

IVD

Istruzioni per l'uso (italiano)

1 Destinazione d'uso

L'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 è un test qualitativo in vitro per il rilevamento specifico dell'RNA del virus dell'influenza A, del virus dell'influenza B e del virus dell'influenza A/H1N1 in escretati, tamponi, BAL (lavaggi broncoalveolari) o aspirati tracheali umani.

2 Campo d'applicazione

Il virus dell'influenza A, il virus dell'influenza B e il virus dell'influenza A/H1N1 sono gli agenti eziologici dell'influenza stagionale e appartengono alla famiglia degli Orthomyxoviridae. Il virus dell'influenza A/H1N1 (conosciuto anche come agente eziologico della cosiddetta "influenza suina") è un sottotipo del virus dell'influenza A. Molti altri patogeni delle vie respiratorie, quali ad es. i rhinovirus, il virus respiratorio sinciziale (RSV), i metapneumovirus umani, possono provocare quadri clinici molto simili. Il rilevamento biomolecolare dell'influenza viene considerato il gold standard in riferimento a sensibilità e specificità, e l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 consente di eseguire una delimitazione sicura ai fini della differenziazione diagnostica.

3 Principio del test

Il test è un sistema Real-Time PCR (reazione a catena della polimerasi in tempo reale) RT (a trascrittasi inversa), che utilizza primer specifici e sonde marcate per la trascrizione dell'RNA in cDNA, l'amplificazione e il rilevamento dell'RNA del virus dell'influenza A, del virus dell'influenza B e del virus dell'influenza A/H1N1.

Per assicurare che gli acidi nucleici isolati dal campione del paziente non contengano sostanze in grado di inibire la RT-PCR, durante l'isolamento degli acidi nucleici al campione viene aggiunto un controllo interno (IC). Tale IC viene trascritto nel cDNA, amplificato e rilevato nella stessa determinazione RT-PCR. In questo modo è possibile escludere risultati del test falsi negativi causati dall'inibizione della reazione RT-PCR. L'IC consente al contempo di attestare l'estrazione degli acidi nucleici dal campione del paziente.

Le sonde per il rilevamento degli acidi nucleici specifici dell'agente patogeno sono marcate con i coloranti reporter FAM (virus dell'influenza A), HEX (virus dell'influenza B) e ATTO Rho12 (virus dell'influenza A/H1N1), le sonde per il rilevamento del controllo interno con ATTO 647N. In questo modo nella stessa porzione di reazione è possibile rilevare simultaneamente tutte le sequenze target.

Il valore Ct (*cycle threshold*) descrive la parte della curva in cui la fluorescenza aumenta per la prima volta in misura esponenziale rispetto al valore di fondo.

4 Reagenti

4.1 Contenuto della confezione

I reagenti contenuti in una confezione sono sufficienti per 50 determinazioni.

Ogni set di reagenti contiene:

P&P MIX	150 µl di mix di primer e sonde per Respiratory Viral Panel 1 e controllo interno (tappo di colore verde)
ENZYME	600 µl mix di enzimi (tappo di colore bianco) Contiene trascrittasi inversa e DNA polimerasi. (Il componente è colorato di blu.)
CONTROL INT	250 µl di controllo interno (tappo incolore)
CONTROL +	170 µl di controllo positivo (tappo di colore rosso)
CONTROL -	2 x 1800 µl di controllo negativo (tappo di colore blu)
INSTRU	1 Istruzioni per l'uso

4.2 Reagenti, materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation per Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kit di isolamento degli acidi nucleici reperibile in commercio. Si raccomanda il seguente sistema di estrazione degli acidi nucleici: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Termociclatore in tempo reale. Si raccomanda il seguente termociclatore: Light Cycler® 480 II (Roche)
- Piastre e pellicole PCR da 96 pozzetti oppure tubi di reazione (PCR-clean), a seconda del termociclatore
- Micropipette con puntali monouso con filtro da 10 µl, 20 µl, 100 µl e 1000 µl

- Miscelatore a vortice
- Mini-centrifuga
- Se necessario, centrifuga per piastre
- Guanti monouso non talcati
- Blocco di raffreddamento

5 Conservazione e manipolazione

- Prima e dopo l'uso conservare i reagenti a una temperatura compresa tra -25°C e -18°C.
- Evitare la ripetizione delle operazioni di congelamento e scongelamento dei componenti (più di dieci volte). Si consiglia di aliquotare i componenti del test dopo il primo scongelamento.
- Durante le fasi di lavoro conservare i reagenti in luogo fresco (+2°C – +8°C).
- Durante l'esecuzione del test proteggere i componenti del kit dalla luce diretta del sole.
- Prima di iniziare il test scongelare completamente tutti i reagenti, miscelarli (brevemente con il miscelatore a vortice) e centrifugarli.
- Sulle confezioni è riportata una data di scadenza, oltre la quale decade la garanzia di qualità del prodotto.
- Il test deve essere eseguito esclusivamente da personale addestrato e autorizzato.
- In caso di modifiche sostanziali al prodotto oppure alle modalità di impiego da parte dell'utente, l'utilizzo può risultare non conforme alla destinazione d'uso stabilita da MIKROGEN.
- La contaminazione incrociata può condurre a risultati errati. Aggiungere con precauzione i campioni del paziente e i controlli, assicurarsi che le miscele di reazione non vengano trasferite in altri pozzetti.

6 Avvertenze e prescrizioni di sicurezza

- Utilizzare solo per la diagnostica in vitro.
- Tutti i campioni del paziente devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.
- Per l'intera durata dell'esecuzione del test indossare idonei guanti monouso.
- Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con idonee sostanze disinfettanti oppure devono essere smaltiti in conformità con le prescrizioni igieniche applicabili. Osservare le indicazioni del produttore relative alla concentrazione e ai tempi di incubazione.
- Non sostituire né mescolare i reagenti con reagenti di kit di lotti diversi, altri kit PCR MIKROGEN o con reagenti di altri produttori.
- Prima di eseguire il test, leggere e seguire scrupolosamente tutte le istruzioni per l'uso. Eventuali discrepanze con il protocollo di test riportato nelle istruzioni per l'uso possono determinare risultati errati.

7 Prelievo dei campioni e preparazione dei reagenti

7.1 Materiale campione

Il materiale di base per l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 è l'RNA, estratto da escretati, tamponi, BAL o aspirati tracheali di origine umana. La qualità della preparazione degli acidi nucleici influenza il risultato del test. È necessario accertarsi che il metodo di estrazione scelto sia compatibile con la tecnologia Real-Time PCR.

7.2 Estrazione degli acidi nucleici

Estrarre gli acidi nucleici dal campione del paziente e dal controllo negativo (NC). Si consiglia un volume iniziale di estrazione di 200 µl e un volume di eluizione di 50 µl. Le estrazioni da 400 µl di materiale iniziale eluite in 100 µl hanno mostrato risultati confrontabili. Seguire le istruzioni fornite dal produttore del kit di estrazione.

1. Scongelare il controllo interno (IC) (tappo incolore) e il controllo negativo (NC) (tappo di colore blu).
Assicurarsi che l'IC e il NC siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare rapidamente l'IC e il NC con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!
2. Durante l'estrazione di ogni campione del paziente e del NC, aggiungere 5 µl (riferiti a 50 µl di eluato) di IC. L'IC deve essere aggiunto alla mix di tamponi di lisi dei campioni e non direttamente

- al materiale campione. (Nota: l'IC non può essere utilizzato senza estrazione nella PCR!)
- Estrarre i campioni del paziente e il NC. (Nota: il NC non può essere utilizzato senza estrazione nella PCR!)
 - Il controllo positivo non viene estratto.

Si consiglia il seguente sistema di estrazione degli acidi nucleici, che è stato utilizzato per la valutazione delle prestazioni:

Sistema di estrazione	Volume campione	Volume eluizione
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Se si desidera utilizzare altri metodi di estrazione, si prega di rivolgersi al produttore per verificarne la compatibilità.

7.3 Preparazione della Master mix

- Scongela la mix di primer e sonde (tappo di colore verde) e la mix di enzimi (tappo di colore bianco). Durante questa operazione proteggere i reagenti dalla luce.
Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!
- Preparare la Master mix attenendosi al seguente schema di pipettaggio:

Componenti	Master mix per 1 reazione
Mix di primer e sonde	3 µl
Mix di enzimi	12 µl
Volume complessivo	15 µl

- Miscelare tutto la Master mix con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente.
- Preparare 15 µl di Master mix per ogni reazione PCR.

7.4 Preparazione della reazione PCR

- Scongela il controllo positivo (PC) (tappo di colore rosso).
Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!

Componenti	1 reazione
Master mix da 7.3	15 µl
Eluato campione o NC oppure il PC	10 µl

- Pipettare 10 µl di eluato campione nella Master mix.
- Pipettare 10 µl di controllo positivo (non preparato) nella Master mix.
- Pipettare 10 µl di eluato del controllo negativo nella Master mix.

Ogni ciclo deve contenere un controllo positivo e uno negativo!
Sigillare la piastra PCR con una pellicola ottica adesiva e chiudere i tubi di reazione con i relativi tappi.



Le piastre PCR e i recipienti di reazione devono essere miscelati nel miscelatore a vortice per almeno 10 secondi al numero di giri massimo e poi centrifugati brevemente.

8 Programmazione del termociclatore in tempo reale

L'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 è stato valutato con lo strumento LightCycler® 480 II (Roche).

8.1 Impostazione dei canali di rilevamento

	Virus dell'influenza A	Virus dell'influenza B	Virus dell'influenza A/H1N1	Controllo interno (IC)
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Colore	verde	giallo	arancione	rosso
Emissione	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Quencher	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]

Le indicazioni relative alle lunghezze d'onda dei canali di rilevamento si riferiscono al LightCycler® 480 II.
In caso d'impiego del LightCycler® 480 II è necessario utilizzare un kit Color Compensation fornito da Mikrogen.

8.2 Programma PCR

Retrotrascrizione	50°C	8 min
Denaturazione	95°C	3 min
Amplificazione	45 cicli	
• Denaturazione	95°C	10 sec
• Annealing/Estensione	60°C	45 sec

Per informazioni di base sulla programmazione dei diversi termociclatori in tempo reale, fare riferimento alle istruzioni del termociclatore in uso. Per informazioni specifiche sulla programmazione del termociclatore per Real-Time PCR utilizzando l'ampliCube Respiratory Viral Panel 1, contattare il produttore.

9 Risultati

La valutazione dei dati sul LightCycler® 480 II è avvenuta con il metodo *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validazione

- Il controllo negativo deve rimanere al di sotto del *valore soglia (threshold)*. In caso di contaminazione di questo controllo (andamento positivo della curva), il test risulta non valutabile.
- Il controllo positivo deve mostrare un andamento positivo della curva.
Il valore Ct del controllo positivo deve essere < 33. Un controllo positivo al di fuori di questo intervallo indica un problema nell'amplificazione.
- Il controllo interno in campioni negativi e nel controllo negativo deve mostrare un andamento positivo della curva. Una discrepanza nell'andamento della curva dell'IC in un campione negativo rispetto al controllo negativo indica un problema nell'estrazione e/o di inibizione della RT-PCR.

9.2 Valutazione

Segnali superiori al *valore soglia* vengono valutati come risultati positivi. I campi vuoti nella tabella sono considerati un risultato negativo.

	Virus dell'influenza A	Virus dell'influenza B	Virus dell'influenza A/H1N1	Controllo interno (IC)
Colore				
verde	positivo		positivo**	
giallo		positivo		
arancione			positivo**	
rosso				positivo*

* In caso di segnale positivo nei canali di rilevamento degli agenti patogeni, il segnale del controllo interno non è necessario per l'interpretazione del test. Un elevato carico di patogeni nel campione del paziente può condurre a un segnale minore o inesistente per il controllo interno.

** La sonda marcata con FAM (specifica per il virus dell'influenza A) rileva sia il virus dell'influenza A che il virus dell'influenza A/H1N1. La differenziazione dei due patogeni avviene tramite la sonda marcata con ATTO Rho12 nel canale arancione, specifica soltanto per il virus dell'influenza A/H1N1.

10 Limiti del metodo, limitazioni

- I risultati dei test devono essere sempre considerati nel contesto del quadro clinico del paziente. Le conseguenze terapeutiche dei rilevamenti devono essere determinate in considerazione dei dati clinici.
- Un risultato negativo del test per il virus dell'influenza A, il virus dell'influenza B e il virus dell'influenza A/H1N1 non può escludere un'infezione dai rispettivi agenti patogeni.

11 Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state determinate sulla base di campioni di pazienti definiti positivi e negativi.

Tabella 1: Campioni definiti positivi

ampliCube Respiratory Viral Panel 1	Virus dell'influenza A (n=20)	Virus dell'influenza B (n=20)	Virus dell'influenza A/H1N1 (n=18)
Negativo	0	0	0
Positivo	20	20	18
Sensibilità	100%	100%	100%

Tabella 2: Campioni definiti negativi

ampliCube Respiratory Viral Panel 1	Virus dell'influenza A (n=20)	Virus dell'influenza B (n=38)	Virus dell'influenza A/H1N1 (n=40)
Negativo	20	38	40
Positivo	0	0	0
Specificità	100%	100%	100%

11.2 Sensibilità analitica

Il limite di rilevabilità (LoD) dell'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 è stato determinato con serie di diluizioni a concentrazioni note di DNA plasmidico su un sistema LightCycler® 480 II (Roche). Il limite di rilevabilità del 95% è stato definito mediante analisi probit con il software CombiStats™ versione 5.0 (Consiglio d'Europa).

Tabella 3: Limite di rilevabilità (LoD)

	Virus dell'influenza A	Virus dell'influenza B	Virus dell'influenza A/H1N1
LoD Limite di rilevabilità del 95% Genoma/PCR	6,04 (3,14 – 17,98)	7,32 (4,11 – 19,83)	8,89 (5,61 – 17,76)

11.3 Specificità analitica

La ricerca in BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) mostra che le sonde e i primer selezionati dell'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 rilevano in modo specifico gli agenti patogeni selezionati. È stata inoltre determinata la specificità attraverso l'esame del DNA/RNA genomico di ulteriori batteri e virus patogeni per l'uomo.

Tabella 4: Batteri e virus testati per mostrare la specificità analitica dell'ampliCube Respiratory Viral Panel 1.

Batteri	Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Adenovirus di sierotipo 1 (C)
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenovirus di sierotipo 3 (B)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Bocavirus
<i>Escherichia coli</i>	Coronavirus 229 E
<i>Haemophilus influenzae</i>	Coronavirus HKU1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coronavirus MERS
<i>Legionella pneumoniae</i>	Coronavirus NL63
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Coronavirus OC43
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Coxsackievirus
<i>Neisseria meningitidis</i>	Citomegalovirus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Enterovirus 68
<i>Staphylococcus aureus</i>	Virus di Epstein-Barr
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Metapneumovirus umano A
	Virus del morbillo
	Parotite
	Parainfluenza 1
	Parainfluenza 2
	Parainfluenza 3
	Parainfluenza 4
	Parechovirus
	Virus respiratorio sinciziale A
	Virus respiratorio sinciziale B

Nessuno di questi campioni ha mostrato un segnale positivo. Le sonde e i primer utilizzati nell'ampliCube Respiratory Viral Panel 1 non hanno mostrato reazioni crociate con gli agenti patogeni elencati in Tabella 4. Il controllo interno (IC) è stato valido in tutti i test.

11.4 Equivalenza di diversi materiali campione

È stato determinato il coefficiente di variazione (CV) del valore Ct tra acqua ed estratto del rispettivo materiale campione dopo aggiunta di DNA plasmidico in concentrazione nota.

Tabella 5: Equivalenza di diversi materiali campione

	Virus dell'influenza A	Virus dell'influenza B	Virus dell'influenza A/H1N1
CV [%] (BAL, H ₂ O)	1,06	1,44	1,42
CV [%] (escreato, H ₂ O)	2,16	1,44	1,88
CV [%] (tampone, H ₂ O)	1,16	0,75	0,91

Il coefficiente di variazione (CV), basato sul valore Ct (*cycle threshold*) tra acqua ed estratti di acidi nucleici (raccolti dai diversi materiali campione), è stato per tutti i geni target $\leq 2,16\%$.

12 Riferimenti bibliografici

- Matthew J. Binnicker et. al. (2015): Direct Detection of Influenza A and B Viruses in Less Than 20 Minutes Using a Commercially Available Rapid PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2015, Volume 53, Number 7, doi:10.1128/JCM.00791-15
- Daniela Huzly et. al. (2016): Influenza A virus drift variants reduced the detection sensitivity of a commercial multiplex nucleic acid amplification assay in the season 2014/15. *Arch Virol*, June 2016, DOI 10.1007/s00705-016-2930-8
- Jin Li et. al. (2013): A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection of Sixteen Human Respiratory Virus Types/Subtypes. *BioMed Research International*, June 2013, Volume 2013, Article ID 327620, 8 pages,

- Xuezheng Ma et. al. (2015): A multiplex PCR assay for the detection of five influenza viruses using a dual priming oligonucleotide system. *BMC Infectious Diseases*, 15:93, 2015, DOI 10.1186/s12879-015-0818-y
- Ozeas Galeno da rocha Neto et. al. (2013): Update on viral community-acquired pneumonia. *Revista da Associação Médica Brasileira*, Sept. 2012, 59(1):78-84
- Jayne Parker et. al. (2015): Analytical Sensitivity Comparison between Singleplex Real-Time PCR and a Multiplex PCR Platform for Detecting Respiratory Viruses. *PLoS ONE*, Nov. 2015, 10(11): e0143164. doi:10.1371/journal.pone.0143164
- Andrew T. Pavia (2011): Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2011;52(S4):S284-S289
- Leo L.M. Poon et. al. (2009): Molecular Detection of a Novel Human Influenza (H1N1) of Pandemic Potential by Conventional and Real-Time Quantitative RT-PCR Assays. *Clinical Chemistry*, 55:8, 1555-1558, 2009, Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2009.130229
- Fanny Renois et. al. (2010): Rapid Detection of Respiratory Tract Viral Infections and Coinfections in Patients with Influenza-Like Illnesses by Use of Reverse Transcription-PCR DNA Microarray Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2010, Volume 48, No. 11, p. 3836-3842, doi:10.1128/JCM.00733-10
- Aimee K. Zaas et. al. (2009): Gene Expression Signatures Diagnose Influenza and Other Symptomatic Respiratory Viral Infection in Humans. *Cell Host Microbe*, Sept. 2009; 6(3): 207-217, doi:10.1016/j.chom.2009.07.006

Su richiesta saremo lieti di inviarvi ulteriore documentazione.

13 Spiegazione dei simboli

	Contiene reattivi sufficienti per <n> determinazioni Numero degli inserimenti
P&P MIX	Mix di primer e sonde
ENZYME	Mix di enzimi
CONTROL INT	Controllo interno
CONTROL +	Controllo positivo
CONTROL -	Controllo negativo
INSTRU	Istruzioni per l'uso
	Osservare le istruzioni per l'uso
CONT	Contenuto, contiene
IVD	Test in vitro
LOT	Numero di lotto/versione
REF	Numero di catalogo
	Utilizzare entro Data di scadenza
	Conservare a una temperatura compresa tra x°C e y°C
	Produttore

14 Dati sul produttore e sulla versione

ampliCube Respiratory Viral Panel 1	Articolo n° 50102
Istruzioni per l'uso valido da	GAACRV1002IT 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de

