

# Istruzioni per l'uso

Ver. NLM 8575 del 04/09/2017

Biologia Molecolare

Estrazione AA1001 non compresa

## Neisseria gonorrhoeae Qualitativa Real Time

Neisseria gonorrhoeae Real-TM

REF

AA1084/100

CE



100 TEST

CND

W0105011699

IVD



**NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.**

SEDE LEGALE: Via Cascina Conighetto - UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALIA

Tel.: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: [www.nlm.it](http://www.nlm.it) - E-MAIL: [segreteria@nlm.it](mailto:segreteria@nlm.it)

Organizzazione con Sistema di gestione qualità certificata ISO 9001 e Sistema di gestione qualità settore medicale certificato ISO 13485  
(organismo di certificazione IMQ - Certificazione CSQ).

## NOME

### **Neisseria gonorrhoeae Real-TM**

## INTRODUZIONE

Le malattie a trasmissione sessuale (MST) si riferiscono a una varietà di infezioni batteriche, virali e parassitiche che vengono contratte attraverso l'attività sessuale. Alcune MST, come la sifilide e la gonorrea, sono conosciute da centinaia di anni – mentre altre, come HIV, sono state identificate solo negli ultimi decenni. Le MST sono causate da più di 25 organismi infettivi. Man mano che nuovi organismi sono identificati, il numero di MST continua ad espandersi. Comuni MST includono: clamidia, gonorrea, herpes, HIV, HPV, sifilide, gardnerella e tricomoniasi. Lo sviluppo di test basati sulla tecnologia di amplificazione degli acidi nucleici ha costituito l'avanzamento più importante nel settore della diagnosi delle malattie sessualmente trasmesse. Essendo l'amplificazione degli acidi nucleici estremamente sensibile e altamente specifica, offre l'opportunità di usare tecniche di prelievo del campione non invasive per effettuare screening di infezione in individui asintomatici che normalmente non cercherebbero assistenza clinica.

## USO PREVISTO

**Neisseria gonorrhoeae Real-TM** è un test per la rilevazione qualitativa in Real Time PCR di *Neisseria gonorrhoeae* in tamponi urogenitali, urina, liquido prostatico e altri materiali biologici.

## PRINCIPIO DELL'ANALISI

Il kit **Neisseria gonorrhoeae Real-TM** si basa su due processi principali: isolamento del DNA dai campioni e amplificazione tramite Real Time PCR. Il DNA di *Neisseria gonorrhoeae* viene estratto dai campioni, amplificato con PCR Real Time e rilevato usando sonde reporter emettitrici di fluorescenza specifiche per il DNA di *Neisseria gonorrhoeae* e per il Controllo Interno. Il Controllo Interno (IC) costituisce un controllo di amplificazione per ogni singolo campione analizzato ed inoltre consente di identificare una possibile inibizione della reazione. L'IC viene rilevato in un diverso canale rispetto al DNA di *Neisseria gonorrhoeae*.

## MATERIALE FORNITO

### Real Time PCR kit

Componente N° 2 – “**Neisseria gonorrhoeae Real-TM**”

- PCR-mix-1-FL**, 1,2 ml;
- PCR-mix-2**, 2 x 0,3 ml;
- TaqF Polymerase**, 2 x 0,03 ml;
- Pos C+**, 0,2 ml;
- Negative Control C-\***, 1,2 ml;
- Internal Control IC\*\***, 1,0 ml;
- DNA-buffer**, 0,5 ml;

Contiene reagenti per 110 test.

\* deve essere utilizzato nella procedura di isolamento come Controllo negativo di Estrazione.

\*\* aggiungere 10 µl di Controllo Interno durante l'estrazione del DNA direttamente nella miscela campione/buffer di lisi.

## MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Transport medium. Guanti
- monouso Termociclatore
- Real Time Tubi di reazione
- Pipette (regolabili)
- Puntali sterili con filtro
- Cappa per PCR
- Tubi per PCR o piastre per PCR
- Centrifuga da tavolo con rotore per tubi da 1,5/2,0 ml
- Vortex
- Frigorifero 2–8°C, congelatore ≤ –16°C

## CONTROLLO QUALITA'

In accordo con il Sistema Controllo Qualità ISO 13485, ogni lotto è testato con specifiche predeterminate per assicurare la qualità e la conformità del prodotto.

## LIMITAZIONI D'USO DEL PRODOTTO

Tutti i reagenti sono utilizzabili esclusivamente per diagnostica in vitro. L'uso di questo prodotto dovrebbe essere limitato a personale esperto nelle tecniche di amplificazione del DNA (UNI EN ISO 18113-2:2012). Per avere risultati ottimali nella PCR si richiede di seguire strettamente il manuale d'uso. Prestare massima attenzione alle date di scadenza stampate nella scatola e nelle etichette di tutti i componenti. Non usare il kit dopo la data di scadenza.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI



### Dispositivo Medico Diagnostico In Vitro Solo per uso Diagnostico in Vitro

- Durante l'uso dei reagenti e dei campioni indossare guanti monouso, camici da laboratorio e protezione per gli occhi. Lavare accuratamente le mani dopo la seduta.
- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere, fumare, usare cosmetici o maneggiare lenti a contatto nelle aree di lavoro del laboratorio.
- Non usare un kit dopo la data di scadenza.
- Eliminare tutti i campioni e reagenti non utilizzati secondo le normative locali.
- Utilizzare "Biosafety Level 2" per materiali che contengono o sono sospettati contenere agenti infettivi.
- Pulire e disinfettare tutti gli eventuali residui di campioni o reagenti versati sulle superfici usando un disinfettante come ipoclorito di sodio 0,5%, o altri disinfettanti adatti.
- Evitare il contatto di campioni e reagenti con pelle, occhi e membrane mucose. Se queste soluzioni venissero a contatto, lavare immediatamente con acqua e richiedere subito l'intervento di un medico.
- Le Schede di Sicurezza (MSDS) sono disponibili su richiesta.
- L'uso di questo prodotto dovrebbe essere limitato a personale esperto nelle tecniche di amplificazione del DNA.
- Le reazioni di PCR sono sensibili alla contaminazione. Misure per ridurre il rischio di contaminazione nel laboratorio includono separare fisicamente le attività coinvolte nello svolgimento della PCR come indicato dalle buone pratiche di laboratorio.
- I flussi di lavoro nel laboratorio devono procedere in maniera unidirezionale, iniziando nell'area deputata all'estrazione e spostandosi nell'area deputata all'amplificazione. Non portare campioni, attrezzature e reagenti nell'area deputata alla fase di analisi precedente.



Alcuni componenti di questo kit contengono azoturo di sodio come conservante. Non usare tubi di metallo per il trasferimento di reagenti.

## MODALITA' DI CONSERVAZIONE

Tutti i componenti del kit **Neisseria gonorrhoeae Real-TM** (eccetto la polimerasi (TaqF) e la PCR-mix-2) devono essere conservati alla temperatura di 2–8 °C quando non in uso. Tutti i componenti del kit **Neisseria gonorrhoeae Real-TM** sono stabili fino alla data di scadenza indicata. La durata dei reagenti prima e dopo il loro primo utilizzo è la stessa, se non diversamente specificato.



Tenere al riparo dalla luce la PCR-mix-1-FL.



La Polymerase (TaqF) e la PCR-mix-2 devono essere conservate a  $\leq -16$  °C

## STABILITA'

**Neisseria gonorrhoeae Real-TM** è stabile fino alla data di scadenza indicata nell'etichetta del kit. Il prodotto manterrà la stessa performance durante il periodo indicato in etichetta. L'esposizione alla luce, al calore o all'umidità potrebbe influenzare negativamente la durata di conservazione di alcuni dei componenti del kit e dovrebbe essere sempre evitata. Ripetuti cicli di scongelamento-ricongelamento dei reagenti dovrebbero essere evitati poiché possono ridurre la sensibilità.

## RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

**Neisseria gonorrhoeae Real-TM** può analizzare DNA estratto da:

Tamponi cervicali, uretrali, oculari: inserire il tampone nel tubo da 1,5 ml (nucleasi free) e aggiungere 0,2 ml di Transport Medium. Agitare vigorosamente il tampone nel medium per 15-20 secondi.

Sedimento urinario: raccogliere 10-20 ml della prima porzione di urina;

Liquido prostatico: conservato in un tubo "Eppendorf";

Liquido seminale: trasferire circa 30 µl di liquido seminale in un tubo di polipropilene (1,5 ml) ed aggiungere 70 µl di soluzione salina sterile.

Si raccomanda di analizzare i campioni immediatamente dopo la raccolta. Conservare i campioni a 2-8°C per non più di 24 ore, oppure congelare a -20/-80°C. Il trasporto di campioni clinici deve essere effettuato in conformità alle norme vigenti e locali riguardanti il trasporto di materiale potenzialmente infetto.

## ISOLAMENTO DEL DNA

Per l'estrazione di RNA/DNA, può essere utilizzato qualsiasi kit commerciale marcato IVD-CE e validato per i tipi di campioni indicati nel paragrafo "RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE".

Preghiamo di effettuare l'estrazione del DNA seguendo le istruzioni del produttore. Aggiungere 10 µl di Controllo Interno direttamente alla miscela campione/buffer di lisi, durante l'isolamento del DNA.

(Nota: il Controllo Interno è lo stesso per tutti i kit urogenitali Real Time)

## PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Preparare la quantità necessaria di tubi da 1.5 ml includendo un tubo per il **Controllo Negativo di Estrazione**.

1. Aggiungere **10 µl** di **Internal Control** in tutte le provette per l'estrazione.
2. Aggiungere **100 µl** di **Campione** al tubo appropriato.
3. Preparare i Controlli così come segue:
  - aggiungere **100 µl** di **C-** (**Neg Control** fornito con il kit di amplificazione) al tubo marcato Cneg.

Eseguire l'estrazione del DNA seguendo le istruzioni del produttore.

Se l'amplificazione non è eseguita nello stesso giorno dell'estrazione, i campioni estratti possono essere conservati a 2-8°C per un tempo massimo di 5 giorni oppure congelati a -20°/-80°C per periodi più lunghi.

## PROTOCOLLO:

1. Preparare la quantità necessaria di tubi di reazione per campioni (N) e controlli (N+2).
2. Preparare in un nuovo tubo sterile **10\*N µl di PCR-mix-1-FL**, **5\*N µl di PCR-mix-2** e **0,5\*N µl di TaqF DNA Polymerase**. Vortexare e centrifugare brevemente.
3. Aggiungere a ogni tubo **15 µl di Reaction Mix** e **10 µl di DNA estratto**. Mescolare pipettando.
4. Preparare per ogni corsa 2 controlli:
  - aggiungere **10 µl di DNA-buffer** al tubo marcato Controllo negativo di amplificazione;
  - aggiungere **10 µl di Positive Control C+** al tubo marcato Controllo positivo di amplificazione;
5. Inserire i tubi nel termociclatore.

## Amplificazione

1. Creare un profilo di amplificazione sullo strumento Real-time così come descritto:

Fase	Strumento a Rotore <sup>1</sup>			Strumento a Piastra o Modulare <sup>2</sup>		
	Temperatura, °C	Tempo	Cicli	Temperatura, °C	Tempo	Cicli
1	95	15 min	1	95	15 min	1
2	95	5 s	5	95	5 s	5
	60	20 s		60	20 s	
	72	15 s		72	15 s	
3	95	5 s	40	95	5 s	40
	60	20 s rilevazione fluorescenza		60	30 s rilevazione fluorescenza	
	72	15 s		72	15 s	

<sup>1</sup> Per esempio Rotor-Gene™ 3000/6000/Q (Corbett Research, Qiagen)

<sup>2</sup> Per esempio, SaCycler-96™ (Sacace), CFX96/iQ5™ (BioRad); Mx3005P™ (Agilent), ABI® 7300/7500/StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems), SmartCycler® (Cepheid), LineGeneK® (Bioer)

I risultati si interpretano tramite la presenza di incrocio tra la curva di fluorescenza e la linea di threshold.

**Neisseria gonorrhoeae è rilevato nel canale FAM (Green), IC DNA nel canale JOE (Yellow)/ HEX/ Cy3**

## IMPOSTAZIONI STRUMENTO

### Strumento a rotore

Canale	Calibrate/Gain Optimisation...	Threshold	More Settings/ Outlier Removal	Slope Correct
FAM/Green	from 5 FI to 10 FI	0.1	0 %	Off
JOE/Yellow	from 4 FI to 8 FI	0.1	5 %	Off

### Strumento a piastra

La linea di threshold deve intersecare solo le curve sigmoidi di fluorescenza di campioni positivi e non deve intersecare la linea di fluorescenza di fondo, altrimenti il valore del threshold deve essere incrementato. Impostare il threshold in modo da intersecare le curve di fluorescenza nel punto in cui esse aumentano linearmente e non intersecano la fluorescenza di fondo data dai campioni negativi.

### Valore limite del ciclo threshold, Ct

Campione	Canale del fluoroforo	Ct valore limite	
		Strumento a rotore	Strumento a piastra
C+	FAM/Green	33	36
	JOE/Yellow/Hex/Cy3	30	33
Campioni, C-	JOE/Yellow/Hex/Cy3	30	33

## ANALISI DEI DATI

### L'intensità del segnale di fluorescenza è rilevato su due canali:

Il segnale per il prodotto di amplificazione del DNA di *Neisseria gonorrhoeae* è rilevato nel canale FAM/Green;

Il segnale per il prodotto di amplificazione del Controllo Interno è rilevato nel canale JOE/Yellow/HEX/Cy3.

### Interpretazione dei risultati

I risultati sono interpretati dal software dello strumento di Real Time PCR attraverso la presenza ed intersecazione della curva di fluorescenza con la linea di threshold.

Principio di interpretazione:

Il DNA di *Neisseria gonorrhoeae* è **rilevato** nel campione se il suo valore di Ct è presente nel canale FAM. La fluorescenza deve intersecare la linea di threshold nell'area di crescita esponenziale della curva.

Il DNA di *Neisseria gonorrhoeae* **non è rilevato** nel campione se il suo valore di Ct è assente nel canale FAM (la fluorescenza non interseca la linea di threshold) mentre il valore del Ct nel canale JOE è minore di 33.

Il risultato è **invalido** se il valore del Ct del campione nel canale FAM è assente mentre il



valore del Ct nel canale JOE è assente o superiore al valore specificato come valore limite (Ct > 33). E' necessario ripetere l'analisi per il suddetto campione.

Il risultato dell'analisi è considerato affidabile solo se i risultati ottenuti per il controllo Positivo e Negativo di amplificazione e controllo Negativo di estrazione sono corretti (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati dei controlli

Controllo	Fase del controllo	Ct canale Fam	Ct canale Joe	Interpretazione
NCE	Estrazione DNA	NEG	POS	Risultato valido
NCA	Amplificazione	NEG	NEG	Risultato valido
C+	Amplificazione	POS	POS	Risultato valido

### PROCEDURA DEL CONTROLLO DI QUALITA'

Una quantità definita di Controllo Interno (IC) è introdotta in ogni campione e controllo all'inizio della procedura di preparazione allo scopo di controllare il processo di estrazione di ogni singolo campione ed individuare eventuali reazioni di inibizione.

Un Controllo Negativo di Estrazione (NCE), Controllo Negativo di Amplificazione (NCA), Controllo Positivo di Amplificazione (C+) sono necessari in ogni seduta per verificare che la fase di preparazione del campione, l'amplificazione e la rilevazione sono eseguiti correttamente.

Se i controlli sono fuori dai valori attesi (vedi tabella Risultati dei Controlli), tutti i campioni e i controlli devono essere nuovamente processati dall'inizio.

### CARATTERISTICHE ANALITICHE

#### Sensibilità

La sensibilità analitica del kit **Neisseria gonorrhoeae Real-TM** PCR è riportata nella seguente tabella.

Materiale clinico	DNA extraction kit	Sensibilità analitica, GE/ml*
Tamponi urogenitali	DNA-sorb-A	5 x 10 <sup>2</sup>
Urina	DNA-sorb-A	1 x 10 <sup>3</sup>

\* Equivalenti genomici (GE) del microrganismo per 1 ml di campione clinico posto in terreno di trasporto specifico

#### Specificità

La specificità analitica del kit **Neisseria gonorrhoeae Real-TM** PCR è assicurata dalla selezione di primer e sonde specifici così come dalle condizioni stringenti di reazione. I primer e le sonde sono stati controllati per possibili omologie tramite analisi comparativa di sequenza con tutte le sequenze pubblicate nella banca genica. Non ci sono state risposte aspecifiche durante l'analisi di DNA umano, così come nei confronti di pannelli di DNA dei seguenti

microrganismi: *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, HSV type 1 e 2, CMV, e HPV

## RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

1. Il segnale del controllo interno (IC) è debole o assente (canale Joe/Hex/Cy3) per il Controllo Negativo di Estrazione.

La PCR è inibita.

⇒ Assicurarsi di avere usato il metodo raccomandato per l'estrazione del RNA e di aver eseguito le istruzioni correttamente.

⇒ Centrifugare tutte le provette contenenti l'RNA estratto per 2 minuti alla massima velocità (12000-16000 g) e prelevare il sovrantante senza disturbare il pellet; il Sorbent inibisce la PCR.

I reagenti sono stati conservati in condizioni non conformi alle istruzioni.

⇒ Controllare le condizioni di conservazione

Le condizioni di PCR non sono conformi alle istruzioni.

⇒ Controllare le condizioni di PCR e selezionare per il Controllo Interno (IC) il canale di acquisizione della fluorescenza indicato nel manuale.

Il Controllo Interno (IC) non è stato aggiunto al campione durante la procedura di estrazione.

⇒ Fare attenzione e assicurarsi di aggiungere l' IC durante l'estrazione del DNA.

2. Il segnale del controllo positivo è debole o assente.

Le condizioni di PCR non sono conformi alle istruzioni.

⇒ Controllare il protocollo di amplificazione e selezionare il canale adeguato per l'acquisizione della fluorescenza riportato sul manuale.

3. Segnale su Fam (Green) nel Controllo Negativo di Estrazione.

Contaminazione durante la procedura di estrazione del DNA. Tutti i campioni risultano non validi.

⇒ Decontaminare tutte le superfici e gli strumenti con ipoclorito di sodio, etanolo e/o speciali decontaminanti per DNA.

⇒ Usare solo puntali con filtro durante la procedura di estrazione. Cambiare i puntali tra una provetta e l'altra.

⇒ Ripetere l'estrazione del DNA con un nuovo set di reagenti.

4. Presenza di segnale nel Controllo Negativo di PCR (DNA-buffer).

Contaminazione durante la procedura di preparazione della PCR. Tutti i campioni risultano non validi.

⇒ Decontaminare tutte le superfici e gli strumenti con ipoclorito di sodio, etanolo e/o speciali decontaminanti per DNA.

⇒ Pipettare il controllo positivo per ultimo.

⇒ Ripetere l'allestimento della reazione di PCR con un nuovo set di reagenti.

## LEGENDA



Codice prodotto



Attenzione!



Numero di lotto



Contiene reagenti  
sufficienti per  
<n> test



Per uso Diagnostico in Vitro



Versione



Conservare a

**NCA**

Controllo Negativo di  
Amplificazione



Produttore

**NCE**

Controllo Negativo di  
Estrazione



Consultare le istruzioni per  
l'uso

**C+**

Controllo Positivo di  
Amplificazione



Data di scadenza

**IC**

Controllo Interno

- \* SaCycler™ is a registered trademark of Sacace Biotechnologies
- \* CFX™ and iQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories
- \* Rotor-Gene™ is a registered trademark of Qiagen
- \* MX3005P® is a registered trademark of Agilent Technologies
- \* ABI® is a registered trademark of Applied Biosystems
- \* LineGeneK® is a registered trademark of Bioer
- \* SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid