



ELITechGroup S.p.A.  
C.so Svizzera, 185  
10149 Torino ITALIA

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11  
E-mail: [emd.support@elitechgroup.com](mailto:emd.support@elitechgroup.com)  
Sito internet: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

## AVVERTENZA del 13/10/2020

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

### «WNV ELITe MGB Kit» Ref. RTS100PLD

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Cambiamento minore nella descrizione dell'Uso Previsto del prodotto. L'Uso previsto non cambia.*

Composizione, utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.

### NOTA BENE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



**WNV ELITe MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e  
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS100PLD

**WNV ELITe MGB® Kit**  
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e  
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS100PLD



**SOMMARIO**

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHiesto NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHiesti	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 5
PROCEDURA	pag. 7
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 14
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 15
BIBLIOGRAFIA	pag. 21
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 22
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 24
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 24

**USO PREVISTO**

Il prodotto «WNV ELITe MGB® Kit» è un saggio quantitativo di trascrizione inversa e amplificazione degli acidi nucleici per la rilevazione e quantificazione dell'RNA del **flavivirus umano West Nile Virus** (WNV, Lineage 1a, compresi i ceppi Mediterranei, e Lineage 2) in campioni di RNA estratto da Sangue Intero raccolto in EDTA, Liquido Cefalorachidiano (CSF), Urina raccolta senza conservanti.

Il prodotto trova impiego nella diagnosi e nel monitoraggio dell'infezione da WNV, insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio. NON sono disponibili dati di validazione nel prodotto per l'esecuzione del test con matrici biologiche diverse da quelle validate o per applicazioni differenti da quelle riportate in questo manuale di istruzioni per l'uso.

**PRINCIPIO DEL SAGGIO**

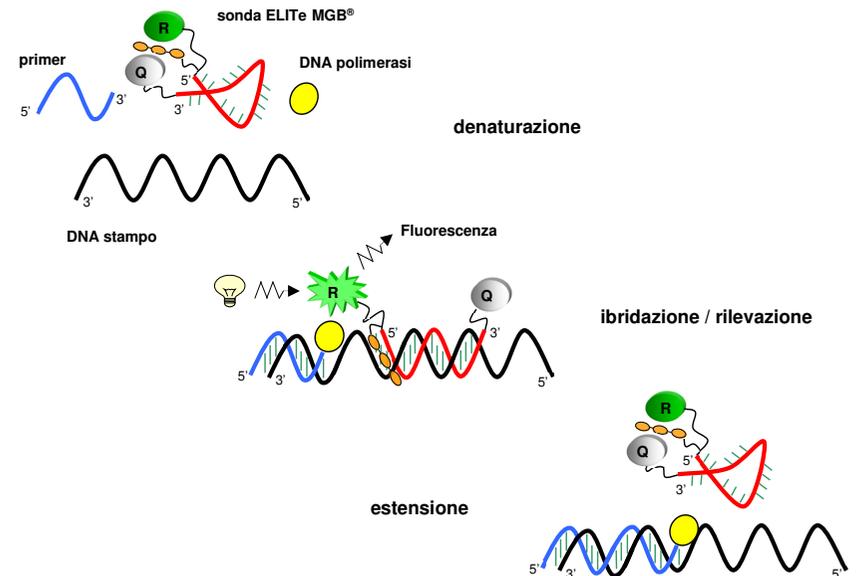
Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time (metodica one-step) in micropiastre con un termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza (thermal cycler per amplificazione real time).

In ogni pozzetto si effettua una reazione di trascrizione inversa e amplificazione specifica per una regione del gene **NS5 di WNV**, codificante una proteina non strutturale, e per una regione dell'RNA genomico del **fago MS2** (Controllo Interno di inibizione) utilizzando direttamente l'RNA estratto dai campioni in esame. La sonda con tecnologia ELITe MGB® specifica per WNV marcata con il fluoroforo FAM è attivata quando ibrida con il prodotto specifico della reazione di amplificazione per WNV. La sonda con tecnologia ELITe MGB® specifica per il Controllo Interno marcata con il fluoroforo AP525 (equivalente a VIC) è attivata quando ibrida con il prodotto della reazione di amplificazione per il Controllo Interno. L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare del prodotto specifico della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dall'apparecchio. L'elaborazione dei dati permette di rilevare e quantificare la presenza e il titolo dell'RNA del WNV nel campione di partenza

A fine sessione è possibile eseguire l'analisi della curva di dissociazione (melting curve) ed identificare la temperatura di dissociazione (melting temperature) per confermare la presenza del target corretto o identificare la presenza di mutazioni.

La validazione del saggio è stata eseguita su strumenti 7300 Real Time PCR System e 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument.

Nella figura di seguito è illustrato in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda con tecnologia ELITe MGB®. Notare come la sonda non è idrolizzata durante il ciclo di amplificazione e può quindi essere utilizzata per l'analisi della curva di dissociazione.



**DESCRIZIONE DEL PRODOTTO**

Il prodotto «WNV ELITe MGB® Kit» fornisce i seguenti componenti:

• **WNV PreMix**

Una miscela di oligonucleotidi per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in due provette** (tappo NEUTRO). Ogni provetta contiene **270 µL** di soluzione, sufficiente per **50 reazioni**.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per WNV (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per una regione del **gene NS5 di WNV**.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per il Controllo Interno (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo AP525, equivalente a VIC, e inattivata da un quencher non fluorescente) sono specifici per una regione dell'RNA genomico del **fago MS2**.

La miscela di reazione fornisce anche il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del CY5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza.

• **PCR MasterMix**

Una miscela ottimizzata di reagenti per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in due provette** (tappo NEUTRO). Ogni provetta contiene **820 µL** di soluzione, sufficiente per **50 reazioni**.

La miscela di reazione fornisce il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati e l'enzima Taq DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

• **RT EnzymeMix**

Una miscela ottimizzata di enzimi per la trascrizione inversa in una soluzione stabilizzante, **prealiquotata in due provette** (tappo NERO). Ogni provetta contiene **20 µL** di soluzione, sufficiente per **50 reazioni**.

La miscela fornisce gli enzimi per la trascrizione inversa.

Il prodotto consente di effettuare **100 determinazioni**, standard e controlli compresi.

**MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO**

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
WNV PreMix	miscela di oligonucleotidi di innesco e di sonde Tappo NEUTRO	2 x 270 µL	-
PCR MasterMix	miscela di reagenti ottimizzati per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time Tappo NEUTRO	2 x 820 µL	-
RT EnzymeMix	enzima trascrittasi inversa Tappo NERO	2 x 20 µL	-

**MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO**

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Miscelatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Microprovetta per biologia molecolare in polipropilene da 1,5 mL.
- Acqua ultrapura per biologia molecolare.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument calibrato come previsto dal fabbricante.

**ALTRI PRODOTTI RICHIESTI**

I reagenti per l'estrazione dell'RNA dai campioni da analizzare, il Controllo Interno di estrazione e di inibizione, le micropiastre per l'amplificazione, il Controllo Positivo di amplificazione e gli DNA Standard a quantità nota **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione automatica dell'RNA dai campioni è richiesto l'impiego del prodotto generico «**ELITe STAR 200 Extraction Kit**» (codice INT011EX, ELITechGroup S.p.A.), kit di estrazione per l'estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici con lo strumento «**ELITe STAR**» (codice INT010, ELITechGroup S.p.A.).

Come controllo di estrazione e di inibizione è richiesto l'impiego del prodotto generico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., codice CTCPE), DNA plasmidico ed RNA fagico amplificati dalle reazioni di Controllo Interno.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7300 Real-Time PCR System, si consiglia l'impiego del prodotto generico «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC01) micropiastre con pozzetti da 0,2 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, si consiglia l'impiego del prodotto generico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC02) micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia richiesto un risultato qualitativo dell'analisi è necessario l'impiego del prodotto «**WNV - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., codice CTR100PLD).

Nel caso sia richiesto un risultato quantitativo dell'analisi è necessario l'impiego del prodotto «**WNV ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., codice STD100PLD), quattro diluizioni di DNA plasmidico a quantità nota per ottenere la curva standard.

**CAMPIONI E CONTROLLI**

**Campioni**

Questo prodotto deve essere utilizzato con **RNA estratto** dai seguenti campioni clinici: Sangue Intero raccolto in EDTA, Liquido Cefalorachidiano (CSF), Urina raccolta senza conservanti.

Questo prodotto deve essere utilizzato aggiungendo direttamente l'**RNA estratto** (fino a 300 ng) alla reazione di trascrizione inversa e amplificazione real time (metodica one step).

**Sangue intero raccolto in EDTA**

I campioni di Sangue Intero destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di quattro ore; altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di due giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

**Liquido Cefalorachidiano**

I campioni di Liquido Cefalorachidiano destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di quattro ore; altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di due giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

**Urina**

I campioni di Urina destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in contenitori senza conservanti secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a temperatura ambiente (+ 18 / + 25 °C) e conservati a temperatura ambiente (+ 18 / + 25 °C) per un massimo di quattro ore altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di due giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi. Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Il congelamento dei campioni di urine causa spesso la formazione di precipitati che possono interferire con le fasi successive della metodica: per l'estrazione utilizzare solo il sovrantante.

**Nota bene:** quando si esegue l'estrazione dell'RNA da campioni di Sangue Intero, Liquido Cefalorachidiano o Urina con il kit «**ELITe STAR 200 Extraction Kit**» e lo strumento «**ELITe STAR**» con il **software versione 3.4.13** (o superiore), utilizzare il protocollo di estrazione **UUNI\_E100S200\_ELI** che processa 200 µL di campione ed eluisce l'RNA estratto in 100 µL. I campioni nel tubo primario possono essere caricati direttamente sullo strumento «**ELITe STAR**». È sempre richiesto un volume minimo di 700 µL per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di controllo interno **CPE** nel tubo della soluzione Proteinase-Carrier come indicato nel manuale di istruzioni per l'uso del kit di estrazione. Per la procedura di estrazione seguire le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit di estrazione.

#### Sostanze interferenti

L'RNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, etanolo o propan-2-olo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di RNA estratto superiori a 300 ng per reazione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

Quantità di DNA genomico umano elevate nell'RNA estratto dal campione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

#### Controlli di amplificazione

È assolutamente necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione per il controllo negativo e una reazione per il controllo positivo.

Per il controllo negativo utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita nel prodotto) da aggiungere alla reazione al posto dell'RNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto «**WNV ELITe Standard**» o il prodotto «**WNV - ELITe Positive Control**».

#### Controlli di qualità

È consigliato convalidare l'intera procedura di analisi di ciascuna sessione, estrazione trascrizione inversa ed amplificazione, utilizzando un campione negativo e un campione positivo già testati oppure del materiale di riferimento calibrato.

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

**Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso *in vitro*.**

#### Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Il materiale che viene a contatto con i campioni biologici deve essere trattato con ipoclorito di sodio al 3% per almeno 30 minuti oppure trattato in autoclave a 121 °C per un'ora prima di essere smaltito.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali usati per effettuare il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti secondo le opportune regole di sicurezza. Il materiale monouso combustibile deve essere incenerito. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dell'eliminazione.

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / la faccia.

Non pipettare a bocca alcuna soluzione.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.

Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.

Eliminare i reagenti avanzati ed i rifiuti secondo le norme vigenti.

Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.

Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.

Rispettare la data di scadenza del prodotto.

Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

#### Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici, richiedono personale competente e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, in particolare a causa della degradazione degli acidi nucleici dei campioni o della contaminazione dei campioni da parte di prodotti di amplificazione.

È necessario disporre di aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai introdurre un prodotto di amplificazione nell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

È necessario disporre di camici, guanti e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai trasferire camici, guanti e strumenti dall'area per l'amplificazione/ rilevazione dei prodotti di amplificazione all'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

I campioni devono essere dedicati esclusivamente a questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Provette contenenti campioni diversi non devono mai essere aperte contemporaneamente. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I reagenti devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. I reagenti necessari per l'amplificazione devono essere preparati in modo da essere utilizzati in una singola sessione. Le pipette utilizzate per manipolare i reagenti devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per gli aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I prodotti di amplificazione devono essere manipolati in modo da limitarne al massimo la dispersione nell'ambiente per evitare la possibilità di contaminazioni. Le pipette utilizzate per manipolare i prodotti di amplificazione devono essere dedicate solo a questo uso.

#### Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

##### WNV PreMix

La **WNV PreMix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

La **WNV PreMix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **cinque volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

##### PCR MasterMix

La **PCR MasterMix** deve essere conservata a -20 °C.

La **PCR MasterMix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **cinque volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

##### RT EnzymeMix

L' **RT EnzymeMix** deve essere conservata a -20 °C.

L' **RT EnzymeMix** non deve rimanere esposta a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

**PROCEDURA**

**Impostazione della sessione di amplificazione real time**

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione)

Se si utilizza uno strumento **7300 Real-Time PCR System**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per WNV con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "WNV";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per MS2 con il "reporter" = "VIC" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "IC";
- per ciascun pozzetto in uso della micropietra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "ROX" (AP593 è usato invece del ROX, per la normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campioni, controllo negativo di amplificazione, standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni oppure stampare l'organizzazione della micropietra. Il **Piano di lavoro** dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

**Nota bene:** per la quantificazione del titolo del cDNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** (10<sup>5</sup> copie, 10<sup>4</sup> copie, 10<sup>3</sup> copie, 10<sup>2</sup> copie) per ottenere la **Curva standard**.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

**Nota bene:** l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di **ibridazione a 60 °C**.

- modificare i tempi come indicato nella tabella "**Ciclo termico**";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare un volume della reazione pari a **30 µL**;
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40 °C a 80 °C**.

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Retrotrascrizione	50 °C	20 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	5 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.
Dissociazione (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	30 sec.
	80 °C	15 sec.

Se si utilizza uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification" e impostare "Run mode: Fast 7500";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per WNV con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "WNV";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per MS2 con il "reporter" = "VIC" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "IC";
- per ciascun pozzetto in uso della micropietra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "CY5" (AP593 è usato invece del CY5, per la normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campioni, controllo negativo di amplificazione, standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni. Il Piano di lavoro dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

**Nota bene:** per la determinazione del titolo del DNA nel campione di partenza è necessario allestire una serie di reazioni con i **Q - PCR Standard** (10<sup>5</sup> copie, 10<sup>4</sup> copie, 10<sup>3</sup> copie, 10<sup>2</sup> copie) per ottenere la **Curva standard**.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

**Nota bene:** l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di **ibridazione a 60 °C**.

- modificare i tempi come indicato nella tabella "**Ciclo termico**";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare un volume di reazione pari a **30 µL**;
- opzionale: aggiungere la fase di dissociazione (Add Dissociation Stage) e impostare le temperature da **40 °C a 80 °C**.

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Retrotrascrizione	50 °C	20 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	5 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	94 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.
Dissociazione (opzionale)	95 °C	15 sec.
	40 °C	1 min.
	80 °C	15 sec.
	60 °C	15 sec.

**Allestimento dell'amplificazione real time**

(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare e scongelare a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette con i campioni da analizzare. Mescolare con vortex per 10 secondi, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **WNV PreMix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **50 reazioni**. Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi per tre volte, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;

- prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **PCR MasterMix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **50 reazioni**. Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi per tre volte, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo NERO) necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **50 reazioni**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio.

**Nota bene:** L' **RT EnzymeMix** non deve rimanere esposto a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

- prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **WNV Q - PCR Standard** o le provette di **WNV - Positive Control**. Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo;
- prelevare l'**Amplification microplate** che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.
- prelevare l'**Amplification Sealing Sheet** che sarà utilizzato nella sessione facendo attenzione a maneggiarlo con guanti senza polvere e a non danneggiarlo.
- preparare una microprovetta per biologia molecolare in polipropilene da 1,5 mL (non fornite nel kit) per la miscela completa di reazione **WNV Q - PCR Mix** e marcarla in modo riconoscibile con un pennarello indelebile;
- calcolare i volumi dei tre componenti forniti nel kit necessari per preparare la miscela completa di reazione **WNV Q - PCR Mix** in base al numero di campioni da analizzare come descritto nella tabella presentata di seguito;

**Nota bene:** Per il calcolo dei volumi dei tre componenti è necessario definire il numero N di reazioni della sessione di lavoro sommando al numero dei campioni clinici da analizzare, un controllo negativo di amplificazione, quattro Q - PCR Standard e una reazione in più come margine di sicurezza.

Numero reazioni	WNV PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	5 µL	15 µL	0,3 µL
N	N x 5 µL	N x 15 µL	N x 0,3 µL

- preparare la miscela completa di reazione **WNV Q - PCR Mix** trasferendo nel tubo dedicato i volumi calcolati dei tre componenti.
- mescolare **con vortex a bassa velocità** per tre volte per circa 10 secondi, centrifugare la provetta per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenere in ghiaccio.

**Nota bene:** La miscela completa di reazione deve essere utilizzata entro 30 minuti. La miscela completa di reazione **non può essere conservata**.

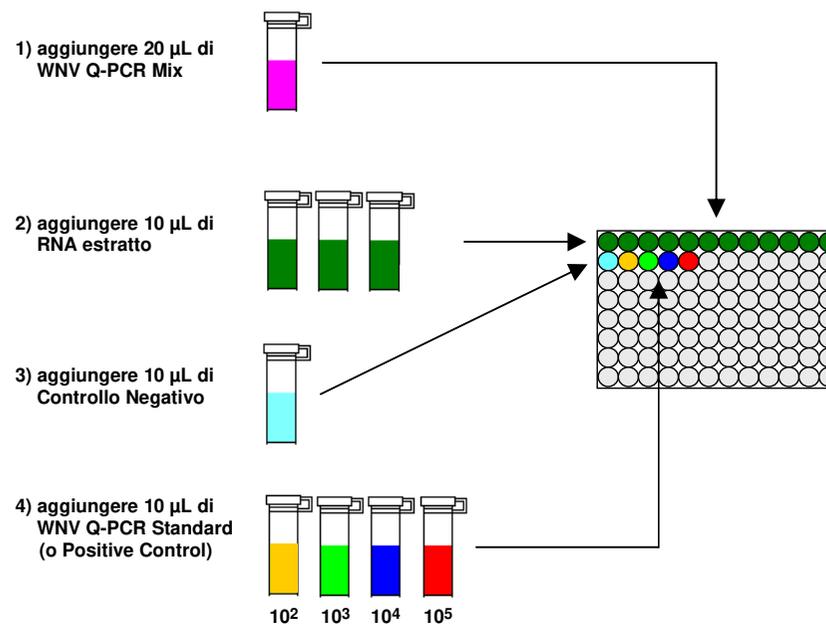
Allestire le reazioni come descritto di seguito:

1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL** di miscela completa di reazione **WNV Q - PCR Mix** nei pozzetti dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.
2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **RNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente il campione pipettando per tre volte l'**RNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **RNA estratti**.
3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **Acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente il controllo negativo pipettando per tre volte l'**Acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

4. In base al tipo di risultato richiesto (qualitativo o quantitativo), seguire una delle due opzioni:
  - Quando è richiesto un risultato qualitativo dell'analisi (rilevazione del RNA di WNV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **WNV - Positive Control** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **WNV - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie.
  - Quando è richiesto un risultato quantitativo dell'analisi (quantificazione del RNA di WNV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL** di **WNV Q - PCR Standard 10<sup>2</sup>** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente lo standard pipettando per tre volte il **WNV Q - PCR Standard 10<sup>2</sup>** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie. Procedere allo stesso modo con i **WNV Q - PCR Standard 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>**
5. Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet**.
6. Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per esempio. "anno-mese-giorno-WNV-EGSpA").

**Nota bene:** Al termine del ciclo termico l'**Amplification microplate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata in modo da non generare contaminazioni ambientali. **Non sollevare mai l'Amplification Sealing Sheet dall'Amplification microplate** in modo da evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nella figura di seguito è illustrata in sintesi la procedura di allestimento delle reazioni di amplificazione per l'analisi quantitativa di 12 campioni.



#### Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per WNV (detector FAM "WNV") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno (detector VIC "IC") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Prima di eseguire l'analisi, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- impostare manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo (Baseline)** dal ciclo 6 al ciclo 15;

**Nota bene:** Nel caso di un campione positivo ad alto titolo di WNV, la fluorescenza FAM della sonda specifica per WNV può cominciare a crescere prima del ciclo 15. In questo caso l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo** deve essere adattato dal ciclo 6 al ciclo in cui la fluorescenza FAM comincia a crescere come rilevato dal software dello strumento (Results > Component).

Se si è utilizzato uno strumento **7300 Real-Time PCR System:**

- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "WNV" a **0,1**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "IC" a **0,05**.

Se si è utilizzato uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument:**

- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector FAM "WNV" a **0,1**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "IC" a **0,1**.

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche nella reazione di amplificazione e il valore **Soglia** di fluorescenza sono utilizzati per determinare il **Ciclo Soglia (Ct, Threshold cycle)**, cioè il ciclo in cui è stato raggiunto il valore **Soglia** di fluorescenza.

#### Controllo Positivo o Q-PCR Standard

Nella reazione di amplificazione con il **Positive Control o Q - PCR Standard 10<sup>5</sup>**, il valore del **Ct** per WNV (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Positive Control (o Q - PCR Standard 10 <sup>5</sup> ) detector FAM "WNV"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control o Q-PCR Standard 10<sup>5</sup>** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)** per WNV, non è stata rilevata in modo corretto la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o del controllo positivo, degradazione della miscela di reazione o del controllo positivo, impostazione errata della posizione del controllo positivo, impostazione errata del ciclo termico, vedi "Problemi e Soluzioni") che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

#### Controllo Negativo

Nella reazione di amplificazione del **Controllo negativo**, il valore di **Ct** per WNV (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Controllo negativo detector FAM "WNV"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct Non determinato	NEGATIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Controllo negativo** è diverso da **Ct Non determinato (Undetermined)** per WNV, è stata rilevata la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione, vedi "Problemi e Soluzioni") che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

#### Campioni

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per WNV è utilizzato per rilevare la presenza di RNA bersaglio, mentre il valore di **Ct** per il Controllo Interno è utilizzato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

**Nota bene:** Verificare con il software dello strumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il **Ct** sia determinato da un rapido e regolare incremento dei valori di fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento graduale del segnale di fondo (fondo irregolare o elevato).

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima da 450 a 200 copie di WNV RNA per millilitro, corrispondenti ai genomi Equivalenti per millilitro (Limite di Rilevazione del prodotto, vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I risultati come **Ct** delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** (Results > Report) sono utilizzati come descritto nella tabella seguente:

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	RNA di WNV
detector FAM "WNV"	detector VIC "IC"			
Ct Non determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	non idoneo	non valido	-
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, negativo	NON RILEVATO
Ct Determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	idoneo	valido, positivo	RILEVATO
	Ct ≤ 35	idoneo	valido, positivo	RILEVATO

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per WNV e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente l'RNA del Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di retrotrascrizione e amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione del RNA del controllo interno, perdita dell'RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto, vedi paragrafo "Problemi e soluzioni") che possono causare risultati errati e falsi negativi. Il campione non è idoneo, il saggio non è valido e deve essere ripetuto a partire dall'estrazione di un nuovo campione.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per WNV e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, l'RNA di WNV non è stato rivelato nell'RNA estratto dal campione ma non si può escludere che l'RNA di WNV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni"). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

**Nota bene:** Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di RNA di WNV, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un Ct > 35 o Ct Non determinato. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza dell'RNA di WNV. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

#### Analisi quantitativa dei risultati

Dopo avere eseguito la procedura per l'analisi qualitativa dei risultati è possibile svolgere l'analisi quantitativa dei risultati relativi ai campioni positivi.

### Curva standard

Nelle reazioni di amplificazione con i **Q - PCR Standard**, i valori di **Ct** sono utilizzati per calcolare la **Curva standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione come descritto nella tabella seguente:

Curva Standard detector FAM "WNV"	Intervallo di accettabilità	Amplificazione / Rilevazione
Coefficiente di Correlazione (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRETTA

Se il valore del **Coefficiente di correlazione (R2)** non rientra nei limiti, non è stata rilevata in modo corretto la presenza del DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (preparazione errata della miscela di reazione, dispensazione errata della miscela di reazione o dello standard, degradazione della sonda o dello standard, impostazione errata della posizione dello standard, impostazione errata del ciclo termico, vedi "Problemi e Soluzioni") che possono causare risultati non corretti e falsi negativi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

### Campioni

I valori di **Ct** per WNV nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione** e la **Curva standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione sono utilizzati per calcolare la **Quantità (Quantity)** di RNA bersaglio presente nelle reazioni di amplificazione relative ai campioni.

Questo prodotto è stato testato con campioni a concentrazione da 1.000.000 a 316 copie di RNA di Enterovirus per millilitro, corrispondenti ai genomi Equivalenti per millilitro (intervallo di misurazione lineare del prodotto, vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I risultati (**Quantità**) relativi a ciascun **campione** sono utilizzati per calcolare i genomi Equivalenti (**gEq**) di WNV presenti nel campione di partenza (**Nc**) secondo questa formula:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{V_e \times \text{Quantità}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Dove:

**Vc** è la quantità del campione usato nell'estrazione **espresso in mL**;

**Ep** è l'efficienza della procedura (estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione) **espressa in decimali**,

**Ve** è il volume totale ottenuto dall'estrazione **espresso in µL**,

**Va** è il volume del prodotto di estrazione usato nella reazione di trascrizione inversa ed amplificazione **espresso in µL**,

**Quantità** è il risultato della reazione di amplificazione relativa al campione **espresso in gEq per reazione**.

Quando si utilizza il sistema di estrazione «**ELITe STAR**» con campioni di Sangue Intero e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per «ELITe STAR» e Sangue Intero
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 66,7 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizza il sistema di estrazione «**ELITe STAR**» con campioni di Liquido Cefalorachidiano o Urina e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per «ELITe STAR» e Liquido Cefalorachidiano o Urina
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 50 \times \text{Quantità}$

### LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto l'RNA estratto dai seguenti campioni clinici: Sangue Intero raccolto in EDTA, Liquido Cefalorachidiano (CSF), Urina.

Non utilizzare con questo prodotto l'RNA estratto da campioni eparinati: l'eparina inibisce la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici e causa risultati non validi.

Non utilizzare con questo prodotto RNA estratto contaminato da emoglobina, etanolo o propan-2-olo: queste sostanze inibiscono la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

Quantità di RNA estratto superiori a 300 ng per reazione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici.

Non utilizzare con questo prodotto RNA estratto contenente elevate quantità di DNA genomico umano che possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici.

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni del prodotto con RNA estratto dai seguenti campioni clinici: plasma raccolto in EDTA.

Non sono disponibili dati riguardo eventuali fenomeni di inibizione da parte di farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni; per evitare risultati errati è quindi necessario porre particolare cura durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni fornite con i prodotti per l'estrazione degli acidi nucleici.

La metodica di amplificazione real time degli acidi nucleici utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni clinici positivi per WNV, dei controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo con una buona pratica delle tecniche di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni fornite in questo manuale.

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e aree di lavoro adeguate alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato per le procedure di biologia molecolare, come l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici per evitare risultati errati.

Questo prodotto richiede aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione per evitare risultati falsi positivi.

A causa delle differenze intrinseche alle diverse tecnologie, si raccomanda di eseguire studi di correlazione per stimare queste differenze prima di passare a un nuovo prodotto.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'RNA del WNV non è stato rilevato nel prodotto della trascrizione inversa ottenuto dall'RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA del WNV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi "Caratteristiche delle prestazioni"); in questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

Un risultato non valido ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente l'RNA del Controllo Interno; in questo caso l'analisi del campione dovrà essere ripetuta a partire dall'estrazione con possibili ritardi nell'ottenimento del risultato.

Eventuali polimorfismi nelle regioni del genoma del patogeno in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e la sonda del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione dell'RNA del WNV.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi con questo prodotto. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari, come le diagnosi di urgenza, può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

**CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

**Limite di Rilevazione (LoD)**

Il Limite di Rilevazione del saggio è stato verificato utilizzando un pannello di diluizioni di WNV in Sangue Intero raccolto in EDTA. Il pannello è stato preparato con Sangue Intero negativo per l'RNA di WNV positivamente con il materiale di riferimento calibrato e certificato QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) di WNV lineage 1a (ceppo NY99). Il pannello presentava concentrazioni da 562 copie / mL a 10 copie / mL. Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 24 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

<b>Limite di Rilevazione WNV lineage 1a in Sangue Intero con «ELITe STAR»</b>			
Intervallo di confidenza del 95%			
		valore inferiore	valore superiore
<b>LoD (95% positività)</b>	<b>447 copie / mL</b>	310 copie / mL	798 copie / mL

Il Limite di Rilevazione del saggio è stato verificato utilizzando due pannelli di diluizioni di WNV in Urina raccolta senza conservanti. I pannelli sono stati preparati con Urina negativa per l'RNA di WNV positivamente con il materiale di riferimento calibrato e certificato QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) di WNV lineage 1a (ceppo NY99) e lineage 2 (ceppo Heja). I pannelli presentavano concentrazioni da 316 copie / mL a 10 copie / mL. Ciascun campione dei pannelli è stato impiegato in 24 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

<b>Limite di Rilevazione WNV lineage 1a in Urina con «ELITe STAR»</b>			
Intervallo di confidenza del 95%			
		valore inferiore	valore superiore
<b>LoD (95% positività)</b>	<b>318 copie / mL</b>	228 copie / mL	554 copie / mL

<b>Limite di Rilevazione WNV lineage 2 in Urina con «ELITe STAR»</b>			
Intervallo di confidenza del 95%			
		valore inferiore	valore superiore
<b>LoD (95% positività)</b>	<b>282 copie / mL</b>	188 copie / mL	545 copie / mL

Il Limite di Rilevazione del saggio è stato verificato utilizzando un pannello di diluizioni di WNV in CSF. Il pannello è stato preparato con CSF negativo per l'RNA di WNV positivamente con materiale di riferimento calibrato e certificato QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) di WNV lineage 1a (ceppo NY99). Il pannello presentava concentrazioni da 316 copie / mL a 10 copie / mL. Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 24 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

<b>Limite di Rilevazione WNV lineage 1a in CSF con «ELITe STAR»</b>			
Intervallo di confidenza del 95%			
		valore inferiore	valore superiore
<b>LoD (95% positività)</b>	<b>201 copie / mL</b>	145 copie / mL	345 copie / mL

**Intervallo di misurazione lineare**

L'Intervallo di misurazione lineare del saggio è stato valutato utilizzando tre pannelli di diluizioni di WNV in Sangue Intero, Urina e CSF. I pannelli sono stati preparati con matrici negative per l'RNA di WNV positivate con il materiale di riferimento calibrato e certificato QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) di WNV lineage 1a (ceppo NY99) e lineage 2 (ceppo Heja). I pannelli presentavano concentrazioni da 1.000.000 copie / mL a 316 copie / mL. Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 9 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. L'analisi dei dati ottenuti, eseguita con la regressione lineare, ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per tutti i punti del pannello (quadrato del coefficiente di correlazione superiore a 0,99). I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

<b>Intervallo di misurazione lineare WNV lineage 1a in Sangue Intero con «ELITe STAR»</b>	
Limite inferiore	Limite superiore (testato)
<b>447 copie / mL</b>	<b>1.000.000 copie / mL</b>

<b>Intervallo di misurazione lineare WNV lineage 1a in Urina con «ELITe STAR»</b>	
Limite inferiore	Limite superiore (testato)
<b>318 copie / mL</b>	<b>1.000.000 copie / mL</b>

<b>Intervallo di misurazione lineare WNV lineage 2 in Urina con «ELITe STAR»</b>	
Limite inferiore	Limite superiore (testato)
<b>316 copie / mL</b>	<b>1.000.000 copie / mL</b>

<b>Intervallo di misurazione lineare WNV lineage 1a in CSF con «ELITe STAR»</b>	
Limite inferiore	Limite superiore (testato)
<b>316 copie / mL</b>	<b>1.000.000 copie / mL</b>

**Nota Bene:** Nel caso del Sangue Intero raccolto in EDTA e dell'Urina positivate con WNV lineage 1a come Limite inferiore dell'Intervallo di misurazione lineare è stato imposto il valore del Limite di Rilevazione.

**Precisione e Accuratezza**

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione su 9 replicati di un campione, è stata valutata come Coefficiente di Variazione percentuale (CV%) dei valori di Ct e come della Deviazione Standard (DS) dei risultati espressi in Log copie / mL per le concentrazioni di WNV nell'intervallo di misurazione lineare da 1.000.000 copie / mL a 316 copie / mL. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

<b>Precisione: CV% del Ct</b>				
Campioni	WNV lineage 1a in Sangue Intero	WNV lineage 1a in Urina	WNV lineage 2 in Urina	WNV lineage 1a in CSF
6,0 Log copie / mL	0,43	1,16	0,81	0,98
5,0 Log copie / mL	0,30	1,25	0,73	0,50
4,0 Log copie / mL	0,68	1,09	1,02	0,71
3,0 Log copie / mL	0,76	2,18	1,23	0,56
2,5 Log copie / mL	0,97	2,82	2,71	1,01

<b>Precisione: DS del Log copie / mL</b>				
Campioni	WNV lineage 1a in Sangue Intero	WNV lineage 1a in Urina	WNV lineage 2 in Urina	WNV lineage 1a in CSF
6,0 Log copie / mL	0,15	0,09	0,06	0,07
5,0 Log copie / mL	0,10	0,11	0,06	0,04
4,0 Log copie / mL	0,23	0,11	0,10	0,07
3,0 Log copie / mL	0,26	0,24	0,13	0,06
2,5 Log copie / mL	0,33	0,32	0,31	0,11

L'accuratezza del saggio, come concordanza del valore medio misurato ottenuto in una stessa sessione di amplificazione con 9 replicati di un campione con il suo valore teorico, è stata valutata come scostamento dal valore teorico del valore medio misurato espresso in Log copie / mL per le concentrazioni di WNV nell'intervallo di misurazione lineare da 1.000.000 copie / mL a 316 copie / mL. I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

Accuratezza: scostamento della Quantificazione (Log copie / mL) dal valore teorico				
Campioni	WNV lineage 1a in Sangue Intero	WNV lineage 1a in Urina	WNV lineage 2 in Urina	WNV lineage 1a in CSF
6,0 Log copie / mL	0,30	0,43	0,08	0,50
5,0 Log copie / mL	0,47	0,41	0,04	0,42
4,0 Log copie / mL	0,28	0,36	0,02	0,37
3,0 Log copie / mL	0,48	0,32	0,06	0,49
2,5 Log copie / mL	0,29	0,08	0,03	0,58

La precisione e l'accuratezza sono state determinate utilizzando i dati ottenuti nelle prove per lo studio dell'intervallo di misurazione lineare.

#### Riproducibilità con pannello per proficiency test

La riproducibilità dei risultati del saggio a confronto con i risultati ottenuti con altre metodiche in altri laboratori è stata verificata testando il pannello per proficiency test QCMD 2013 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Pannello per Proficiency Test con «ELITe STAR»				
Campioni	Contenuto	Status del Campione	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log <sub>10</sub> copie / mL
WNV13-01	WNV NY99, lineage 1a	Frequently detected	2 / 2	8,28
WNV13-02	WNV NY99, lineage 1a	Frequently detected	2 / 2	7,17
WNV13-03	WNV NY99, lineage 1a	Frequently detected	2 / 2	5,92
WNV13-04	WNV NY99, lineage 1a	Frequently detected	2 / 2	5,99
WNV13-05	WNV NY99, lineage 1a	Detected	2 / 2	4,97
WNV13-06	WNV NY99, lineage 1a	Detected	2 / 2	3,95
WNV13-07	WNV Heja, lineage 2	Frequently detected	2 / 2	8,12
WNV13-08	WNV Heja, lineage 2	Frequently detected	2 / 2	7,10
WNV13-09	WNV Ug37, lineage 2	Frequently detected	2 / 2	7,60
WNV13-10	flavivirus not-WNV	Negative	0 / 2	-
WNV13-11	flavivirus not-WNV	Negative	0 / 2	-
WNV13-12	VTM Negative	Negative	0 / 2	-

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. Il campione WNV13-10, contenente Japanese Encephalitis virus, Dengue 1 virus, Dengue 2 virus, Dengue 4 virus, e il campione WNV13-11, contenente Yellow Fever virus 17D, Dengue 3 virus, Dengue 4 virus, Tick Borne Encephalitis virus, sono risultati negativi.

#### Efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi

L'efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente sull'allineamento delle sequenze disponibili in banca dati del gene NS5 di WNV, Lineage 1a e Lineage 2, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

L'efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi è stata valutata utilizzando un costruito plasmidico contenente la regione amplificata del WNV lineage 1a del ceppo Mediterraneo Ita09.

Un costruito plasmidico contenente la regione amplificata del WNV lineage 1a del ceppo Ita09 (ENA accession number GU011992) è stato quantificato per lettura allo spettrofotometro e diluito alle concentrazioni di 100.000, 10.000, 1.000, 100 copie per reazione. Ciascun campione è stato testato in triplicato con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Efficienza di rilevazione e quantificazione con sequenze WNV lineage 1a ceppo Ita09		
Concentrazione teorica Log copie / reazione	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log copie / reazione
5,00	3 / 3	5,11
4,00	3 / 3	3,98
3,00	3 / 3	2,94
2,00	3 / 3	2,06

L'efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi è stata valutata analizzando materiale di riferimento certificato positivo per WNV lineage 1a e lineage 2 dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS, Italia). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Efficienza di rilevazione e quantificazione con materiale certificato ISS			
Campioni	Quantità, teorica Log copie / mL	Positività	Quantità, misurata Log copie / mL
WNV RNA ISS0213 (lineage 1a)	3,176	SI	3,371
WNV RNA ISS0411 (lineage 2)	3,000 – 3,698	SI	3,764

#### Marcatori potenzialmente interferenti

L'assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata valutata per confronto di sequenze con banche dati nucleotidiche.

L'esame dell'allineamento delle sequenze degli oligonucleotidi di innesco e della sonda fluorescente con le sequenze disponibili in banca dati di organismi diversi da WNV, compresi altri flavivirus del complesso antigenico dell'encefalite giapponese tra cui il virus Usutu, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

L'assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando il pannello per proficiency test QCMD 2013 West Nile Virus (RNA) EQA Programme.

I risultati ottenuti con il pannello sono riportati nel paragrafo "Riproducibilità con pannello proficiency test". In particolare il campione WNV13-10, contenente Japanese Encephalitis virus, Dengue 1 virus, Dengue 2 virus, Dengue 4 virus, e il campione WNV13-11, contenente Yellow Fever virus 17D, Dengue 3 virus, Dengue 4 virus, Tick Borne Encephalitis virus, sono risultati negativi.

L'assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando materiale di riferimento proveniente da proficiency panel (Qnostics Ltd, Regno Unito) per CMV (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus (DNA) EQA Programme), per EBV (QCMD 2008 Epstein-Barr virus (DNA) EQA Programme), per HSV1 e HSV2 (QCMD 2008 Herpes Simplex Virus (DNA) EQA Programme) e per VZV (QCMD 2012 Varicella Zoster Virus (DNA) EQA Programme).

Ciascun campione del pannello è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. Tutti i campioni sono stati confermati negativi.

#### Sostanze interferenti.

Il possibile effetto sul saggio di sostanze interferenti è stato valutato analizzando il pannello "AcroMatrix® Inhibition Panel" (Life Technologies Inc.) con campioni contenenti potenziali sostanze interferenti endogene, derivanti da emolisi, ittero e lipemia, ed esogene, gli anticoagulanti EDTA ed eparina. I campioni del pannello sono stati positivamente con materiale di riferimento QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) ad una concentrazione di 3x LoD. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

Tutti i campioni sono risultati positivi, ma il campione con eparina è inibito (Ct di WNV e Controllo Interno significativamente ritardati).

**Assenza di contaminazione incrociata**

L'Assenza di contaminazione incrociata, è stata verificata analizzando i risultati di tre sessioni in cui campioni positivi per l'RNA di WNV sono stati alternati a campioni negativi per l'RNA di WNV. Nessun campione negativo per l'RNA di WNV è risultato positivo.

Un campione di Sangue Intero negativo per l'RNA di WNV è stato utilizzato come campione negativo e, dopo aggiunta di materiale di riferimento QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 10.000 copie / mL, come campione positivo. Tre serie di 6 campioni positivi alternati a 6 campioni negativi sono state impiegate per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue Intero positivo per l'RNA di WNV	18	18	0
Sangue Intero negativo per l'RNA di WNV	18	0	18

**Tasso globale di errore del sistema**

Il Tasso globale di errore del sistema che porta a risultati falsi negativi è stato verificato eseguendo l'analisi di un pannello di campioni positivizzati per l'RNA di WNV a basso titolo. Nessun campione positivizzato per l'RNA di WNV è risultato negativo.

Un campione di Sangue Intero negativo per l'RNA di WNV è stato positivizzato con il materiale di riferimento QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 1.500 copie / mL. Il campione è stato impiegato in 60 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue Intero positivizzato per il RNA di WNV	60	60	0

**Riproducibilità inter-lotto**

La riproducibilità inter-lotto del saggio è stata verificata analizzando la concordanza e la variabilità dei risultati ottenuti con materiale di riferimento e tre diversi lotti di prodotto. Il saggio ha presentato un CV% dei valori di Ct inferiore al 4%.

Un campione di Sangue Intero raccolto in EDTA negativo per l'RNA di WNV e il materiale di riferimento QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) sono stati utilizzati per preparare il seguente pannello di 12 campioni:

- 3 campioni positivizzati a 1350 copie / mL (3x LoD);
- 3 campioni positivizzati a 450 copie / mL (1x LoD);
- 3 campioni positivizzati a 225 copie / mL (0,5x LoD);
- 3 campioni negativi per WNV.

Il pannello è stato utilizzato da 3 diversi operatori in associazione al sistema di estrazione «**ELITe STAR**». I campioni estratti sono stati retrotrascritti ed amplificati, utilizzando 3 lotti dei prodotti ELITechGroup S.p.A., in giorni diversi e su strumenti di amplificazione real time diversi. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	Positivi / replicati	Media Ct WNV	DS	CV%	Media Ct CI	DS	CV%
<b>3x LoD</b>	9 / 9	35,25	0,81	2,29	31,28	0,87	2,78
<b>1x LoD</b>	9 / 9	36,22	1,43	3,95	31,13	0,55	1,78
<b>0,5x LoD</b>	9 / 7	37,79	1,15	3,04	30,91	0,27	0,88
<b>Negativi</b>	0 / 9	-	-	-	30,88	0,39	1,27

**Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi**

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando alcuni campioni clinici di Sangue Intero, CSF e Urine positivizzati per l'RNA di WNV, data la difficoltà di reperire un numero significativo di campioni clinici positivi. La sensibilità diagnostica complessiva è risultata uguale al 96,5%.

Il test con Sangue Intero raccolto in EDTA è stato eseguito su 30 campioni provenienti da soggetti diversi. I campioni sono stati positivizzati in una prima serie con l'RNA di WNV lineage 1a e in una seconda serie con quello del lineage 2 del QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 500 copie / mL. Al test con il WNV lineage 2 sono poi stati aggiunti altri 10 campioni di Sangue Intero raccolto in EDTA positivizzati ad un titolo di 500 copie / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue Intero positivizzato per l'RNA di WNV Lineage 1a	30	30	0
Sangue Intero positivizzato per l'RNA di WNV Lineage 2	39	34	5
Totale	69	64	5

Cinque campioni sono risultati negativi con i prodotti ELITechGroup S.p.A. probabilmente a causa della concentrazione vicina al valore dell'LoD (447 copie / mL).

Un campione è risultato non valido a causa di un inibitore non identificato e non sono stati inclusi nel calcolo della sensibilità diagnostica.

La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova con Sangue Intero è risultata uguale al 92,7%.

Il test con Urina raccolta senza conservanti è stato eseguito su 30 campioni provenienti da soggetti diversi. I campioni sono stati positivizzati in una prima serie con l'RNA di WNV lineage 1a e in una seconda serie con quello del lineage 2 del QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 500 copie / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Urina positivizzate per l'RNA di WNV Lineage 1a	30	29	1
Urina positivizzate per l'RNA di WNV Lineage 2	30	30	0
Totale	60	59	1

Un campione è risultato negativo con i prodotti ELITechGroup S.p.A. probabilmente a causa della concentrazione vicina al LoD (318 copie / mL).

La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova con Urina è risultata uguale al 98,3%.

Il test con CSF è stato eseguito su 20 campioni provenienti da soggetti diversi. I campioni sono stati positivizzati in una prima serie con l'RNA di WNV lineage 1a e in una seconda serie con quello del lineage 2 del QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme (Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 500 copie / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
CSF positivizzato per l'RNA di WNV Lineage 1a	20	20	0
CSF positivizzato per l'RNA di WNV Lineage 2	20	20	0
Totale	40	40	0

La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova con CSF è risultata uguale al 100%.

**Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi**

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando alcuni campioni clinici di Sangue Intero, CSF e Urina testati negativi per l'RNA di WNV. La specificità diagnostica complessiva è risultata uguale al 100%.

Il test con Sangue Intero raccolto in EDTA è stato eseguito su 30 campioni provenienti da soggetti diversi. I campioni sono stati testati negativi per l'RNA di WNV con un prodotto "home-made" di amplificazione real time. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue Intero negativo per l'RNA di WNV	24	0	24

Sei campioni sono risultati "non validi" a causa di un inibitore non identificato e non sono stati inclusi nel calcolo della specificità diagnostica.

La specificità diagnostica del saggio in questa prova con Sangue Intero è risultata pari al 100%.

Il test con Urina raccolta senza conservanti è stato eseguito su 30 campioni provenienti da soggetti diversi. I campioni sono stati testati negativi per l'RNA di WNV con un prodotto "home-made" di amplificazione real time. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Urina negativa per l'RNA di WNV	27	0	27

Tre campioni sono risultati "non validi" a causa di un inibitore non identificato e non sono stati inclusi nel calcolo della specificità diagnostica.

La specificità diagnostica del saggio in questa prova con Urina è risultata uguale al 100%.

Il test con CSF è stato eseguito su 20 campioni provenienti da soggetti diversi. I campioni sono stati testati negativi per l'RNA di WNV con un prodotto "home-made" di amplificazione real time. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, trascrizione inversa ed amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
CSF negativi per l'RNA di WNV	20	0	20

La specificità diagnostica del saggio in questa prova con CSF è risultata pari al 100%.

**Nota bene:** I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le diverse matrici e i diversi strumenti sono registrati nella Sezione 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto "WNV ELITe MGB Kit", FTP RTS100PLD.

**BIBLIOGRAFIA**

- F. J. May et al. (2011) *J. Virol.* March vol. 85: 2964-2974  
 E. M. Botha (2008) *Emerging Infectious Disease* vol. 14: 222-230  
 T. Bakonyi (2006) *Emerging Infectious Disease* vol. 12: 618-623  
 J. H. Scherret (2001) *Emerging Infectious Disease* vol. 7: 697-705  
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

**PROBLEMI E SOLUZIONI**

<b>DNA bersaglio non rilevato nella reazione dei Q - PCR Standard oppure Coefficiente di correlazione della Curva standard non valido</b>	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella preparazione della miscela di reazione.	Controllare i volumi di reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropietra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela completa di reazione dispensati. Controllare i volumi di standard dispensati.
Degradazione della sonda.	Utilizzare una nuova aliquota di PreMix.
Degradazione della PCR MasterMix.	Utilizzare una nuova aliquota di PCR MasterMix.
Degradazione degli standard.	Utilizzare una nuova aliquota di standard.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni degli standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.

<b>RNA / DNA bersaglio rilevato nella reazione di Controllo negativo</b>	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni, controllo negativo e standard nella micropietra seguendo il piano di lavoro.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e standard impostata sullo strumento.
Micropietra sigillata male.	Sigillare con attenzione la micropietra.
Contaminazione dell'acqua ultrapura per biologia molecolare.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua.
Contaminazione della miscela completa di reazione.	Preparare una nuova aliquota di miscela completa di reazione.
Contaminazione dell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.	Pulire superfici e strumenti con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.

<b>RNA bersaglio e Controllo Interno non rilevato nelle reazioni dei campioni</b>	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi di reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione. Verificare di aver aggiunto la RT EnzymeMix alla miscela completa di reazione.
Degradazione della RT EnzymeMix.	Utilizzare una nuova aliquota di RT EnzymeMix.
Problemi di conservazione dei reagenti.	Verificare che l'RT EnzymeMix non sia rimasta esposta a temperature superiori a -20 °C per oltre 10 minuti. Verificare che la miscela completa di reazione non sia rimasta esposta a temperatura ambiente per oltre 30 minuti.
Problemi durante la fase di estrazione	Verificare la qualità e la concentrazione dell'RNA estratto.

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione del campione.	Mescolare con cura, pipettando per tre volte, campioni, controllo negativo e standard nella miscela di reazione. Evitare di creare bolle.
Errore nell'impostazione della "baseline".	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

Presenza di curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma diverso da quello degli altri campioni e del controllo positivo o degli standard.	Controllare che il Ct del detector FAM sia minore di 30. Quantità elevate di prodotto di amplificazione presenti alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza di un RNA bersaglio con una possibile mutazione. Per confermare la presenza di una mutazione l'RNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.

**LEGENDA DEI SIMBOLI**

-  Numero di catalogo.
-  Limite superiore di temperatura.
-  Codice del lotto.
-  Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese).
-  Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.
-  Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.
-  Contenuto sufficiente per "N" test.
-  Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
-  Contenuti.
-  Tenere lontano dalla luce solare.
-  Fabbricante.

**AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA**

Questo prodotto contiene reagenti prodotti da Life Technologies Corporation e sono venduti in base al contratto di licenza tra ELITechGroup S.p.A. e suoi affiliati e Life Technologies Corporation. Il prezzo di acquisto di questo prodotto include i diritti - limitati e non trasferibili - di utilizzare solo questa quantità di prodotto, unicamente per attività dell'acquirente che siano direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza per questo prodotto per scopi diversi da quelli definiti sopra, contattare il Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Email: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITe® MGB sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 e da brevetti EP numero 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939. Sono state presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Questa licenza limitata permette all'individuo o alla persona giuridica alla quale il prodotto è stato fornito di utilizzarlo unitamente ai dati generati dal suo utilizzo solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite per altri scopi.

"ELITe MGB" e il logo "ELITe MGB" sono registrati come marchi commerciali nell'Unione Europea.

