo dei test diagnostici valido	20
10.1.2 Processo dei test diagnostici non valido	20
10.2 Interpretazione dei risultati	21

<b>11. Valutazione delle prestazioni</b>	<b>22</b>
11.1 Sensibilità analitica	22
11.2 Specificità analitica	25
11.3 Precisione	28
<b>12. Limiti e precauzioni</b>	<b>32</b>
<b>13. Controllo di qualità</b>	<b>33</b>
<b>14. Servizio di Assistenza tecnica</b>	<b>33</b>
<b>15. Marchi commerciali e disclaimer</b>	<b>33</b>
<b>16. Spiegazione dei simboli</b>	<b>34</b>

## 1. Uso previsto

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è un test diagnostico *in-vitro*, che si basa sulla tecnologia PCR real-time, per la rilevazione qualitativa e la differenziazione dell'RNA specifico per i virus Ebola e Marburg.

## 2. Componenti del kit

Colore tappo	Blu	Viola	Verde	Rosso	Arancione	Bianco
Componente	Master A	Master B	Controllo interno	Controllo positivo Target Ebola	Controllo positivo Target Marburg	Acqua di grado PCR
N° di fiale	8	8	1	1	1	1
Volume [µl/fiala]	60	180	1000	250	250	500


## 3. Conservazione

- Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è 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 Altona Diagnostics GmbH.
- Tutti i componenti devono essere conservati a -25 °C ... -15 °C al momento della consegna.
- Evitare scongelamenti e congelamenti ripetuti (più di due volte) dei reagenti master, perché ciò potrebbe ridurre le prestazioni del test. Congelare i reagenti in aliquote, se si prevede un uso intermittente.
- La conservazione a +4°C non deve superare un periodo di due ore.
- Tenere il Master A e il Master B al riparo dalla luce.

## 4. Materiale e dispositivi necessari ma non forniti

- Strumento appropriato PCR real-time (cap. 6 Descrizione del prodotto)
- Sistema o kit appropriato per l'estrazione degli acidi nucleici
- Centrifuga da banco con rotore per provette da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre di microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Agitatore vortex
- Piastre di reazione a 96 pozzetti appropriate o provette con materiale di chiusura corrispondente (ottico)
- Pipette (regolabili)
- Puntali per pipette con filtri (monouso)
- Guanti non talcati (monouso)

## NOTA

 **Assicurarsi che gli strumenti siano stati installati, calibrati, controllati e conservati nel rispetto delle istruzioni e delle raccomandazioni del produttore.**

## 5. Informazioni di base

I *virus Ebola* e *Marburg* sono generi appartenenti alla famiglia *Filoviridae*. Il genere *Marburgvirus* contiene una singola specie denominata *Marburg marburgvirus* (MARV). Il genere *Ebolavirus* contiene cinque specie: *Bundibugyo ebolavirus* (BEBOV), *Reston ebolavirus* (RESTV), *Sudan ebolavirus* (SEBOV), *Tai Forest ebolavirus* (TAFV) e *Zaire ebolavirus* (ZEBOV) [1].

Tutte le specie di *virus Ebola* e *Marburg* sono endemiche in Africa ad eccezione del RESTV che è endemico nel Sud-est asiatico. Gli ospiti naturali sono i pipistrelli della frutta [2] [3]. Dopo la trasmissione agli esseri umani, i filovirus possono causare grave febbre emorragica con un tasso di mortalità relativamente alto del 20-90% (in base alle specie e al ceppo delle singole epidemie) [4]. Spesso è difficile determinare la modalità di trasmissione. La caccia, la macellazione e il consumo di animali selvatici sono probabili vie di introduzione del virus nella popolazione umana. È stato dimostrato anche che il contatto diretto con i pipistrelli rappresenta una possibile via di infezione [5]. Molte specie di mammiferi sono suscettibili alle infezioni da filovirus. Gli scimpanzé e i gorilla in particolare sono stati ampiamente colpiti dall'epidemia di *Ebolavirus*, determinando una riduzione significativa delle popolazioni di grandi scimmie [6].

All'inizio della malattia i sintomi sono piuttosto aspecifici e comprendono malessere generale, febbre e dolori in diverse parti del corpo [7]. All'inizio dello scoppio epidemico, la malattia infatti è spesso confusa con malaria, febbre tifoide o altre malattie febbrili comuni nell'Africa sub-sahariana.

Il titolo virale dell'infezione e il titolo dell'RNA durante la fase acuta della malattia sono di solito alti e il livello di viremia è negativamente correlato all'outcome della malattia [8]. Anche sanguinamento ed altre emorragie sono indicativi di outcome fatale della febbre da Ebola e Marburg [7].

La diagnostica di laboratorio viene condotta preferibilmente utilizzando la RT-PCR da plasma, siero o anche campioni di sangue intero. I test sierologici servono come strumenti diagnostici di supporto, pur non essendo utili per la diagnosi primaria della malattia. È stato infatti dimostrato che molti pazienti (soprattutto quelli con outcome fatale) non sviluppano affatto titoli anticorpali rilevabili durante il corso della malattia [9].

Sono stati pubblicati svariati protocolli RT-PCR real-time per la rilevazione del filovirus, ma nessuno di esse comprende un controllo di amplificazione interno o è in grado di rilevare e tipizzare l'*Ebolavirus* e il *Marburgvirus* in una singola reazione RT-PCR. Il protocollo pubblicato da Panning e colleghi nel 2007 ha come obiettivo il gene L e si è rivelato un dosaggio sensibile e specifico [10]. Da allora, è stato utilizzato da innumerevoli laboratori di riferimento di tutto il mondo per la diagnostica dei filovirus. Ciononostante, le informazioni più recenti a disposizione sulla sequenza e la comparsa di nuove specie di Ebola (BEBOV) hanno evidenziato la necessità di controllare in modo costante e di aggiornare i metodi esistenti. Il dosaggio del gene L del 2007 presenta alcuni punti deboli e pertanto si è reso necessario un nuovo dosaggio basato sul gene L dei filovirus che è stato messo a punto da Altona Diagnostics GmbH.

Il gene L dei filovirus, che codifica per la polimerasi virale, contiene elementi di sequenza altamente conservati. Le mutazioni nelle regioni che codificano per siti enzimicamente attivi determinano di solito perdita di funzione. Questi mutanti scompaiono dalla quasi-specie virale e non hanno alcun impatto negativo sulla specificità del dosaggio basato sulla RT-PCR. Abbiamo quindi deciso di usare il gene L come sequenza target per il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0. L'idea di scegliere il gene L dei virus RNA come target delle RT-PCR diagnostiche è stata applicata con successo in passato per il virus Lassa, i filovirus e altri virus RNA [10–12].

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è raccomandato come test diagnostico di prima linea. È concepito per rilevare tutte le specie più importanti di filovirus. Presso Altona Diagnostics GmbH è possibile reperire anche un dosaggio di seconda linea. Il kit RealStar® Filovirus Type RT-PCR 1.0 è rivolto anche ad altre sequenze, all'interno del genoma virale, ed offre quindi la possibilità di generare un risultato diagnostico confermativo. Inoltre, il kit RealStar® Filovirus Type RT-PCR 1.0 consente la differenziazione di tutti i filovirus importanti fino al livello della specie.

Il sospetto e la conferma di infezioni da filovirus ha un grande impatto sulla salute pubblica e la gestione dei casi. Tutti i casi devono essere immediatamente notificati alle rispettive autorità responsabili della salute pubblica, della biosicurezza e della bioprotezione (in Germania: Robert Koch Institut, Berlino; e "Landesgesundheitsämter" (Uffici d'igiene locali)). La procedura diagnostica (ad es. diagnosi differen-


ziale raccomandata, possibile utilizzo di un campione A e B) deve essere discussa con Istituti di riferimento competenti.

- [1] Carroll SA, Towner JS, Sealy TK, McMullan LK, Khristova ML, Burt FJ, et al. Molecular Evolution of Viruses of the Family Filoviridae Based on 97 Whole-Genome Sequences. *J Virol* 2013;87:2608–16.
- [2] Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Carroll SAR, Comer JA, Kemp A, et al. Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000536.
- [3] Leroy EM, Epelboin A, Mondonge V, Pourrut X, Gonzalez J-P, Muyembe-Tamfum J-J, et al. Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2009;9:723–8.
- [4] Kortepeter MG, Bausch DG, Bray M. Basic Clinical and Laboratory Features of Filoviral Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 2011;204:S810–S816.
- [5] Van Paassen J, Bauer MP, Arbous MS, Visser LG, Schmidt-Chanasit J, Schilling S, et al. Acute liver failure, multiorgan failure, cerebral oedema, and activation of proangiogenic and antiangiogenic factors in a case of Marburg haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2012;12:635–42.
- [6] Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquière S, Kilbourne A, Froment J-M, et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science* 2004;303:387–90.
- [7] Roddy P, Howard N, Van Kerkhove MD, Lutwama J, Wamala J, Yoti Z, et al. Clinical Manifestations and Case Management of Ebola Haemorrhagic Fever Caused by a Newly Identified Virus Strain, Bundibugyo, Uganda, 2007–2008. *PLoS ONE* 2012;7:e52986.
- [8] Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, Sanchez A, Crary SM, Vincent M, et al. Rapid Diagnosis of Ebola Hemorrhagic Fever by Reverse Transcription-PCR in an Outbreak Setting and Assessment of Patient Viral Load as a Predictor of Outcome. *J Virol* 2004;78:4330–41.
- [9] Gupta M, MacNeil A, Reed ZD, Rollin PE, Spiropoulou CF. Serology and cytokine profiles in patients infected with the newly discovered Bundibugyo ebolavirus. *Virology* 2012;423:119–24.
- [10] Panning M, Laue T, Ölschlager S, Eickmann M, Becker S, Raith S, et al. Diagnostic Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Kit for Filoviruses Based on the Strain Collections of all European Biosafety Level 4 Laboratories. *J Infect Dis* 2007;196:S199–S204.

[11] Blasdel KR, Adams MM, Davis SS, Walsh SJ, Aziz-Boaron O, Klement E, et al. A reverse-transcription PCR method for detecting all known ephemeroviruses in clinical samples. *J Virol Methods* 2013;191:128–35.

[12] Vieth S, Drosten C, Lenz O, Vincent M, Omilabu S, Hass M, et al. RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101:1253–64.

## NOTA

 **A causa dell'evoluzione molecolare dei filovirus, sussiste un rischio intrinseco, per ogni sistema di test basato sulla PCR, che un accumulo di mutazioni nel tempo possa portare a risultati falso negativi.**

## 6. Descrizione del prodotto

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è un test diagnostico *in-vitro*, che si basa sulla tecnologia della PCR real-time, per la rilevazione qualitativa di RNA filovirus-specifico.

Il dosaggio è concepito per rilevare tutte le specie di filovirus che sono importanti patogeni umani e il virus di Reston. Il sistema di reagenti include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione RT-PCR e confermare l'integrità dei reagenti del kit.

Il test si basa sulla tecnologia RT-PCR real-time, che si avvale della reazione della trascrittasi inversa (RT) per convertire l'RNA in DNA complementare (cDNA), della reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target particolari e di sonde target-specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono contrassegnate con fluorocromo reporter e fluorocromo quencher. Le sonde specifiche per l'RNA *Ebolavirus* sono contrassegnate con fluorocromo FAM. Le sonde specifiche per l'RNA *Marburgvirus* sono contrassegnate con un fluorocromo con caratteristiche identiche a quelle di Cy5. La sonda specifica per il target del controllo interno (IC) è contrassegnata con il fluorocromo JOE. L'impiego

di sonde legate a coloranti distinguibili consente la rilevazione parallela e la discriminazione di RNA *Ebolavirus*-specifico e *Marburgvirus*-specifico nonché il controllo interno nei rispettivi canali del rilevatore dello strumento PCR real-time.

A causa dell'evoluzione molecolare relativamente veloce dei virus RNA, sussiste un rischio intrinseco, per ogni sistema di test basato sulla RT-PCR, che un accumulo di mutazioni nel tempo possa portare a risultati falso negativi. Le caratteristiche dei dosaggi si basano sulle informazioni della sequenza pubblicate nella GenBank dal dicembre 2013. La comparsa di nuovi ceppi e di nuove specie ancora sconosciuti potrebbe rendere necessario un aggiornamento dei set primer/sonda.

Il test consiste in tre processi in un dosaggio con una singola provetta:

- Trascrittasi inversa dell'RNA target in cDNA
- Amplificazione PCR del cDNA target e controllo interno
- Rilevazione simultanea di ampliconi PCR mediante sonde contrassegnate con fluorocromo

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è stato sviluppato e validato per l'utilizzo con i seguenti strumenti PCR real-time:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)
- ABI Prism® 7500 SDS and 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 3000/6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ system/Dx real-time system (BIO-RAD)

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è composto da:

- Due reagenti master (Master A e Master B)
- Template controllo interno (IC)
- Due controlli positivi:     Controllo positivo Target Ebola  
  Controllo positivo Target Marburg
- Acqua grado PCR

I reagenti Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone, enzimi, primer e sonde) per consentire trascrittasi inversa, amplificazione PCR-mediata e rilevazione del target (RNA filovirus-specifico e controllo interno) in una singola preparazione della reazione.

## 7. Avvertenze e precauzioni

- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle tecniche della PCR real-time 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 (DNase/RNase) del campione e dei componenti del kit.
- Usare sempre puntali per pipette monouso non contaminati da DNase/RNase 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 (i) preparazione dei campioni, (ii) preparazione della reazione e (iii) attività 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 materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.
- Non aprire le provette/piastre di reazione post amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Si possono analizzare altri controlli nel rispetto delle linee guida o dei requisiti di norme locali, nazionali 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 dei test secondo le locali disposizioni in materia di sicurezza.

## 8. Istruzioni per l'uso

### 8.1 Preparazione dei campioni

L'RNA estratto è il materiale di partenza per il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0. La qualità dell'RNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero sistema di test. Occorre garantire che il sistema usato per l'estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia PCR real-time.

Si raccomanda il kit di estrazione dell'acido nucleico indicato di seguito:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Se si utilizza una procedura di preparazione dei campioni che si avvale di colonne spin e che comprende tamponi di lavaggio contenenti etanolo, è fortemente raccomandata una ulteriore fase di centrifugazione per 10 min a circa 17000 x g (~ 13000 rpm), con l'utilizzo di una nuova provetta di raccolta prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

### NOTA

**⚠ L'uso del carrier RNA è fondamentale per l'efficienza dell'estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.**

**⚠ L'etanolo è un forte inibitore della PCR real-time. Se il vostro sistema di preparazione dei campioni fa uso di tamponi di lavaggio contenenti etanolo, occorre accertarsi dell'eliminazione di ogni traccia di etanolo prima di procedere all'eluizione dell'acido nucleico.**

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro servizio di assistenza tecnica:

**e-mail** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)  
**Telefono:** **+49-(0)40-5480676-0**

### 8.2 Preparazione della miscela master

Tutti i reagenti e i campioni devono essere scongelati completamente, miscelati (pipettandoli o agitandoli delicatamente su vortex) e brevemente centrifugati prima dell'uso.

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere usato o come controllo dell'inibizione della RT-PCR o come controllo della procedura di preparazione dei campioni (estrazione acido nucleico) e controllo dell'inibizione della RT-PCR.

- Se l'IC viene usato come controllo dell'inibizione della RT-PCR, ma non come controllo per la procedura di preparazione dei campioni, la miscela master viene preparata in base al seguente schema di pipettatura:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
<b>Volume miscela master</b>	<b>21 µl</b>	<b>252 µl</b>



- Se l'IC viene usato come controllo della procedura di preparazione dei campioni e come controllo dell'inibizione della RT-PCR, l'IC deve essere aggiunto durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- A prescindere dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Per esempio, se l'acido nucleico sarà eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, si dovranno aggiungere 6 µl di IC per campione alla miscela campione/tampone di lisi.

**NOTA**

 **Non aggiungere il controllo interno direttamente al campione!**

- Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, la miscela master viene preparata in base allo schema di pipettatura seguente:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
<b>Volume miscela master</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**8.3 Preparazione della reazione**

- Pipettare 20 µl della miscela master in ciascuno dei pozzetti richiesti di una piastra di reazione ottica a 96 pozzetti appropriata o in una provetta di reazione ottica appropriata.
- Aggiungere 10 µl del campione (eluito dall'estrazione di acido nucleico) o 10 µl dei controlli (controllo positivo o negativo).
- Assicurarsi che per ogni processo venga utilizzato un controllo positivo di ciascun tipo e almeno un controllo negativo.
- Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la miscela master pipettando ripetutamente su e giù.
- Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con una pellicola adesiva ottica adeguata e le provette di reazione con tappi appropriati.
- Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

**Preparazione della reazione**

Miscela master	20 µl
Campione o controllo	10 µl
<b>Volume totale</b>	<b>30 µl</b>

## 9. Programmazione degli strumenti PCR Real-Time

Per informazioni di base riguardanti la preparazione e la programmazione dei diversi strumenti per la PCR real-time, fare riferimento al manuale del corrispondente strumento.

Per istruzioni di programmazione dettagliate riguardanti l'uso del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 su specifici strumenti per la PCR real-time contattare il nostro servizio di assistenza tecnica.

### 9.1 Impostazioni

- Definire le seguenti impostazioni:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di ramping	Valore predefinito
Riferimento passivo	Nessuno

### 9.2 Rilevatori fluorescenti (coloranti)

- Definire i rilevatori fluorescenti (coloranti):

Rilevamento	Nome rilevatore	Reporter	Quencher
RNA Ebolavirus-specifico	Ebolavirus	FAM	(Nessuno)
RNA Marburgvirus-specifico	Marburgvirus	Cy5	(Nessuno)
Controllo interno	IC	JOE	(Nessuno)

### 9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

- Definire il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Fase	Ripetizioni ciclo	Acquisizione	Temperatura	Durata
Trascrittasi inversa	Attesa	1	-	55 °C	20:00 min
Denaturazione	Attesa	1	-	95 °C	02:00 min
Amplificazione	Cycling	45	-	95 °C	00:15 min
			√	58 °C	00:45 min
			-	72 °C	00:15 min

## 10. Analisi dei dati

Per informazioni di base riguardanti l'analisi dei dati su strumenti PCR real-time specifici, consultare il manuale dello strumento corrispondente.

Per istruzioni dettagliate riguardanti l'analisi dei dati del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 su strumenti PCR real-time diversi contattare il nostro servizio di assistenza tecnica.

## 10.1 Validità dei processi dei test diagnostici

### 10.1.1 Processo dei test diagnostici valido

Per un processo di test diagnostici **valido**, devono essere soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

ID controllo	RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0		
	FAM Canale di rilevazione	Cy5 Canale di rilevazione	JOE Canale di rilevazione
Controllo positivo Ebola virus	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
Controllo positivo Marburgvirus	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
Controllo negativo	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

### 10.1.2 Processo dei test diagnostici non valido

Un processo di test diagnostici **non è valido**, (i) se il processo non è stato completato o (ii) se una delle condizioni di controllo per un processo di test diagnostici **valido** non è stata soddisfatta.

In caso di un processo di test diagnostici **non valido**, ripetere il test usando gli acidi nucleici purificati rimasti o cominciare di nuovo dai campioni originali.

## 10.2 Interpretazione dei risultati

ID campione	FAM Canale di rilevazione	Cy5 Canale di rilevazione	JOE Canale di rilevazione	Interpretazione dei risultati
A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO*	Rilevato RNA Ebola virus-specifico.
B	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO*	Rilevato RNA Marburgvirus-specifico
C	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	Nessun RNA Ebola virus-specifico né Marburgvirusspecifico rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA Ebola virus- o Marburgvirus-specifico.
D	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	Inibizione PCR o errore del reagente. Ripetere il test dal campione originale o raccogliere e analizzare un nuovo campione.

\* La rilevazione del controllo interno nel canale di rilevazione JOE non è richiesta per risultati positivi né nel canale di rilevazione FAM né nel canale di rilevazione Cy5. Una carica alta di filovirus nel campione può portare a riduzione o assenza dei segnali del controllo interno.

## 11. Valutazione delle prestazioni

### 11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è definita come la concentrazione (copie per µl di eluito) di molecole di RNA *Ebolavirus* o *Marburgvirus* specifiche che possono essere rilevate con un tasso di positività di  $\geq 95\%$ . La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi di una serie di diluizioni di trascrittasi *in-vitro* MARV Popp, SEBOV Gulu e ZEBOV Gabon 2003 specifiche (IVT) di concentrazione nota.

I dati generati per il calcolo del 95% di LoD sono riassunti rispettivamente nelle tabelle 1, 2 e 3 riportate di seguito per MARV Popp, ZEBOV Gabon 2003 e SEBOV Gulu.

Tabella 1: Risultati della RT-PCR usati per il calcolo della sensibilità analitica per RNA MARV specifico del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0

MARV Popp				
Conc. input [copie/µl]	Numero di replicati	N° di positivi	Percentuale di successo [%]	Controllo interno
31,6	12	12	100	Valido
10	12	12	100	Valido
3,16	12	12	100	Valido
1,0	12	12	100	Valido
0,316	12	8	66,7	Valido
0,1	12	2	16,7	Valido
0,03	12	0	0	Valido
0,01	12	1	8,3	Valido
NTC	12	0	0	Valido

Tabella 2: Risultati della RT-PCR usati per il calcolo della sensibilità analitica per RNA ZEBOV specifico del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0

ZEBOV Gabon 2003				
Conc. input [copie/µl]	Numero di replicati	N° di positivi	Percentuale di successo [%]	Controllo interno
31,6	12	12	100	Valido
10	12	12	100	Valido
3,16	12	12	100	Valido
1,0	12	11	91,7	Valido
0,316	12	7	58,3	Valido
0,1	12	4	33,3	Valido
0,03	12	1	8,3	Valido
0,01	12	0	0	Valido
NTC	12	0	0	Valido

Tabella 3: Risultati PCR usati per il calcolo della specificità analitica per RNA SEBOV specifico del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0

SEBOV Gulu				
Conc. input [copie/μl]	Numero di replicati	N° di positivi	Percentuale di successo [%]	Controllo interno
31,6	12	12	100	Valido
10	12	12	100	Valido
3,16	12	7	58,3	Valido
1,0	12	1	8,3	Valido
0,316	12	0	0	Valido
0,1	12	0	0	Valido
0,03	12	0	0	Valido
0,01	12	0	0	Valido
NTC	12	0	0	Valido

La sensibilità analitica del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è stata determinata dall'analisi di precisione.

Per RNA MARV-specifico: 1,16 copie target/μl  
[intervallo di confidenza al 95%: 0,22 - 11,67 copie target/μl]

Per RNA ZEBOV-specifico: 1,39 copie target/μl  
[intervallo di confidenza al 95%: 0,69 - 5,32 copie target/μl]

Per RNA SEBOV-specifico: 6,75 copie target/μl  
[intervallo di confidenza al 95%: 4,25 - 24,58 copie target/μl]

## 11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR è garantita dall'accurata selezione 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 tutte le varianti note di Ebolavirus e Marburgvirus siano rilevate.

La specificità analitica del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 è stata valutata testando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da diversi patogeni che sono legati al Marburgvirus e all'Ebolavirus e/o possono causare sintomi simili.

Tabella 4: Organismi testati per dimostrare la specificità analitica del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0

Organismi	RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0		
	FAM (Target Ebola)	Cy5 (Target Marburg)	JOE (IC)
Virus encefalite giapponese	Negativo	Negativo	Valido
Virus encefalite Saint Louis	Negativo	Negativo	Valido
Virus del Nilo occidentale, NY99	Negativo	Negativo	Valido
Virus del Nilo occidentale , Uganda	Negativo	Negativo	Valido
Virus della febbre gialla	Negativo	Negativo	Valido
Virus encefalite della valle di Murray	Negativo	Negativo	Valido
Virus Zika	Negativo	Negativo	Valido
Virus encefalite da zecche	Negativo	Negativo	Valido
Virus Usutu	Negativo	Negativo	Valido
Virus Dengue 1	Negativo	Negativo	Valido
Virus Dengue 2	Negativo	Negativo	Valido
Virus Dengue 3	Negativo	Negativo	Valido
Virus Dengue 4	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite C	Negativo	Negativo	Valido
Virus del Nilo occidentale NY99 D	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite A	Negativo	Negativo	Valido
Virus dell'epatite E	Negativo	Negativo	Valido
CCHFV Afg09-2990	Negativo	Negativo	Valido
Virus Lassa Nig08-A37	Negativo	Negativo	Valido
Virus Lassa CSF	Negativo	Negativo	Valido
Virus Lassa Lib05-1580/121	Negativo	Negativo	Valido
Virus Lassa AV	Negativo	Negativo	Valido

Tabella 4 continua: Organismi testati per dimostrare la specificità analitica del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0

Organismi	RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0		
	FAM (Target Ebola)	Cy5 (Target Marburg)	JOE (IC)
Virus Junin XJ	Negativo	Negativo	Valido
Virus Machupo, Carvalho	Negativo	Negativo	Valido
Virus Sabia SPH114202	Negativo	Negativo	Valido
Virus Guanarito INH-95551	Negativo	Negativo	Valido
VSV Indiana	Negativo	Negativo	Valido
Virus febbre Rift-Valley MP 12	Negativo	Negativo	Valido
Virus Hantaan tipo 76-118	Negativo	Negativo	Valido
ZEBOV Gabon 2003	Positivo	Negativo	Valido
ZEBOV Mayinga	Positivo	Negativo	Valido
ZEBOV 2014/Gueckedou-C05	Positivo	Negativo	Valido
SEBOV Gulu	Positivo	Negativo	Valido
TAFV	Positivo	Negativo	Valido
RESTV	Positivo	Negativo	Valido
MARV Musoke	Negativo	Positivo	Valido
MARV Popp	Negativo	Positivo	Valido
MARV Leiden	Negativo	Positivo	Valido

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 non ha presentato attività crociata con nessuno degli organismi specificati.

### 11.3 Precisione

I dati di precisione del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 sono stati determinati 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 di variabilità sono espressi in termini di valore medio, deviazione standard, varianza e coefficiente di variazione basato su valori del ciclo soglia ( $C_t$ ). Sono stati analizzati un minimo di sei replicati per campione per la variabilità intra-assay, inter-assay e inter-lotto. La varianza totale è stata calcolata combinando le tre analisi.

Tabella 5: Dati di precisione per il sistema di rilevazione ZEBOV RNA-specifico del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0

Precisione	Concentrazione campione [copie/ $\mu$ l]	Valori $C_t$ medi	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Intra-Assay Variabilità	30	31,56	0,17	0,03	0,54
	10	32,80	0,12	0,01	0,36
Inter-Assay Variabilità	30	31,85	0,32	0,10	1,02
	10	33,07	0,34	0,12	1,04
Variabilità inter-Lotto	30	31,76	0,40	0,16	1,26
	10	33,03	0,44	0,20	1,35
Totale Varianza	30	31,70	0,35	0,12	1,10
	10	32,95	0,38	0,15	1,16

Tabella 6: Dati di precisione per il sistema di rilevazione MARV RNA-specifico del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0

Precisione	Concentrazione campione [copie/ $\mu$ l]	Valori $C_t$ medi	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Intra-Assay Variabilità	30	30,71	0,27	0,07	0,88
	10	31,82	0,25	0,06	0,80
Inter-Assay Variabilità	30	30,86	0,24	0,06	0,79
	10	32,06	0,32	0,10	0,99
Variabilità inter-Lotto	30	30,83	0,21	0,05	0,69
	10	32,03	0,30	0,09	0,93
Totale Varianza	30	30,79	0,23	0,05	0,75
	10	31,96	0,29	0,09	0,92

I dati di precisione generati per il sistema di rilevazione IC sono riassunti nelle tabelle 7 e 8 per campioni contenenti rispettivamente 30 e 10 copie virali target.

Tabella 7: Dati di precisione per il sistema di rilevazione IC del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 che analizza campioni con 30 copie target / $\mu$ l rispettivamente di ZEBOV e MARV

Precisione	30 copie/ $\mu$ l di	Valori $C_t$ medi	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay	ZEBOV	28,98	0,05	0,00	0,19
	MARV	28,90	0,09	0,01	0,32
Variabilità inter-assay	ZEBOV	29,32	0,36	0,13	1,23
	MARV	29,26	0,39	0,15	1,32
Variabilità inter-Lotto	ZEBOV	29,26	0,43	0,19	1,48
	MARV	29,22	0,43	0,18	1,47
Varianza totale	ZEBOV	29,16	0,37	0,14	1,29
	MARV	29,11	0,38	0,15	1,31

Tabella 8: Dati di precisione per il sistema di rilevazione IC del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 che analizza campioni con 10 copie target / $\mu$ l rispettivamente di ZEBOV e MARV

Precisione	10 copie/ $\mu$ l di	Valori $C_t$ medi	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione (%)
Variabilità intra-assay	ZEBOV	29,09	0,05	0,00	0,17
	MARV	29,02	0,07	0,01	0,26
Variabilità inter-assay	ZEBOV	29,41	0,34	0,12	1,16
	MARV	29,34	0,34	0,12	1,17
Variabilità inter-Lotto	ZEBOV	29,32	0,43	0,19	1,48
	MARV	29,28	0,41	0,17	1,40
Varianza totale	ZEBOV	29,24	0,37	0,14	1,26
	MARV	29,19	0,35	0,13	1,21



## 12. Limiti e precauzioni

- L'utilizzo di questo prodotto è limitato a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle tecniche della PCR real-time e alle procedure diagnostiche in *in-vitro*.
- Le buone pratiche di laboratorio sono essenziali affinché le prestazioni di questo dosaggio siano corrette. Dovrà essere prestata massima cura per conservare la purezza dei componenti del kit e la preparazione delle reazioni. Tutti i reagenti dovranno essere accuratamente monitorati per verificare la presenza di eventuali impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Procedure appropriate di raccolta campioni, trasporto, conservazione e processamento sono necessarie per garantire a questo test prestazioni ottimali.
- Questo test non deve essere usato direttamente sul campione. Prima di usare questo test, si dovranno adottare metodi di estrazione dell'acido nucleico appropriati.
- La presenza di inibitori della RT-PCR può determinare risultati falso negativi o non risultati non validi.
- Mutazioni potenziali nell'ambito delle regioni target del genoma virale coperte da primer e/o sonde del test possono impedire la rilevazione della presenza dei patogeni.
- Analogamente a ogni test diagnostico, i risultati del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i riscontri clinici e di laboratorio.

## 13. Controllo di qualità

In accordo con il Sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Altona Diagnostics GmbH, ogni lotto del kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR 1.0 viene testato in base a specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto.

## 14. Servizio di Assistenza tecnica

Per un supporto ai clienti, contattare il nostro servizio di assistenza tecnica:

<b>e-mail</b>	<b>support@altona-diagnostics.com</b>
<b>Telefono:</b>	<b>+49-(0)40-5480676-0</b>

## 15. Marchi commerciali e disclaimer

RealStar® (Altona Diagnostics GmbH); Mx 3005P™ (Stratagene); ABI Prism® (Applied Biosystems); LightCycler® (Roche); Rotor-Gene®, QIAamp® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens); CFX96™ (BIO-RAD).


I nomi registrati, i marchi commerciali, ecc. usati nel presente documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.

Il kit RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 è un kit diagnostico con marchio CE ai sensi della direttiva europea sulla diagnostica in *in-vitro* 98/79/CE.

Non disponibile in tutti i paesi.


© 2014 Altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.


## 16. Spiegazione dei simboli


 Dispositivo medico per la diagnostica *in-vitro*

 Codice prodotto

 Codice lotto


 Contenuto sufficiente per “n” test/reazioni (rxns)


 Limite di temperatura

 Versione

 Utilizzare fino a

 Attenzione

 Consultare le istruzioni per l'uso

 Produttore

## Note

