

	 EMPOWERING IVD
	 ELITechGroup S.p.A. C.so Svizzera, 185 10149 Torino ITALY
	Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11 E. mail: emd.support@elitechgroup.com sito WEB: www.elitechgroup.com

AVVERTENZA del 08/06/2022

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:







«CMV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTK015PLD

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Estensione d'uso del prodotto in associazione con lo strumento «ELITe BeGenius[®]» (REF INT040) e le matrici plasma e sangue intero.*
- *Aggiornamento delle CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI:*
 - *Modifica del limite di rilevazione (LoD)*
 - *Modifica dell'Intervallo di misurazione lineare*
 - *Aggiunta della Ripetibilità*
 - *Aggiunta della Riproducibilità*
- *Inserito il valore di Ct cut-off del Controllo Interno (IC).*

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
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



CMV ELITE MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD



SOMMARIO

USO PREVISTO	pag. 2
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL KIT	pag. 3
MATERIALE INCLUSO NEL KIT	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL KIT	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 5
ELITE INGENIUS®	pag. 6
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 6
PROCEDURA ELITE INGENIUS®	pag. 10
ELITE BEGENIUS®	pag. 18
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 18
PROCEDURA ELITE BEGENIUS®	pag. 19
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI ELITE INGENIUS® ED ELITE BEGENIUS	pag. 24
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	pag. 39
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 39
PROCEDURA	pag. 42
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 51
Roche cobas z 480 analyzer	pag. 65
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 65
PROCEDURA	pag. 66
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 72
BIBLIOGRAFIA	pag. 77
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 78
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 79
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 82
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 83

CMV ELITE MGB® Kit

reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

USO PREVISTO

Il prodotto «CMV ELITE MGB® Kit» è un saggio qualitativo e quantitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la **rilevazione e la quantificazione del DNA del Citomegalovirus umano (CMV)** in campioni di DNA estratto da sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA, liquido cefalorachidiano, urina, tamponi buccali, liquido amniotico e lavaggio broncoalveolare (BAL) / broncoaspirato (BA).

Il prodotto trova impiego nella diagnosi e nel monitoraggio dell'infezione da CMV, insieme ai dati clinici del paziente e agli esiti di altri esami di laboratorio.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

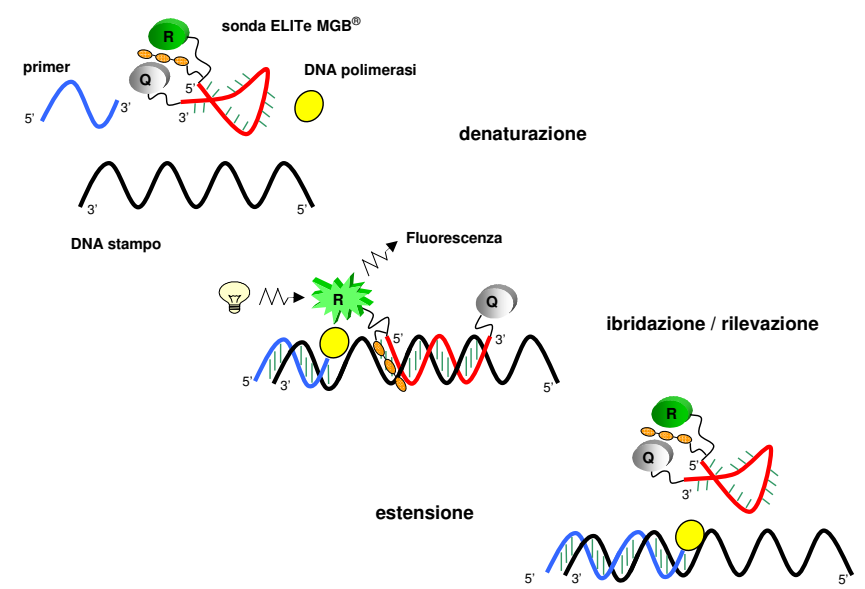
Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di amplificazione real time con un termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza.

In ogni pozzetto si effettuano due reazioni di amplificazione: una specifica per la regione dell'**esone 4 del gene MIEA di CMV** (major immediate early antigen, HCMVUL123) e una specifica per la regione del gene umano codificante la **beta Globina** (Controllo Interno di inibizione) utilizzando il DNA estratto dai campioni in esame. La sonda con tecnologia ELITE MGB® specifica per CMV marcata con il fluoroforo FAM è attivata quando ibrida con il prodotto specifico della reazione di amplificazione per CMV. 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 dei prodotti specifici della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dall'apparecchio. L'elaborazione dei dati permette di rilevare la presenza e il titolo del DNA di CMV 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.

Il saggio è stato validato sui sistemi riportati su questo manuale di istruzioni.

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 KIT

Il prodotto «**CMV ELITE MGB® Kit**» fornisce una miscela di reazione completa e pronta all'uso CMV Q - PCR Mix per l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzante, prealiquotata in quattro provette. Ogni provetta contiene **540 µL** di soluzione, sufficiente per **24 test** (processando almeno 2 campioni per sessione) in associazione al sistema **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®** e **25 test** in associazione ad altri sistemi.

Gli oligonucleotidi di innesco e la sonda per CMV (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata dal quencher non fluorescente) sono specifici per una regione dell'esone 4 del gene **MIEA di CMV** (major immediate early antigen, HCMVUL123).

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 dal quencher non fluorescente) sono specifici per la regione promotore e 5' UTR del gene umano codificante la **beta Globina**.

La miscela di reazione fornisce il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati, il fluoroforo AP593, usato invece del ROX o del Cy5 come riferimento passivo per la normalizzazione della fluorescenza, l'enzima Uracil-N-glicosidasi (UNG) per l'inattivazione delle contaminazioni da prodotto di amplificazione, l'enzima DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

Il kit consente di effettuare **96 determinazioni in associazione al sistema «ELITE InGenius®»** e «**ELITE BeGenius®**», standard e controlli compresi.

Il kit consente di effettuare **100 determinazioni in associazione ad altri sistemi**, standard e controlli compresi.

MATERIALE INCLUSO NEL KIT

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei pericoli
CMV Q - PCR Mix	miscela completa di reazione	4 x 540 µL	-

MATERIALE RICHiesto NON INCLUSO NEL KIT

- 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 (0.5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- 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.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza cobas z 480 analyzer calibrato come previsto dal fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del DNA dai campioni da analizzare, il controllo positivo di estrazione, il controllo positivo di amplificazione, i DNA standard a quantità nota e i consumabili **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'estrazione manuale del DNA dai campioni da analizzare, è validato l'impiego del prodotto generico «**EXTRABlood®**» (ELITechGroup S.p.A., codice EXTB01), kit di estrazione del DNA da campioni cellulari e non cellulari.

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200) o «**ELITE InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT033SP1000), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, codice TF-350-L-R-S).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT030) e i seguenti Assay protocols specifici (ELITechGroup S.p.A.):

- per il calibratore «**CMV ELITE STD**» o «**CMV ELITE STD_1000_100**»,
- per il controllo positivo di amplificazione «**CMV ELITE PC**» o «**CMV ELITE PC_1000_100**»,
- per il controllo negativo di amplificazione «**CMV ELITE NC**» o «**CMV ELITE NC_1000_100**»,
- per i campioni in analisi «**CMV ELITE WB_200_100**», «**CMV ELITE PL_200_100**», «**CMV ELITE PL_1000_100**», «**CMV ELITE CSF_200_100**», «**CMV ELITE U_200_100**», «**CMV ELITE BS_200_100**», «**CMV ELITE AF_200_100**» e «**CMV ELITE BAL_200_100**».

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare con lo strumento «**ELITE BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT040), è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici: cartucce di estrazione «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200), e materiali di consumo per estrazione ed amplificazione da campioni biologici «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) e «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Switzerland, ref. 30180118).

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione del DNA, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento «**ELITE BeGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT040) e i seguenti Assay protocols specifici (ELITechGroup S.p.A.):

- per il calibratore «**CMV ELITE Be STD**»,
- per il controllo positivo di amplificazione «**CMV ELITE Be PC**»,
- per il controllo negativo di amplificazione «**CMV ELITE Be NC**»,
- per i campioni in analisi «**CMV ELITE Be WB_200_100**» e «**CMV ELITE Be PL_200_100**».

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

Per l'estrazione automatica del DNA e la preparazione della micropiastrella di amplificazione dei campioni da analizzare, è validato l'impiego del prodotto generico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT021EX), kit di estrazione di RNA e DNA da campioni biologici, con lo strumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., codice INT020).

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare, è anche validato l'impiego dei prodotti generici «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, codici 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, codice 200111).

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare, è anche validato l'impiego del prodotto «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, codice 931236) e «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» (QIAGEN GmbH, codice 937055), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento «**QIASymphony® SP/AS**» (QIAGEN GmbH, codici 9001297, 9001301) e relativi prodotti generici.

Per l'estrazione automatica del DNA dai campioni da analizzare, è anche validato l'impiego del prodotto generico «**Magna Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, codice 07658036001), kit di estrazione degli acidi nucleici da campioni biologici, con lo strumento «**Magna Pure 24 System**» (Roche, codice 07290519001).

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 previsto l'uso di uno strumento cobas z 480 analyzer, si consiglia l'impiego del prodotto generico «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, codice 05232724001), micropiastre con pozzetti da 0,3 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time.

Nel caso sia richiesta la rilevazione del DNA di CMV, per analisi qualitativa si consiglia l'impiego del prodotto **CMV - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A. codice CTR015PLD), o del prodotto di ELITechGroup S.p.A. «**CMV - ELITE Positive Control RF**» (codice CTR015PLD-R) specifico per l'utilizzo con lo strumento cobas z 480 analyzer, controllo positivo di DNA plasmidico.

Nel caso sia richiesta la rilevazione e quantificazione del DNA di CMV per analisi quantitativa si consiglia l'impiego del prodotto «**CMV ELITE Standard**» (ELITechGroup S.p.A., codice STD015PLD), quattro diluizioni di DNA plasmidico a quantità nota per ottenere la curva standard.

Come controllo positivo di estrazione di acidi nucleici da campioni non cellulari e controllo di inibizione è richiesto l'impiego del prodotto generico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., codice CTRCPE), una soluzione stabilizzata contenente due DNA plasmidici e RNA genomico di fago MS2.

Un Fattore di conversione permette di esprimere i risultati quantitativi nelle Unità Internazionali di CMV del "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Regno Unito, codice 09/162).

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, 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.

Per l'allestimento manuale 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.

Per l'allestimento manuale 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 e 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 e 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

La **CMV Q - PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

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

La **CMV Q - PCR Mix** può essere usata per 5 sessioni indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni consecutive di 3 ore ciascuna.

ELITE InGenius®

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. I campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di sangue intero con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius® Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_WB_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma 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 tre giorni altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di plasma con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di plasma con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_PL_1000_100**. Questo protocollo processa 1000 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Il tubo primario non può essere utilizzato in associazione all'assay protocol **CMV ELITE_PL_1000_100**.

Liquido cefalorachidiano (CSF)

I campioni di liquido cefalorachidiano (CSF) destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti secondo le indicazioni del laboratorio evitando la contaminazione con il sangue del paziente, trasportati 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 trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione nel tubo di estrazione fornito con «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di liquido cefalorachidiano con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_CSF_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Urine

I campioni di urina destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in contenitori senza conservanti secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) per un massimo di quattro ore oppure congelati e conservati a -20 °C per un massimo di 30 giorni o a -70 °C per tempi più lunghi.

Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione nel tubo di estrazione fornito con «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Se possibile, evitare di congelare i campioni di urina. Il congelamento può causare la precipitazione di inibitori e la perdita di titolo del DNA.

In caso di congelamento, si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di urina con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_U_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Tamponi Buccali

I tamponi buccali destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti utilizzando il sistema «eSwab Collection Kit» (COPAN Italia S.p.A., codice 480CE) ed identificati secondo le indicazioni

del laboratorio. I tamponi buccali devono essere trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) per un massimo di cinque giorni oppure a +2 / +8 °C per un massimo di sette giorni, oppure congelati e conservati a -20 °C per un massimo di sei mesi oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione nel tubo di estrazione fornito con «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da tamponi buccali con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_BS_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Liquido amniotico

I campioni di liquido amniotico 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 trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione nel tubo di estrazione fornito con «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di liquido amniotico con **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_AF_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Lavaggio broncoalveolare (BAL) e bronco-aspirato (BA)

I campioni di lavaggio broncoalveolare e bronco-aspirato destinati all'estrazione del DNA devono essere raccolti in una soluzione fisiologica sterile o PBS sterile secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di una settimana. Altrimenti, i campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di un mese o a -70 °C fino ad un anno, secondo la buona pratica di laboratorio.

Prima dell'analisi con questo prodotto trasferire 0,2 mL di campione nel tubo di estrazione fornito con «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni da conservare congelati in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Se i campioni di BAL/BA sono particolarmente mucosi, possono essere liquefatti con reagenti a base di diotitretolo (es. Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific) secondo le linee guida del laboratorio.

Nota bene: per eseguire l'estrazione del DNA dai campioni di BAL/BA con lo strumento **ELITE InGenius** e l'**ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o successive), utilizzare il protocollo **CMV ELITE_BAL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Altri campioni:

Non sono disponibili dati riguardo le caratteristiche delle prestazioni con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sospensioni di leucociti, sospensioni di granulociti.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

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

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione e i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- come Calibratori, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **CMV ELITE Standard**, in associazione con il protocollo «**CMV ELITE STD**» o «**CMV ELITE STD_1000_100**,
- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **CMV- ELITE Positive Control**, in associazione con il protocollo «**CMV ELITE_PC**» o «**CMV ELITE_PC_1000_100**,
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il protocollo «**CMV ELITE_NC**» o «**CMV ELITE_NC_1000_100**».

Nota bene: ELITE InGenius con ELITE InGenius Software permette di ottenere la curva di calibrazione e la validazione dei risultati di controllo dell'amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database.

Le curve di calibrazione, approvate e memorizzate nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'impostazione della calibrazione.

La validazione dei risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadrà dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario ri-eseguire i controlli positivi e negativi.

I calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati se capita uno dei seguenti eventi:

- Un nuovo lotto di reagenti di amplificazione è avviato,
- I risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- Ogni intervento di manutenzione principale viene eseguita sullo strumento **ELITE InGenius**.

Controlli di qualità

I controlli esterni devono essere utilizzati in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali. Esempio di controlli esterni disponibili in commercio è il "CMV Molecular Q Panel" (codice CMVMQP01 da Qnostics Ltd, Regno Unito) e «AcroMetrix® CMV_{ic} Panel» (Acrometrix, Life Technologies; Stati Uniti).

PROCEDURA ELITE InGenius®

La procedura di utilizzo del prodotto «**CMV - ELITE MGB® Kit**» con il sistema **ELITE InGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere **ELITE InGenius** e selezionare la modalità «**CLOSED**»;
- verificare che i calibratori (**CMV Q-PCR standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere controllato dal menu "Calibration" nella Home page;
- verificare che i controlli di amplificazione (**CMV Positive Control** e Negative Control) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione utilizzando gli protocolli dei saggi forniti da ELITechGroup S.p.A.. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti ELITE MGB Kit, le matrici e lo strumento **ELITE InGenius**.

I protocolli del saggio disponibili per «**CMV ELITE MGB® Kit**» sono descritti nella tabella seguente.

Protocollo del saggio per CMV ELITE MGB kit			
Nome	Matrice	Rapporto unitario	Caratteristiche
CMV ELITE_WB_200_100	Sangue Intero	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
CMV ELITE_PL_200_100	Plasma	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
CMV ELITE_PL_1000_100	Plasma	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 1000 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
CMV ELITE_CSF_200_100	liquido cefalorachidiano	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Protocollo del saggio per CMV ELITE MGB kit

CMV ELITE_U_200_100	Urina	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
CMV ELITE_BS_200_100	Tamponi Buccali	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
CMV ELITE_AF_200_100	Liquido Amniotico	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
CMV ELITE_BAL_200_100	BAL / BA	gEq/mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Sonicazione: NO Fattore di Diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Se il protocollo del saggio di interesse non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup.

I protocolli per l'analisi qualitativa sono disponibili su richiesta.

Impostazione della sessione

Il prodotto **CMV ELITE MGB® Kit** in associazione a **ELITE InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- Calibrazione della corsa (PCR only),
- Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay protocol.

Nota bene: il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Le principali operazioni per l'impostazione dei quattro tipi di corsa sono descritte di seguito.

A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da **SW Graphical User Interface (GUI)**:

- Scongelare i tubi di CMV Q - PCR Mix a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongelare la CMV Q - PCR Mix al buio dato che il reagente è sensibile alla luce.

- Scongelare un tubo di CPE per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia di 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio CMV ELITE_WB_200_100).
- Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position":
 - se un tubo primario è utilizzato, selezionare "Primary Tube", il tubo primario può essere utilizzato solo partendo da 200 µL di campione;
 - se un tubo secondario è utilizzato, selezionare "Extraction Tube".
 Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il CPE e la CMV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200" o "ELITE InGenius SP 1000", tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa la "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare i tubi di CMV Q - PCR Mix a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongellare la CMV Q - PCR Mix al buio dato che il reagente è sensibile alla luce.

2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
4. Per ogni Track di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
5. Selezionare l'Assay protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio CMV ELITE_WB_200_100).
6. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
7. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "ExtraTube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare CMV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare le "PCR Cassette" e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Chiudere la porta dello strumento,
12. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C Corsa di calibrazione

Per impostare la corsa di calibrazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare i tubi di CMV Q - PCR Mix a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongellare la CMV Q - PCR Mix al buio dato che il reagente è sensibile alla luce.

2. Scongellare i tubi di CMV ELITE Standard (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵) a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. A partire dal Track di interesse, selezionare il protocollo di dosaggio da utilizzare nella colonna "Assay" (CMV ELITE_STD o CMV ELITE_STD_1000_100) e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il CMV Q - PCR standard. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
6. Caricare il CMV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare / controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare le "PCR Cassette" e i tubi di calibrazione, seguendo le istruzioni GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Chiudere la porta dello strumento,
10. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa lo standard rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, e conservato a -20 ° C.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e Negativo seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare i tubi di CMV Q - PCR Mix a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongellare la CMV Q - PCR Mix al buio dato che il reagente è sensibile alla luce.

2. Scongellare il prodotto CMV - ELITE Positive Control a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti per l'amplificazione del Controllo Positivo. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Selezionare l'"Extraction Input Volume": 200 µL per processare 200 µL di campione o a 1000 µL per processare 1000 µL di campione e assicurarsi che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Selezionare CMV ELITE_PC o CMV ELITE_PC_1000_100 per il controllo positivo e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per CMV Positive Control (Controllo Positivo),
7. Selezionare CMV ELITE_NC o CMV ELITE_NC_1000_100 e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il Controllo Negativo CMV.
8. Fare clic su "Next" per continuare l'operazione successiva.
9. Caricare il CMV Q-PCR Mix nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le "PCR Cassette", il tubo di CMV Positive Control e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento,
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITE InGenius permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: I risultati dei test dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi eseguiti sono utilizzati dal software dello strumento per compilare le "Control Chart". Quattro risultati dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi, da quattro sessioni diverse, sono richiesti per impostare la carta di controllo. I risultati successivi dei Controlli Positivi e dei Controlli Negativi sono utilizzati per monitorare le prestazioni della fase di amplificazione. Fare riferimento al manuale d'uso dello strumento per ulteriori dettagli.

Nota bene: Alla fine della corsa il Controllo Positivo rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 ° C. Il controllo Negativo rimasto deve essere eliminato.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione / calibratore / controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report").

Nota Bene: Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento ELITE InGenius.

ELITE InGenius genera i risultati con il prodotto CMV ELITE MGB Kit attraverso questa procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione,
- B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- C. Validazione dei risultati del campione,
- D. Refertazione dei risultati del campione.

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per CMV ("CMV"), nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay protocols "CMV ELITE_STD" e "CMV ELITE_STD_1000_100".

La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, è memorizzata nel database (Calibration) dopo l'approvazione da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni GUI. La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, scadrà dopo 60 giorni.

Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione per il lotto di reagente di amplificazione utilizzato. La disponibilità di una curva di calibrazione "Approved" (Status) sono visualizzati nella finestra "Calibration" del software ELITE InGenius.

Nota Bene: Quando la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Calibration" e non è possibile approvarla. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute.

Nota Bene: Nel caso in cui la curva di calibrazione sia caricata insieme ai campioni ed il risultato non sia valido, l'intera sessione non sarà valida e l'amplificazione di tutti i campioni dovrà essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e Controllo Negativo

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per CMV ("CMV"), nelle reazioni di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay protocols "CMV ELITE_PC", "CMV ELITE_PC_1000_100", "CMV ELITE_NC" e "CMV ELITE_NC_1000_100".

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) dopo l'approvazione da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni della GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono dopo 15 giorni.

Prima di analizzare un campione dopo l'approvazione della curva di calibrazione è necessario verificare la presenza di un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo approvati e validi per il lotto di PCR Mix che si intende utilizzare. La disponibilità del risultato del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione "Approved" (Status) è visualizzata nella finestra "Controls" della GUI. Se non è presente un risultato del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione approvato e valido, generarlo come descritto sopra.

Nota Bene: Quando un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

Nota Bene: Se il Controllo Positivo o il Controllo Negativo è processato insieme con i campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda specifica per CMV ("CMV") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno ("IC"), in ogni reazione di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nel protocollo del saggio.

Nota Bene: Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione e il risultato dei controlli di amplificazione per il lotto di reagente utilizzato. Si raccomanda, ma è facoltativo, di eseguire il Controllo Positivo e Negativo insieme ai calibratori. La disponibilità di una curva di calibrazione e di amplificazione e i risultati del Controllo Positivo e Negativo "Approved" (Status) sono visualizzati nelle finestre "Calibration" e "Controls" del software ELITE InGenius e sono riportati nella sezione "Assay Parameters".

I risultati sono descritti nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").

La corsa del campione è valida quando le tre condizioni riportate nella tabella sottostante sono soddisfatte.

1) Curva di calibrazione	Status
CMV Q-PCR Standard	APPROVED
2) Controllo Positivo	Status
CMV Positive Control	APPROVED
3) Controllo Negativo	Status
CMV Negative Control	APPROVED

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'**ELITE InGenius software** e dai parametri dell'Assay protocol.

La misura è espressa in "gEq / mL" or "IU / mL" come stabilito nel protocollo del saggio.

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante.

Risultato della corsa del campione	Interpretazione
CMV: DNA Detected, quantity equal to XXX gEq / mL or IU / mL	DNA di CMV rilevato nell'intervallo di misurazione del saggio, quantità come mostrato.
CMV: DNA Detected, quantity below LLoQ gEq / mL or IU / mL	DNA di CMV rilevato al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio
CMV: DNA Detected, quantity beyond ULQ gEq / mL or IU / mL	DNA di CMV rilevato al di sopra del limite superiore di quantificazione del saggio
CMV: DNA Not Detected or below LoD gEq / mL or IU / mL	DNA di CMV non rilevato o inferiore al Limite di Rivelazione del saggio.
Invalid - Retest Sample	Risultato del saggio non valido causa errore del controllo interno (estrazione errata o presenza di un inibitore).

I campioni non idonei per l'interpretazione dei risultati sono segnalati come "Invalid - Retest Sample" dall'**ELITE InGenius software**. In questo caso non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno perché si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione del DNA, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'estratto) che possono causare risultati errati e falsi negativi.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il saggio deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR".

I campioni idonei in cui non è stato possibile rilevare il DNA di CMV sono segnalati come "DNA Not Detected or below LoD". In questo caso non si può escludere che il DNA di CMV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

Nota bene: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e gli altri risultati degli esami di laboratorio relativi al paziente.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione come "Sample Report" e "Track Report".

D. Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati come "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i campioni selezionati (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i Track selezionati.

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

ELITE BeGenius®

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti in EDTA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. I campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di sangue intero con **ELITE BeGenius®** e con **ELITE BeGenius® Software** versione 2.0 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_Be_WB_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma 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 tre giorni altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di plasma con **ELITE BeGenius®** e con **ELITE BeGenius® Software** versione 2.0 (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **CMV ELITE_Be_PL_200_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE** con 10 µL / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Quando si usa il tubo primario, il volume del campione varia in base al tipo di tubo caricato, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit di estrazione per ulteriori informazioni.

Altri campioni:

Non sono disponibili dati riguardo le caratteristiche delle prestazioni con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: liquido cefalorachidiano (CSF), Urine, Tamponi buccali, Liquido Amniotico, Lavaggio broncoalveolare (BAL) e bronco-aspirato (BA), sospensioni di leucociti, sospensioni di granulociti.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

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

Controlli di amplificazione

Prima di analizzare ogni campione, è assolutamente obbligatorio generare e approvare la curva di calibrazione e i controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione:

- come Calibratori, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **CMV ELITE Standard**, in associazione con il protocollo «**CMV ELITE_Be_STD**»,
- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **CMV- ELITE Positive Control**, in associazione con il protocollo «**CMV ELITE_Be_PC**»,
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con il protocollo «**CMV ELITE_Be_NC**».

Nota bene: ELITE BeGenius con **ELITE BeGenius Software** permette di ottenere la curva di calibrazione e la validazione dei risultati di controllo dell'amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database.

Le curve di calibrazione, approvate e memorizzate nel database, scadranno dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'impostazione della calibrazione.

La validazione dei risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadrà dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario ri-eseguire i controlli positivi e negativi.

I calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ritestati se capita uno dei seguenti eventi:

- Un nuovo lotto di reagenti di amplificazione è avviato,
- I risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- Ogni intervento di manutenzione principale viene eseguita sullo strumento.

Controlli di qualità

I controlli esterni di qualità devono essere utilizzati in conformità a leggi locali, statali, organizzazioni di accreditamento federali, se possibile. I controlli esterni di qualità sono disponibili sul mercato.

PROCEDURA ELITE BeGenius®

La procedura di utilizzo del prodotto «**CMV - ELITE MGB® Kit**» con il sistema **ELITE BeGenius** comprende tre fasi:

- Verifica che il sistema sia pronto
- Impostazione della sessione
- Esame e approvazione dei risultati

Verifica che il sistema sia pronto

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

- accendere **ELITE BeGenius** e selezionare la modalità «**CLOSED**»;
- verificare che i calibratori (**CMV Q-PCR standard**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere controllato dal menu "Calibration" nella Home page;
- verificare che i controlli di amplificazione (**CMV Positive Control** e **CMV Negative Control**) siano processati, approvati e non scaduti (status). Questo può essere verificato dal menu "Control" nella Home page;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione e utilizzando gli Assay protocol forniti da ELITEchGroup S.p.A.. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti ELITE MGB Kit, le matrici e lo strumento **ELITE BeGenius**.

I protocolli dei saggi disponibili per «**CMV ELITE MGB® Kit**» sono descritti nella tabella seguente.

Protocollo del saggio per CMV ELITE MGB® kit e ELITE BeGenius			
Nome	Matrice	Unità di misura	Caratteristiche
CMV ELITE_Be_WB_200_100	Sangue Intero	gEq /mL o UI/mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL
CMV ELITE_Be_PL_200_100	Plasma	gEq /mL	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL PCR volume iniziale del campione: 20 µL

Se il protocollo del saggio di interesse, non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITEchGroup.

I protocolli per l'analisi qualitativa sono disponibili su richiesta.

Impostazione della sessione

Il prodotto **CMV ELITE MGB kit** in associazione a **ELITE BeGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- Corsa di Calibrazione (PCR only),
- Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay protocol.

Nota bene: il sistema **ELITE BeGenius** può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Le principali operazioni per l'impostazione dei quattro tipi di corsa sono descritti di seguito.

A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da **SW Graphical User Interface (GUI)**:

- Scongelare i tubi di **CMV Q - PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Scongelare i tubi di **CPE** a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti in numero sufficiente per la sessione. Ogni tubo è sufficiente per 12 estrazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Rimuovere tutti i Rack dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
- Selezionare il "run mode": "Extract + PCR"..
- Caricare i campioni nella cooling area dal rack 5 e 4 per provette, partendo sempre dal rack 5.
- Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

Nota Bene: se un tubo secondario è utilizzato selezionare "2 mL Tube". Se il tubo secondario non ha il barcode, digitare manualmente il Sample ID.

- Assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Selezionare il protocollo del test da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio i.e. CMV ELITE_Be_WB_200_100). Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Se deve essere effettuata una seconda estrazione, ripetere i passaggi da 7 a 9 utilizzando il rack per provette campione L4.
- Caricare i tubi di eluizione barcodati nella cooling area partendo dal rack per eluati L3.

Nota Bene: tubi di eluizione possono essere etichettati per aumentare la tracciabilità.

- Inserire il Rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Ripetere i passaggi 11 e 12 utilizzando il rack per reagenti/eluati L2.
- Caricare il CPE e la CMV Q-PCR Mix nella cooling area, rack 1.
- Inserire il rack per reagente L1 nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il rack per estrazione con le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200" e tutti i consumabili richiesti, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, l'**ELITE BeGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Note: Alla fine della corsa la rimanenza dei campioni estratti può essere rimossa dallo strumento, i tubi chiusi, identificati e riposti a -20 °C.

Note: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con il prodotto di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminati evitando contaminazioni di tipo ambientale.

Note: La PCR Mix può essere usata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata sullo strumento nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Miscelare delicatamente e centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

B Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

- Scongelerare i tubi di CMV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni in condizioni ottimali di consumo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Rimuovere i rack 1, 2, e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione
- Selezionare il "run mode": "PCR Only".
- Caricare i campioni nel rack 3 e 2 (partendo sempre dal rack 3)
- Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

- Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che l'"Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio CMV ELITE_Be_WB_200_100).
- Caricare CMV Q – PCR Mix nella cooling area.
- Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare l' apposito basket con le "PCR Cassette" nell' area di caricamento seguendo le istruzioni GUI. Cliccare "Next" per proseguire con le impostazioni.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE BeGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 ° C. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

C Corsa di calibrazione

Per impostare la corsa di calibrazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

- Scongelerare i tubi di CMV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Scongelerare la CMV Q - PCR Mix al buio dato che il reagente è sensibile alla luce.
- Scongelerare i tubi di CMV ELITE Standard (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵) a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni tubo è sufficiente per 8 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizionarli sul tavolo di preparazione.
- Selezionare il "run mode": "PCR Only".
- Caricare i calibratori nella cooling area nel rack per eluati L3.
- Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Selezionare l'Assay Protocol "CMV ELITE_Be_STD" da utilizzare nella colonna "Assay". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare CMV Q – PCR Mix nella cooling area.
- Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.

12. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITE BeGenius permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa lo standard rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, e conservato a -20 ° C.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e Negativo seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare i tubi di CMV Q - PCR Mix in numero sufficiente per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per preparare 24 reazioni, in condizioni ottimali di utilizzo del reagente. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

Note: Scongellare la CMV Q - PCR Mix al buio dato che il reagente è sensibile alla luce.

2. Scongellare il prodotto CMV - ELITE Positive Control a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti per l'amplificazione del Controllo Positivo. Ogni tubo è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.

3. Trasferire almeno 50 µL di acqua ultrapura per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.

4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
5. Rimuovere i rack 1, 2 e 3 dalla "Cooler Unit" e posizzarli sul tavolo di preparazione.
6. Selezionare il "run mode": "PCR Only".
7. Caricare i calibratori nella cooling area nel rack per eluati L3.
8. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Selezionare l'Assay Protocol "CMV ELITE_Be_STD" da utilizzare nella colonna "Assay". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare CMV Q – PCR Mix nella cooling area.
11. Inserire il rack nella "Cooler Unit". Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Caricare e controllare i Rack puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
13. Caricare il Rack per PCR con le "PCR Cassette", seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
14. Chiudere lo sportello dello strumento.
15. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITE BeGenius permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa lo standard rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato, e conservato a -20 ° C.

Nota bene: Alla fine della corsa le "PCR Cassette" con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimosse dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei

prodotti di reazione.

Nota bene: La PCR Mix può essere utilizzata per 5 sessioni di lavoro indipendenti di 3 ore ciascuna oppure può essere conservata a bordo nel blocco refrigerato fino a 3 sessioni di lavoro consecutive di 3 ore ciascuna. Mescolare delicatamente e ridurre il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

Controllo e approvazione dei risultati

Alla fine della corsa, lo schermo "Results Display" viene mostrato automaticamente. In questa schermata il risultato del campione / calibraore / controllo e le informazioni riguardanti la corsa sono mostrate. Su questa schermata è possibile approvare i risultati, stamparli o salvare i documenti ("Sample Report" o "Track Report").

Nota bene: Il sistema ELITE BeGenius può essere collegato al "Location Information Server" (LIS) attraverso il quale è possibile inviare i risultati delle al centro dati del laboratorio. Per ulteriori dettagli consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Lo strumento ELITE BeGenius genera i risultati utilizzando il kit CMV ELITE MGB attraverso la seguente procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione,
- B. Validazione dell' amplificazione dei risultati del controllo positivo e negativo,
- C. Validazione dei risultati del campione,
- D. Creazione dei report con i risultati dei campioni.

Note: Per favore, per maggiori dettagli far riferimento ai medesimi capitoli dello strumento ELITE InGenius.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI di ELITE InGenius and ELITE BeGenius

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione, permette di rilevare la presenza di circa 10 copie di DNA nei 20 µL aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica di questo saggio è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in in DNA genomico umano con titolo di 500 ng / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 12 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. su due diversi strumenti.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico CMV + 500 ng di DNA genomico umano	24	23	1

La sensibilità analitica del saggio con le diverse matrici è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV ed in associazione a ELITE InGenius. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in matrice negativa per il DNA di CMV. Il pannello era composto da almeno sei punti intorno alla concentrazione limite e ciascun punto del pannello è stato testato in almeno 12 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, preparazione della corsa, estrazione, amplificazione real time e interpretazione dei risultati con ELITE InGenius e 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 uguale al 95%.

I risultati finali per ogni matrice sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione con ELITE InGenius (UI / mL)			
Volume di campione	Matrice	95% positività	Intervallo di confidenza del 95%
			valore inferiore valore superiore

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

200 µL	sangue intero	109 UI / mL	71 UI / mL	239 UI / mL
	plasma	88 UI / mL	50 UI / mL	291 UI / mL
	liquido cefalorachidiano	58 UI / mL	48 UI / mL	82 UI / mL
	urina	151 UI / mL	119 UI / mL	214 UI / mL
	tamponi buccali	44 UI / mL	36 UI / mL	57 UI / mL
	liquido amniotico	57 UI / mL	46 UI / mL	78 UI / mL
1000 µL	BAL / BA	97 UI / mL	58 UI/mL	291 UI/mL
	plasma	17 UI / mL	14 UI / mL	22 UI / mL

La sensibilità analitica espressa in gEq / mL è stata calcolata applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato a pagina 27.

La sensibilità analitica per ogni matrice come gEq/mL è riportata sotto.

Limite di rilevazione con ELITE InGenius (gEq / mL)				
Volume di campione	Matrice	95% positività	Intervallo di confidenza del 95%	
			valore inferiore	valore superiore
200 µL	sangue intero	156 gEq / mL	99 gEq / mL	332 gEq / mL
	plasma	293 gEq / mL	167 gEq / mL	970 gEq / mL
	liquido cefalorachidiano	193 gEq / mL	160 gEq / mL	273 gEq / mL
	urina	216 gEq / mL	170 gEq / mL	306 gEq / mL
	tamponi buccali	220 gEq / mL	180 gEq / mL	285 gEq / mL
	liquido amniotico	285 gEq / mL	230 gEq / mL	390 gEq / mL
1000 µL	BAL / BA	485 gEq / mL	290 gEq / mL	1455 gEq / mL
	plasma	57 gEq / mL	47 gEq / mL	73 gEq / mL

Il valore del limite di rilevazione (LoD) calcolato per le matrici di sangue intero e plasma (volume del campione 200 µL) in associazione a ELITE InGenius ed ELITE BeGenius è stato verificato testando 20 replicati di sangue intero raccolto in EDTA e 20 replicati di campioni di plasma raccolto in EDTA positivamente con materiale di riferimento certificato CMV (1st WHO International Standard, NIBSC) alla concentrazione dichiarata.

La sensibilità analitica del saggio come limite di rilevazione è confermata se 18 campioni su 20 danno un risultato positivo, come indicato nella guida CLSI EP17-A.

I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione per sangue intero e plasma e ELITE InGenius®					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Sangue intero raccolto in EDTA	109 UI / mL	CMV	20	20	0
Plasma raccolto in EDTA	88 UI / mL	CMV	20	20	0

Limite di rilevazione per sangue intero e plasma e ELITE BeGenius®					
Campione	Titolo	Target	N	Positivo	Negativo
Sangue intero raccolto in EDTA	109 UI / mL	CMV	20	20	0
Plasma raccolto in EDTA	88 UI / mL	CMV	20	19	1

Il valore LoD per il target CMV è stato confermato a 109 UI / mL per il sangue intero raccolto in EDTA e a 88 UI / mL per il plasma raccolto in EDTA.

Intervallo di misurazione lineare

Sangue intero:

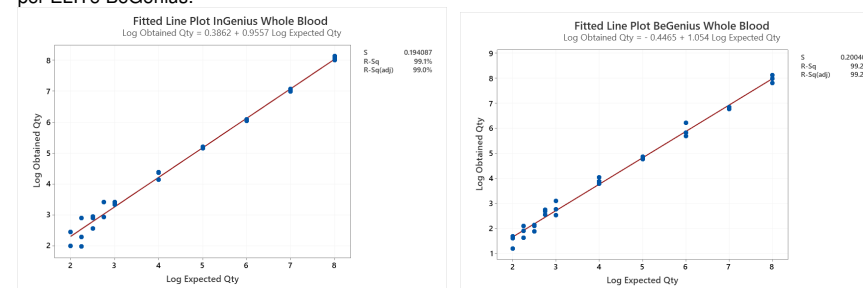
L'intervallo di misurazione lineare del kit CMV ELITE MGB® Kit utilizzato in associazione con Sangue

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

intero e ELITE InGenius ed ELITE BeGenius è stato testato utilizzando un pannello preparato diluendo un materiale di riferimento CMV (Notovir Italia) in matrice negativa per il DNA di CMV. Il pannello era costituito da otto punti di diluizione da 10⁸ a 10² UI/mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 repliche.

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita mediante regressione lineare, ha dimostrato una risposta lineare per tutti i livelli di diluizione con un Coefficiente di Correlazione (R2) pari a 0,991 per ELITE InGenius e 0,992 per ELITE BeGenius.



Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione, che fornisce risultati quantitativi precisi (Standard Deviation pari a 0,2702 Log UI / mL per ELITE InGenius e 0,1925 Log UI / mL per ELITE BeGenius) e accurati (Bias pari a 0,3453 Log UI / mL per ELITE InGenius e -0,1462 Log UI / mL per ELITE BeGenius): 178 UI / mL.

Il Limite Superiore dell'intervallo di misurazione lineare (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta testata, che fornisce risultati quantitativi precisi (Standard Deviation pari a 0,0597 Log UI / mL per ELITE InGenius e 0,1590 Log UI / mL per ELITE BeGenius) e accurati (Bias uguale a -0,0683 Log UI / mL per ELITE InGenius e 0,0249 Log UI / mL per ELITE BeGenius): 100.000.000 UI / mL.

L'intervallo di misura lineare in gEq / mL per sangue intero viene calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato a pagina 33.

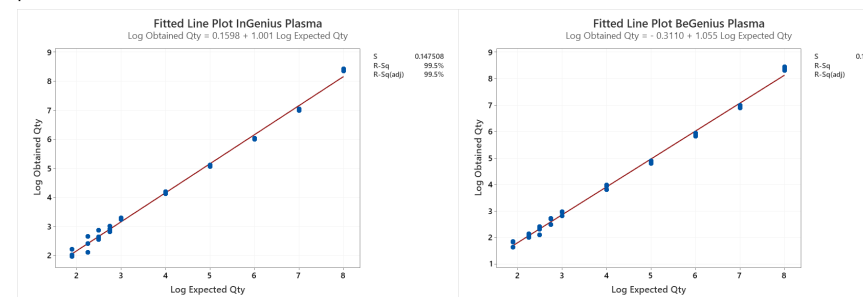
I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Intervallo di misura lineare per sangue intero e ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	178	100.000.000
gEq / mL	254	142.857.143

Plasma (volume campione 200 µL):

Il range di misurazione lineare del kit CMV ELITE MGB® Kit utilizzato in associazione con Plasma ed ELITE InGenius ed ELITE BeGenius è stato testato utilizzando un pannello preparato diluendo un materiale di riferimento CMV (Notovir, Italia) in matrice negativa per il DNA di CMV. Il pannello era costituito da otto punti di diluizione da 10⁸ a 80 IU / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 repliche.

L'analisi dei dati ottenuti, effettuata mediante regressione lineare, ha dimostrato una risposta lineare per tutti i livelli di diluizione con un Coefficiente di Correlazione (R2) pari a 0,995 per ELITE InGenius e 0,996 per ELITE BeGenius.



Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLOQ) è stato fissato alla concentrazione, che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,2701 Log UI / mL per ELITE InGenius e 0,2114 Log UI / mL per ELITE BeGenius) e accurati (Errore uguale a -0,3988 Log UI / mL per ELITE InGenius e -0,0619 Log UI / mL per ELITE BeGenius): 88 UI/mL.

Il Limite Superiore di Quantificazione (ULOQ) è stato fissato alla concentrazione più alta testata, che fornisce risultati quantitativi precisi (Deviazione Standard pari a 0,0351 Log UI / mL per ELITE InGenius e 0,0675 Log UI / mL per ELITE BeGenius) e accurati (Errore uguale a -0,3988 Log UI / mL per ELITE InGenius e -0,3865 Log UI / mL per ELITE BeGenius): 100.000.000 UI / mL.

L'intervallo di misura lineare in gEq / mL per Plasma è calcolato applicando il fattore di conversione specifico riportato a pagina 33.

I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Intervallo di misura lineare per plasma e ELITE InGenius e ELITE BeGenius		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	88	100.000.000
gEq / mL	293	333.333.334

Altre matrici

La linearità di questo test utilizzato in associazione con **ELITE InGenius** è stata verificata con un pannello di diluizioni CMV nelle seguenti diverse matrici: plasma (volume campione 1000 µL), liquido cerebrospinale, urina, tampone buccale, liquido amniotico, BAL / BA.

La linearità del saggio in modalità "PCR Only" è stata valutata utilizzando un pannello di diluizioni (1 Log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 2 x 10⁶ genomi Equivalenti per reazione a 2 x 10¹ genomi Equivalenti per reazione sono stati impiegati in 5 replicati per eseguire l'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 (coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99).

La linearità del saggio in modalità "Extract+PCR" con le diverse matrici è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV ed in associazione a **ELITE InGenius**. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in matrice negativa per il DNA di CMV. Il pannello presentava 5 passaggi di diluizione di 1 Log da 10⁶ a 10² UI / mL. Ciascun punto del pannello è stato testato in almeno 3 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, preparazione della corsa, estrazione, amplificazione real time e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e 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.

Limiti di quantificazione

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato alla più bassa concentrazione che presenti il 100% di positività e risultati quantitativi sufficientemente accurati e precisi. Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato alla più alta concentrazione testata che fornisce risultati quantitativi sufficientemente accurati e precisi.

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare come gEq / mL sono stati calcolati applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato a pagina 33.

I risultati finali per ogni matrice sono riportati nelle tabelle seguenti.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di plasma e ELITE InGenius			
Volume di campione	Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
1000 µL	UI / mL	178	1.500.000
	gEq / mL	593	5.000.000

Intervallo di misurazione lineare con campioni di liquido cefalorachidiano e ELITE InGenius			
Volume di campione	Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
200 µL	UI / mL	101	15.000.000
	gEq / mL	335	50.000.000

Intervallo di misurazione lineare con campioni di urina e ELITE InGenius			
Volume di campione	Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
200 µL	UI / mL	316	35.000.000
	gEq / mL	451	50.000.000

Intervallo di misurazione lineare con campioni di tamponi buccali e ELITE InGenius			
Volume di campione	Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
200 µL	UI / mL	100	10.000.000
	gEq / mL	500	50.000.000

Intervallo di misurazione lineare con campioni di liquido amniotico e ELITE InGenius			
Volume di campione	Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
200 µL	UI / mL	100	10.000.000
	gEq / mL	500	50.000.000

Intervallo di misurazione lineare con campioni di BAL / BA e ELITE InGenius			
Volume di campione	Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
200 µL	UI / mL	178	10.000.000
	gEq / mL	890	50.000.000

Ripetibilità

La Ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto CMV ELITE MGB Kit in associazione con i sistemi **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** è stata testata analizzando un pannello di campioni di sangue intero raccolti in EDTA. Il pannello comprendeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato "1st WHO International Standard for CM Virus DNA (codice NIBSC 09/162, Regno Unito) a concentrazione di 3 x LoD (circa 327 UI / mL) e di 10 x LoD (circa 1090 UI / mL).

La Ripetibilità Intra – Session su **ELITE InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

La Ripetibilità Inter – Sessione su **ELITE InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, in due giorni diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti

Ripetibilità Intra – Sessione ELITE InGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	24,18	0,17	0,69
3 x LoD	8 / 8	35,91	051	1,42				
10 x LoD	8 / 8	33,98	0,29	0,86				

Ripetibilità Inter – Sessione ELITE InGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	24,20	0,22	0,90
3 x LoD	16 / 16	36,09	0,78	2,15				
10 x LoD	16 / 16	34,07	0,25	0,75				

Nel test di ripetibilità su **ELITE InGenius**, il test ha rilevato il target CMV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct, che non superavano il 2,2% per CMV e lo 0,9% per il controllo interno.

La Ripetibilità Intra – Sessione su **ELITE BeGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, nello stesso giorno. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE BeGenius in modalità "Extract + PCR".

La Ripetibilità Inter – Sessione su **ELITE BeGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore, in due giorni diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE BeGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare la %CV al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Una sintesi dei risultati è riportata nelle tabelle seguenti.

Ripetibilità Intra – Sessione ELITE BeGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	27,21	0,38	1,39
3 x LoD	8 / 8	37,21	0,49	1,33				
10 x LoD	8 / 8	35,03	0,52	1,48				

Ripetibilità Inter – Sessione ELITE BeGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	27,18	0,37	1,38
3 x LoD	16 / 16	37,51	0,61	1,63				
10 x LoD	16 / 16	35,06	0,44	1,25				

Nel test di ripetibilità su **ELITE BeGenius**, il test ha rilevato il target CMV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano l'1,6% per CMV e l'1,4% per il controllo interno.

Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto CMV ELITE MGB Kit in associazione con i sistemi **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** è stata testata analizzando un pannello di campioni di sangue intero. Il pannello comprendeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato "1st WHO International Standard for CM Virus DNA (codice NIBSC 09/162, Regno Unito) a concentrazione di 3 x LoD (circa 327 UI / mL) e di 10 x LoD (circa 1090 UI / mL).

La riproducibilità inter-strumento su **ELITE InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, in due giorni differenti, utilizzando lo stesso lotto e due strumenti diversi, da parte di due operatori diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul

sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

La riproducibilità Inter – Lotto su **ELITE InGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, utilizzando due lotti diversi e lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare il %CV al fine di valutare la Riproducibilità come imprecisione.

Un riepilogo dei risultati è riportato nella tabella seguente.

Riproducibilità inter-strumento ELITE InGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,31	0,71	2,82
3 x LoD	8 / 8	35,96	0,81	2,26				
10 x LoD	8 / 8	33,62	0,36	1,07				

Riproducibilità inter-lotto ELITE InGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25,20	0,65	2,59
3 x LoD	8 / 8	35,97	0,65	1,82				
10 x LoD	8 / 8	33,72	0,29	0,86				

Nel test di riproducibilità su **ELITE InGenius**, il test ha rilevato il target CMV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano il 2,3% per CMV e il 2,8% per il controllo interno.

La riproducibilità inter-strumento su **ELITE BeGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in una sessione al giorno, in due giorni, con due strumenti diversi da parte di due operatori diversi. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITE BeGenius** in modalità "Extract + PCR".

La Riproducibilità Inter – Lotto su **ELITE BeGenius** è stata ottenuta attraverso l'analisi di campioni in otto replicati, in due sessioni al giorno, con due lotti diversi e lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema **ELITE BeGenius** in modalità "Extract + PCR".

I valori Ct del target e del Controllo Interno sono stati utilizzati per calcolare il %CV al fine di valutare la Riproducibilità come imprecisione.

Un riepilogo dei risultati è riportato nella tabella seguente.

Riproducibilità inter-strumento ELITE BeGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28,29	0,48	1,69
3 x LoD	8 / 8	36,06	0,46	1,27				
10 x LoD	8 / 8	34,12	0,23	0,66				

Riproducibilità inter-lotto ELITE BeGenius								
Campione	CMV				Controllo Interno			
	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Media Ct	SD	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28,30	0,47	1,65
3 x LoD	8 / 8	36,19	0,51	1,41				
10 x LoD	8 / 8	34,22	0,12	0,36				

Nel test di riproducibilità su **ELITE BeGenius**, il test ha rilevato il target CMV come previsto e ha mostrato valori bassi di %CV di Ct che non superavano l'1,4% per CMV e l'1,7% per il controllo interno.

Riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento calibrato il pannello di «CMV Molecular "Q" Panel» (Qnostics, Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati, ottenuti partendo da 200 µL di campione, sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE InGenius				
Campione	Titolo nominale UI / mL	Titolo nominale Log UI / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log UI / mL
CMVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	5,024
CMVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	3,996
CMVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	3,060
CMVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati come positivi ad un titolo che rientra nell'intervallo valore atteso ± 0,5 Log.

I risultati, ottenuti partendo da 1000 µL di campione, sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE InGenius				
Campione	Titolo nominale UI / mL	Titolo nominale Log UI / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log UI / mL
CMVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	4,679
CMVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	3,717
CMVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	2,733
CMVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati come positivi ad un titolo che rientra nell'intervallo valore atteso ± 0,5 Log.

Ulteriori test sono stati eseguiti utilizzando come materiale di riferimento calibrato un pannello di diluizioni di CMV «QCMD 2014 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI / mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione per **ELITE InGenius** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE InGenius				
Campione	Consensus Log UI / mL	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log UI / mL
CMVDNA14-01	2,468	0,343	2/2	2,256
CMVDNA14-02	3,034	0,281	2/2	2,915
CMVDNA1403	3,383	0,368	2/2	3,185
CMVDNA14-04	3,014	0,251	2/2	2,976
CMVDNA14-05	1,859	0,462	2/2	1,706
CMVDNA14-06	2,767	0,325	2/2	2,526
CMVDNA14-07	4,030	0,280	2/2	3,924
CMVDNA14-08	Negativo	NA	0/2	-
CMVDNA14-09	2,065	0,512	2/2	1,273
CMVDNA14-10	3,947	0,278	2/2	3,946

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati. Nell'analisi quantitativa, 8/9 campioni positivi sono stati correttamente quantificati entro l'intervallo definito dal Consensus EQA ± 1 Deviazione Standard. Un campione (CMVDNA14-09) è stato quantificato in 2 Deviazioni Standard. Questo può essere spiegato dal titolo del campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione.

Ulteriori test sono stati eseguiti utilizzando come materiale di riferimento un pannello calibrato «AcroMetrix® CMV_{ic} Panel» (Acrometrix, Life Technologies; Stati Uniti). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI / mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione per **ELITE InGenius** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE InGenius				
Campione	Titolo nominale UI / mL	Titolo nominale Log UI / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log UI / mL
CMV DNA 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,386
CMV DNA 3E5	300.000	5,477	2/2	5,444
CMV DNA 3E4	30.000	4,477	2/2	4,473
CMV DNA 3E3	3.000	3,477	2/2	3,441
CMV DNA 3E2	300	2,477	2/2	2,575

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati come positivi ad un titolo che rientra nell'intervallo atteso ± 0,5 Log.

Ulteriori test, a partire da 1000 µL di campione, sono stati eseguiti utilizzando come materiale di riferimento calibrato un pannello di diluizioni di CMV «QCMD 2017 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI / mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione per **ELITE InGenius** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE InGenius			
Campione	Consensus Log UI / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log UI / mL
CMVDNA17S-01	2,431	2/2	2,362
CMVDNA17S-02	3,762	2/2	3,665
CMVDNA17S-03	3,920	2/2	3,822
CMVDNA17S-04	2,847	2/2	2,671
CMVDNA17S-05	2,572	2/2	2,189
CMVDNA17S-06	2,849	2/2	2,658
CMVDNA17S-07	3,902	2/2	3,785
CMVDNA17S-08	3,746	2/2	3,667
CMVDNA17S-09	Negative	0/2	-
CMVDNA17S-10	3,900	2/2	3,707

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati. I campioni positivi hanno riportato un titolo che rientra nell'intervallo valore atteso $\pm 0,5$ Log.

Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione da utilizzare con questo saggio per trasformare il risultato quantitativo da gEq / mL in Unità Internazionali / mL è stato determinato utilizzando un pannello di materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Regno Unito, codice 09/162) nelle diverse matrici negative per il DNA di CMV ed in associazione a **ELITE InGenius**. Il pannello presentava almeno 3 passaggi di diluizione di 1 Log. Ciascun punto del pannello è stato testato in almeno 10 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi, preparazione della corsa, estrazione, amplificazione real time e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati finali per ogni matrice sono riportati nelle tabelle seguenti.

Conversione alle Unità Internazionali con ELITE InGenius		
Volume di campione	Matrice	Fc (UI / gEq)
200 µL	sangue intero	0,7
	plasma	0,3
	liquido cefalorachidiano	0,3
	urina	0,7
	tamponi buccali	0,2
	liquido amniotico	0,2
	BAL / BA	0,2
1000 µL	plasma	0,3

Il fattore di conversione del kit CMV ELITE MGB® Kit utilizzato in associazione con il **sangue intero** raccolto in EDTA ed **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** è stato verificato con un pannello di diluizioni di CMV. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (codice NIBSC 09/162, Regno Unito), in una matrice negativa per il DNA di CMV. Il pannello era costituito da sette punti di diluizione da circa 10^6 UI / mL a $10^{2,5}$ UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati.

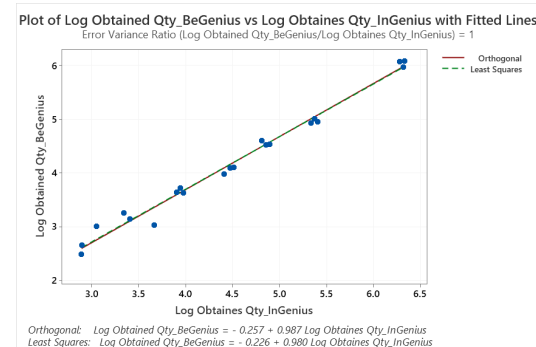
La precisione di quantificazione del target, come deviazione standard di Log UI / mL, era inferiore a 0,5 Log sia per **ELITE InGenius** che per **ELITE BeGenius**.

L'accuratezza della quantificazione del target, come differenza tra le concentrazioni teoriche e le concentrazioni misurate in Log UI / mL, era inferiore a 0,5 Log sia per **ELITE InGenius** che per **ELITE BeGenius**.

Questi risultati hanno confermato i fattori di conversione calcolati per il sangue intero con **ELITE InGenius**.

I risultati ottenuti con **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare al fine di calcolare la correlazione tra i metodi.

I risultati sono riassunti nella figura seguente.



L'analisi della regressione ortogonale ha generato un'intercetta pari a -0,257 (IC 95%: -0,503; -0,011) e una pendenza pari a 0,987 (IC 95%: 0,934; 1,040). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,986.

Il fattore di conversione del kit CMV ELITE MGB® Kit utilizzato in associazione con il **Plasma** raccolto in EDTA (volume campione 200 µL) e **ELITE InGenius** ed **ELITE BeGenius** è stato verificato con un pannello di diluizioni di CMV. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (codice NIBSC 09/162, Regno Unito), in una matrice negativa per DNA di CMV. Il pannello era costituito da otto punti di diluizione da circa 10^6 UI / mL a 10^2 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati.

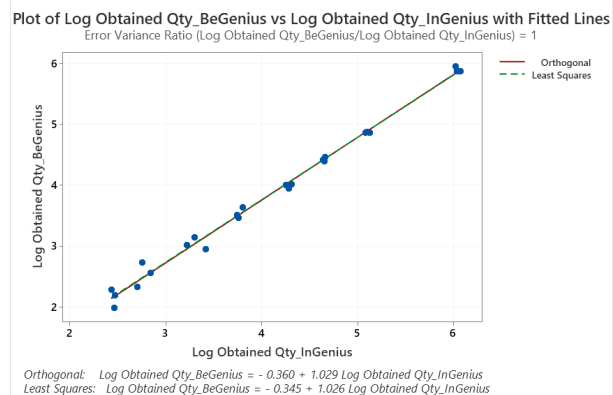
La precisione di quantificazione target, come deviazione standard di Log IU/mL, era inferiore a 0,5 Log sia per **ELITE InGenius** che per **ELITE BeGenius**.

L'accuratezza della quantificazione del target, come differenza tra le concentrazioni teoriche e le concentrazioni misurate in Log IU/ml, era inferiore a 0,5 Log sia per **ELITE InGenius** che per **ELITE BeGenius**.

Questi risultati hanno confermato i fattori di conversione calcolati per il plasma con **ELITE InGenius**.

I risultati ottenuti da **ELITE InGenius** e **ELITE BeGenius** sono stati analizzati mediante regressione ortogonale e lineare al fine di calcolare la correlazione tra i metodi.

I risultati sono riassunti nella figura seguente.



In questo test, l'analisi di regressione ortogonale ha generato una pendenza pari a 1,029 (IC 95%: 0,993 - 1,065) e un'intercetta pari a -0,360 (IC 95%: -0,510; -0,209). L'analisi di regressione lineare ha generato un R2 di 0,993.

Robustezza: assenza di contaminazione incrociata

La robustezza del saggio, come assenza di contaminazione incrociata, è stata verificata analizzando i risultati di cinque sessioni in cui campioni negativi per il DNA di CMV sono stati alternati a campioni positivizzati per il DNA di CMV. Nessun campione negativo per il DNA di CMV è risultato positivo.

L'assenza di contaminazione incrociata è stata verificata utilizzando un campione di sangue intero negativo per il DNA di CMV positivizzato con il materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC codice 09/162, Regno Unito) a una carica virale di 10.000 UI / mL e un campione di sangue intero negativo per il DNA di CMV. Cinque serie di 12 campioni, alternando un campione positivizzato con un campione negativo, sono state impiegate per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'ELITE InGenius e i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	30	30	0
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	30	0	30

Robustezza: tasso globale di errore del sistema

La robustezza del saggio, come tasso globale di errore del sistema che porta a risultati falsi negativi, è stata verificata eseguendo l'analisi di un pannello di campioni positivizzati per il DNA di CMV a basso titolo ed è risultato uguale all'1,7%.

Il tasso globale di errore è stato verificato utilizzando un pannello di campioni di sangue intero negativo per il DNA di CMV positivizzato con il materiale di riferimento calibrato e certificato CMVDNA12-01, un campione del "QCMD 2012 Human Cytomegalovirus EQA Panel" (Qnostics Ltd, Regno Unito), a una carica virale di 750 UI / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'ELITE InGenius e i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	60	59	1

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

Sangue intero e plasma (volume campione 200 µL):

La sensibilità diagnostica del test, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando alcuni campioni clinici positivi al DNA di CMV in associazione con ELITE InGenius. Poiché ELITE BeGenius ha mostrato prestazioni analitiche equivalenti a ELITE InGenius, le prestazioni diagnostiche dell' assay su entrambi gli strumenti sono considerate analogamente equivalenti. Per questo motivo, la sensibilità diagnostica dell' Assay ottenuta in associazione con lo strumento ELITE InGenius può essere applicata anche allo strumento ELITE BeGenius.

Le prove, partendo da 200 µL di campione sono state eseguite su:

- 60 campioni di sangue intero raccolto in EDTA positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).
- 54 campioni di plasma raccolto in EDTA di pazienti positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Volume di campione	Campioni	N	positivi	negativi
200 µL	Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	60	60	0
	Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	54	54	0

Tutti i campioni di sangue intero e plasma sono stati confermati positivi. La sensibilità diagnostica, in questi test, è stata pari al 100% sia per i campioni di sangue intero che di plasma.

Altre matrici

La sensibilità diagnostica del test, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando alcuni campioni clinici positivi al DNA di CMV in associazione con ELITE InGenius e le seguenti matrici: plasma (volume campione 1000 µL), liquido cerebrospinale, urina, tampone buccale, liquido amniotico, BAL / BA.

Il test, a partire da 200 µL di campione, è stato eseguito su:

- 20 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di CMV, che sono stati positivizzati per il DNA di CMV aggiungendo "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Regno Unito, codice 09/162).
- 31 campioni di urina di pazienti positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).
- 50 campioni di tamponi buccali negativi per il DNA di CMV, che sono stati positivizzati per il DNA di CMV aggiungendo "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Regno Unito, codice 09/162).
- 11 campioni di liquido amniotico di pazienti positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e su 20 campioni di liquido amniotico negativi per il DNA di CMV, che sono stati positivizzati per il DNA di CMV aggiungendo "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Regno Unito, codice 09/162).
- 49 campioni di BAL / BA di pazienti positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).

Le prove partendo da 1000 µL di campione sono state eseguite su 60 campioni di plasma raccolto in EDTA di pazienti positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con l'ELITE InGenius e i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Sample Volume	Samples	N	positive	negative
200 µL	Liquido cefalorachidiano positivamente per il DNA di CMV	20	20	0
	Urine positive per il DNA di CMV	31	31	0
	Tamponi buccali positivamente per il DNA di CMV	50	50	0
	Fluidi Amniotico positivo o positivamente per il DNA di CMV	31	31	0
	BAL / BA positivi per il DNA di CMV	49	49	0
1000 µL	Plasma raccolto in EDTA e positivo per il DNA di CMV	60	58	2

Tutti i campioni, analizzati partendo da 200 µL di campione, sono risultati validi per l'analisi e sono stati confermati positivi. La sensibilità diagnostica del saggio in queste prove è risultata uguale al 100%.

Tutti i campioni, analizzati partendo da 1000 µL di campione, sono risultati validi per l'analisi, 58 su 60 campioni di plasma sono stati confermati positivi, due campioni erano discrepanti negativi. La sensibilità diagnostica del saggio, in queste prove, è risultata uguale al 97%.

La sensibilità diagnostica totale del saggio in queste prove è risultata uguale al 96,6 per il plasma%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

Sangue intero e plasma (volume campione 200 µL):

La specificità diagnostica del test, come conferma di campioni negativi, è stata valutata analizzando alcuni campioni clinici negativi al DNA di CMV in associazione con **ELITE InGenius**. Poiché **ELITE BeGenius** ha mostrato prestazioni analitiche equivalenti a **ELITE InGenius**, le prestazioni diagnostiche dell'assay su entrambi gli strumenti sono considerate analogamente equivalenti. Per questo motivo, la sensibilità diagnostica dell'Assay ottenuta in associazione con lo strumento **ELITE InGenius** può essere applicata anche allo strumento **ELITE BeGenius**.

Le prove, partendo da 200 µL di campione, sono state eseguite su:

- 59 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).
- 58 campioni di plasma raccolto in EDTA, negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).

Ogni campione è stato testato eseguendo l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e con i prodotti **ELITechGroup S.p.A.**

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Volume di campione	Campioni	N	positivi	negativi
200 µL	Sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA di CMV	59	4	55
	Plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di CMV	58	1	57

Tutti i campioni erano validi per l'analisi. La soglia del Controllo Interno è impostata a 35 per entrambe le matrici.

Cinquantacinque (55) campioni di sangue intero su 59 sono stati confermati negativi per CMV - DNA, quattro campioni sono risultati discrepanti positivi a basso titolo. Questo risultato può essere spiegato poiché il LoD del metodo di riferimento è superiore al LoD del prodotto in valutazione.

La specificità diagnostica del test in associazione al sangue intero in questo test è stata pari al 93,2%.

Cinquantasette (57) campioni di plasma su 58 sono stati confermati negativi per CMV - DNA, un campione è risultato positivo discrepante a basso titolo.

La specificità diagnostica del test in associazione al plasma in questo test è stata pari al 98,3%.

Altre matrici

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici negativi per il DNA di CMV in associazione con **ELITE InGenius** e le seguenti matrici: plasma (volume campione 1000 µL), liquido cerebrospinale, urina, tampone buccale, liquido amniotico, BAL / BA.

Le prove, partendo da 200 µL di campione, sono state eseguite su:

- 17 campioni di liquido cefalorachidiano, negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e 3 campioni di liquido cefalorachidiano, presunti negativi per il DNA di CMV.
- 8 campioni di urina, negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real-time) e 46 campioni di urina, presunti negativi per il DNA di CMV.
- 52 tamponi buccali, presunti negativi per il DNA di CMV.
- 10 campioni di liquido amniotico, negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e 22 campioni di liquido amniotico, presunti negativi per il DNA di CMV.
- 49 campioni di BAL / BA, negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time).

Le prove, partendo da 1000 µL di campione, sono state eseguite su 57 campioni di plasma raccolto in EDTA, presumibilmente negativi per il DNA di CMV.

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione, amplificazione, rivelazione e interpretazione dei risultati con **ELITE InGenius** e i prodotti **ELITechGroup S.p.A.**

I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Volume di campione	Campioni	N	positivi	negativi
200 µL	Liquido cefalorachidiano negativo o presunto negativo per il DNA di CMV	20	0	20
	Urina negativa o presunta negativa per il DNA di CMV	54	0	54
	Tamponi buccali presunti negativi per il DNA di CMV	52	2	50
	Liquido amniotico negativo o presunto negativo per il DNA di CMV	32	0	32
	BAL / BA negativo negativo per il DNA di CMV	49	0	49
1000 µL	Plasma raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di CMV	57	3	54

Tutti i campioni, analizzati partendo da 200 µL di campione, sono risultati validi per l'analisi. La soglia del Controllo Interno è impostata a 35 per tutte le matrici.

Cinquanta (50) su 52 campioni di tamponi buccali sono stati confermati negativi per il DNA di CMV, mentre due campioni sono risultati discrepanti positivi a basso titolo.

La specificità diagnostica del saggio in associazione alla matrice tampone buccale in questa prova è risultata uguale al 96%.

Tutti i campioni di liquido amniotico, urina, liquido cefalorachidiano e BAL / BA sono stati confermati negativi.

La specificità diagnostica del saggio in associazione alla matrice liquido amniotico, urina e liquido cefalorachidiano è risultata uguale al 100%.

Tutti i campioni, analizzati partendo da 1000 µL di campione, sono risultati validi per l'analisi.

Cinquantaquattro (54) campioni su 57 campioni sono stati confermati negativi per il DNA di CMV, tre (3) campioni sono risultati discrepanti positivi a basso titolo.

La specificità diagnostica del saggio in questo test è uguale a 94,7%.

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time PCR System

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. I campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da sangue intero (campione cellulare) con il kit «**EXTRAblood**» seguire le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso: partire da **200 µL** di campione, eluire gli acidi nucleici in **100 µL** di tampone di eluizione.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITE STAR**, con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione "**UUNI_E100_S200_ELI**" che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITE STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con **ELITE GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione ed eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITE GALAXY**». Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL / campione** di **CPE**. Al **CPE** deve essere aggiunto **IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con lo strumento «**NucliSENS® easyMAG®**» utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **100 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti, caricare la Strip sullo strumento e avviare l'estrazione senza incubazione per la lisi, dopo che lo strumento ha aggiunto l'**EasyMAG® Lysis Buffer** mescolare direttamente sullo strumento per tre volte il contenuto della Strip con la pipetta multicanale fornita usando il programma 3, lasciare in incubazione per 10 minuti quindi aggiungere il **NucliSENS® EasyMAG® Magnetic Silica** al contenuto della Strip con la pipetta multicanale e il programma 3, proseguire con l'estrazione, recuperare il DNA con **50 µL** di tampone di eluizione.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con lo strumento «**QIASymphony® SP/AS**» e il kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**», con **versione di software 3.5**, utilizzare il protocollo di estrazione **Virus Blood_200_V4_default IC** e seguire queste indicazioni: lo strumento è in grado di utilizzare direttamente il tubo primario, il volume di campione prelevato per l'estrazione è **200 µL**, è sempre richiesto un volume morto minimo di 100 µL. Caricare sullo strumento nella posizione prevista per le provette "controllo interno" le provette contenenti buffer ATE, come indicato nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit; indicare la posizione in cui verranno dispensati gli eluati e specificare il volume di eluizione a **60 µL**. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma 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 tre giorni altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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.

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITE STAR**, con **versione di software 3.4.13** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione "**UUNI_E100_S200_ELI**" che utilizza 200 µL di campione e eluisce l'estratto in 100 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITE STAR**». Un volume minimo di 700 µL è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **200 µL** di **CPE** nei tubi di Proteinase-Carrier come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con **ELITE GALAXY**, con **versione di software 1.3.1** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione **xNA Extraction (Universal)** che utilizza 300 µL di campione ed eluisce l'estratto in 200 µL. I campioni nelle provette primarie possono essere caricati direttamente su «**ELITE GALAXY**». Un volume minimo di 400-650 µL, a seconda della classe del tubo utilizzata, è sempre necessario per ogni campione. Aggiungere **10 µL / campione** di **CPE**. Al **CPE** deve essere aggiunto **IC + Carrier solution** come indicato nel manuale del kit di estrazione. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con lo strumento «**QIASymphony® SP/AS**» e il kit «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**», con **versione di software 3.5**, utilizzare il protocollo di estrazione "**Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC**" e seguire queste indicazioni: lo strumento è in grado di utilizzare direttamente il tubo primario, il volume di campione prelevato per l'estrazione è **500 µL**, è sempre richiesto un volume morto minimo di 100 µL. Preparare la soluzione contenente il buffer AVE ed il carrier RNA secondo le istruzioni nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit di estrazione. Aggiungere alla soluzione **6 µL** di **CPE** per ciascun campione richiesto. Caricare sullo strumento nella posizione prevista per le provette "controllo interno" le provette contenenti la soluzione, come indicato nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit; indicare la posizione in cui verranno dispensati gli eluati e specificare il volume di eluizione a **85 µL**. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Liquido cefalorachidiano

I campioni di liquido cefalorachidiano destinati all'estrazione degli acidi nucleici devono essere raccolti secondo le indicazioni del laboratorio evitando la contaminazione con il sangue del paziente, 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 trenta 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.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di liquido cefalorachidiano con lo strumento «**NucliSENS® easyMAG®**» utilizzare il protocollo di estrazione **Generic 2.0.1** e seguire queste indicazioni: dispensare **500 µL** di campione nella Strip da 8 pozzetti, caricare la Strip sullo strumento e avviare l'estrazione, al termine dei 10 minuti di incubazione aggiungere **5 µL** di **CPE** per il controllo interno prima di aggiungere il **NucliSENS® EasyMAG® Magnetic Silica** al contenuto della Strip con la pipetta multicanale e il programma 3, proseguire con l'estrazione, recuperare il DNA con **100 µL** di tampone di eluizione.

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 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 CMV con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CMV";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per il controllo interno con il "reporter" = "VIC" (AP525 è equivalente al VIC) e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "CI";
- per ciascun pozzetto in uso della micropiastra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "Cy5" (AP593 è usato invece del Cy5, normalizzazione della fluorescenza misurata) e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o 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** (10⁵ copie, 10⁴ copie, 10³ copie, 10² copie) per ottenere la **Curva standard**.

La modalità di organizzazione di un'analisi qualitativa di 12 campioni è illustrata a titolo di esempio nella sezione precedente relativa alla procedura per lo strumento **7300 Real Time PCR System**.

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 il valore di volume per la simulazione software del trasferimento termico alla reazione ("Sample volume") 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
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 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

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

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare e scongelare le provette con i campioni da analizzare. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare le provette di **CMV Q - PCR Mix** necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **25 reazioni**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare la provetta di **CMV - Positive Control** o le provette di **CMV Q - PCR Standard**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare l'**Amplification microplate** che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.

1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL** di miscela di reazione **CMV Q - PCR Mix** nei pozzetti dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.

Nota bene: Se non si utilizza tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimasto al buio a -20 °C per un massimo di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione per un massimo di **5 VOLTE**.

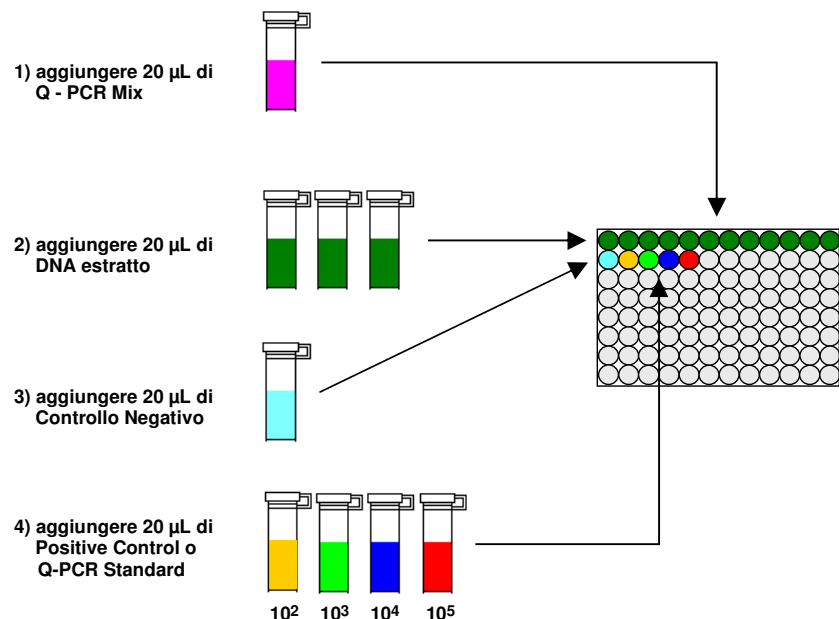
2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **DNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando per tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **DNA estratti**.
3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 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 bene 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 DNA di CMV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **CMV - 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 **CMV - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

- Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di CMV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL di CMV Q - PCR Standard 10²** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte il **CMV Q - PCR Standard 10²** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con i **CMV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.

- Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet**.
- 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 es. "anno-mese-giorno-CMV-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.



Nota bene: se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento «**QIASymphony® SP/AS**», inserire la micropietra contenente gli estratti, i reagenti e la micropietra di amplificazione negli alloggiamenti dedicati, usando gli appositi adattatori, quindi seguire quanto previsto dal manuale di istruzioni d'uso del preparatore automatico ed i passaggi richiesti dal software.

Nota bene: se l'allestimento dell'amplificazione è eseguito tramite lo strumento «**ELITE GALAXY**», caricare la micropietra di eluzione, la miscela completa di reazione e la micropietra di amplificazione come previsto dal manuale di istruzioni d'uso dello strumento e seguendo quanto richiesto dalla GUI.

Analisi qualitativa dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per CMV (detector FAM "CMV") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno (detector VIC "CI") 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 CMV, la fluorescenza FAM della sonda specifica per CMV 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 "CMV" a **0,1**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "CI" 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 "CMV" a **0,2**;
- impostare manualmente la **Soglia (Threshold)** per il detector VIC "CI" 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.

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

Reazione Positive Control detector FAM "CMV"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)** per CMV, 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) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

***Nota bene:** Quando questo prodotto è utilizzato per la quantificazione del DNA di CMV, al posto della reazione con il **Positive Control** è stata allestita la serie di reazioni con i **Q - PCR Standard**. In questo caso per convalidare l'amplificazione e la rilevazione si deve fare riferimento alla reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

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

Reazione Controllo negativo detector FAM "CMV"	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 CMV, è stata rilevata la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per CMV è utilizzato per rilevare la presenza di DNA 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 di circa 10 genomi Equivalenti per reazione (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	DNA di CMV
detector FAM "CMV"	detector VIC "CI"			
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 CMV e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o nulla) o nella fase di estrazione (degradazione del DNA del campione, campione con numero di cellule insufficienti, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nel DNA estratto) 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 CMV e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, il DNA di CMV non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di CMV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi 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 DNA di CMV, 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 di CMV. 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 è possibile svolgere l'analisi quantitativa dei risultati relativi ai campioni positivi.

I valori di Ct per CMV nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR standard** sono utilizzati per calcolare la **Curva standard** (Results > Standard Curve) della sessione di amplificazione e per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Curva Standard detector FAM "CMV"	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, si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

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

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a circa 10 genomi Equivalenti per reazione, (vedi Caratteristiche delle prestazioni).

Risultato del campione detector FAM "CMV"	genomi Equivalenti di CMV per reazione
Quantità > 1 x 10 ⁶	SUPERIORI A 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Quantità ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantità
Quantità < 1 x 10 ¹	INFERIORI A 10

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

$$Nc = \frac{Ve \times \text{Quantità}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Dove:

Vc è la quantità del campione usato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta;

Ep è l'efficienza della procedura, estrazione 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 amplificazione **espresso in µL**;

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

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il kit di estrazione «**EXTRAblood**» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero ed «EXTRAblood»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 25 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero e plasma raccolti in EDTA e il sistema di estrazione **ELITE STAR** e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e plasma e ELITE STAR
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 28 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero e plasma raccolti in EDTA e il sistema di estrazione **ELITE GALAXY** e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e plasma e ELITE GALAXY
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «**NucliSENS® easyMAG®**» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e «NucliSENS® easyMAG®»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 50 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di liquido cefalorachidiano e di urina e il sistema di estrazione «NucliSENS® easyMAG®» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per liquido cefalorachidiano e urina e «NucliSENS® easyMAG®»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 10 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «QIASymphony® SP/AS» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e «QIASymphony® SP/AS»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 24 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «QIASymphony® SP/AS» e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e «QIASymphony® SP/AS»
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12 \times \text{Quantità}$

Conversione dei risultati alle Unità Internazionali

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il kit di estrazione «EXTRAblood» e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero ed «EXTRAblood»
$Fc = 0,76 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 19,0 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **ELITE STAR** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e ELITE STAR
$Fc = 0,79 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 22,1 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **ELITE STAR** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e ELITE STAR
$Fc = 1,10 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 30,8 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **ELITE GALAXY** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e ELITE GALAXY
$Fc = 0,51 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 17,9 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **ELITE GALAXY** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e ELITE GALAXY
$Fc = 0,27 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 9,5 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «NucliSENS® easyMAG®» e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e «NucliSENS® easyMAG®»
$Fc = 0,61 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 30,5 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «QIASymphony® SP/AS» e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e «QIASymphony® SP/AS»
$Fc = 0,46 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 11,0 \times \text{Quantità}$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione «QIASymphony® SP/AS» e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e «QIASymphony® SP/AS»
$Fc = 0,87 \text{ UI / gEq}$
$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (UI / mL)} = 10,4 \times \text{Quantità}$

Dove **Fc** è il fattore di conversione stabilito utilizzando il materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification (NAT) Techniques", NIBSC, Regno Unito, codice 09/162 (vedi Caratteristiche delle prestazioni).

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione, permette di rilevare la presenza di circa 11 copie nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in DNA genomico umano ad un titolo di 500 ng / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 50 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 500 ng di DNA genomico umano	50	50	0

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di sangue intero ed «EXTRABlood». Il pannello è stato preparato utilizzando campioni di sangue intero negativo per il DNA di CMV positivamente con il materiale di riferimento calibrato e certificato OptiQuant CMV DNA (ceppo AD169, AcroMetrix Europe B.V., Paesi Bassi) con una concentrazione da 1 gEq / mL a 3.160 gEq / mL. Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 24 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione 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.

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero ed «EXTRABlood» (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	279 gEq / mL	198 gEq / mL	466 gEq / mL

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero ed «EXTRABlood» (gEq / reazione)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	11,2 gEq / reazione	7,9 gEq / reazione	18,6 gEq / reazione

Le trasformazioni da gEq / mL a gEq / reazione sono state calcolate come illustrato alle pagine 41 e 42.

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di sangue intero e ELITE STAR. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA di CMV. Le concentrazioni virali variavano da 3,16 UI / mL a 1000 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 12 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico ELITE STAR 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.

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero ed ELITE STAR (UI / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	263 UI / mL	128 UI / mL	1.208 UI / mL

La sensibilità analitica è riportata come gEq/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero ed ELITE STAR (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	332 gEq / mL	162 gEq / mL	1.529 gEq / mL

La sensibilità analitica come gEq/mL per campioni di sangue intero ed ELITE STAR è calcolata applicando il fattore specifico di conversione riportato a pagina 49.

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di plasma e ELITE STAR. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di CMV. Le concentrazioni virali variavano da 3,16 UI / mL a 1000 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in otto replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico ELITE STAR 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.

Limite di rilevazione con campioni di plasma ed ELITE STAR (UI / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	222 UI / mL	126 UI / mL	1.638 UI / mL

La sensibilità analitica è riportata come gEq/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di plasma ed ELITE STAR (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	201 gEq / mL	114 gEq / mL	1.489 gEq / mL

La sensibilità analitica come gEq/mL per campioni di plasma ed ELITE STAR è calcolata applicando il fattore specifico di conversione riportato a pagina 49.

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV entro la concentrazione limite usato in associazione a campioni di sangue intero ed ELITE GALAXY. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in sangue intero raccolto in EDTA e negativo per il DNA di CMV. Le concentrazioni virali variavano da 10 UI / mL a 560 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico ELITE GALAXY 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.

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero ed ELITE GALAXY (UI / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	127 UI / mL	75 UI / mL	435 UI / mL

La sensibilità analitica è riportata come gEq/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di sangue intero ed ELITE GALAXY (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	249 gEq / mL	147 gEq / mL	853 gEq / mL

La sensibilità analitica come gEq/mL per campioni di sangue intero ed ELITE GALAXY è calcolata applicando il fattore specifico di conversione riportato a pagina 49.

La sensibilità analitica del saggio è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV entro la concentrazione limite usata in associazione a campioni di plasma ed **ELITE GALAXY**. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in plasma raccolto in EDTA e negativo per il DNA di CMV. Le concentrazioni virali variavano da 10 UI / mL a 560 UI / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in dodici replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** 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.

Limite di rilevazione con campioni di plasma ed ELITE GALAXY (UI / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	140 UI / mL	86 UI / mL	381 UI / mL

La sensibilità analitica è riportata come gEq/mL nella tabella seguente:

Limite di rilevazione con campioni di plasma ed ELITE GALAXY (gEq / mL)			
		Intervallo di confidenza del 95%	
		valore inferiore	valore superiore
95% positività	519 gEq / mL	319 gEq / mL	1.411 gEq / mL

La sensibilità analitica come gEq/mL per campioni di plasma ed **ELITE GALAXY** è calcolata applicando il fattore specifico di conversione riportato a pagina 49.

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio, come intervallo di misurazione lineare, permette di quantificare da circa 1.000.000 a circa 10 genomi Equivalenti nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio è stata valutata utilizzando un pannello di diluizioni (1 Log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 2,5 x 10⁷ genomi Equivalenti per reazione a 2,5 x 10¹ genomi Equivalenti per reazione sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'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 (coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare in associazione a campioni di sangue intero ed «**EXTRABlood**» è stato fissato a circa 13 gEq / reazione, in quanto nelle prove per lo studio del limite di rilevazione la diluizione a 316 gEq / mL è l'ultima che presenta il 100% di positività. Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare cade entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa (10² gEq / 20 µL).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare in associazione a campioni di sangue intero ed «**EXTRABlood**» è stato fissato a 10⁶ gEq / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta (10⁵ gEq / 20 µL). I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di sangue intero ed «EXTRABlood»		
	Limite inferiore	Limite superiore
IU / mL	240	19.000.000
gEq / mL	316	25.000.000
gEq / reazione	12,6	1.000.000

Le trasformazioni da gEq / mL a gEq / reazione e viceversa sono state calcolate come illustrato alle pagine 41 e 42. Le trasformazioni da gEq / mL a UI / mL e viceversa sono state calcolate come illustrato alle pagine 41 e 42.

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare in associazione a campioni di sangue intero ed **ELITE GALAXY** è stato fissato a circa 10 gEq / reazione, in quanto nelle prove per lo studio del limite di rilevazione la diluizione a 350 gEq / mL è l'ultima che presenta il 100% di positività. Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare cade entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa (10² gEq / 20 µL).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare in associazione a campioni di sangue intero ed **ELITE GALAXY** è stato fissato a 10⁶ gEq / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta (10⁵ gEq / 20 µL). I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con campioni di sangue intero ed ELITE GALAXY		
	Limite inferiore	Limite superiore
IU / mL	178	17.800.000
gEq / mL	350	35.000.000
gEq / reazione	10	1.000.000

Le trasformazioni da gEq / mL a gEq / reazione e viceversa sono state calcolate come illustrato alle pagine 41 e 42. Le trasformazioni da gEq / mL a UI / mL e viceversa sono state calcolate come illustrato alle pagine 41 e 42.

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio dei valori di Ct inferiore al 2% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 21% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'Inaccuratezza percentuale media delle quantità misurate di circa il 20% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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

Sensibilità analitica: riproducibilità con pannello di materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio, come riproducibilità dei risultati a confronto con i risultati ottenuti con altre metodiche e in diversi laboratori, è stata verificata con un pannello di materiale di riferimento certificato.

Le prove sono state eseguite utilizzando come materiale di riferimento calibrato e certificato un pannello di diluizioni di CMV entro la concentrazione limite (ceppo AD169, QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione manuale con «**EXTRABlood**» e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato ed «EXTRAblood»				
Campione	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ gEq / mL
CMV09-01	4,368	0,465	2 / 2	4,064
CMV09-02	2,995	0,400	2 / 2	2,984
CMV09-03	2,297	0,583	2 / 2	2,038
CMV09-04	5,407	0,442	2 / 2	5,026
CMV09-05	2,996	0,444	2 / 2	2,902
CMV09-06	3,493	0,421	2 / 2	3,231
CMV09-07	4,379	0,412	2 / 2	4,129
CMV09-08	negativo	NA	0 / 2	Non rilevato
CMV09-09	6,374	0,457	2 / 2	5,943
CMV09-10	2,352	0,542	2 / 2	1,996
CMV09-11	2,407	0,513	2 / 2	2,105
CMV09-12	3,645	0,449	2 / 2	3,539

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. I risultati quantitativi ottenuti rientrano nell'intervallo definito dal Consensus dei saggi commerciali ± 1 Deviazione Standard come richiesto.

Ulteriori test sono stati effettuati utilizzando materiale di riferimento calibrato un panel di diluizioni di CMV entro il limite di concentrazione (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Scotland, Regno Unito). Ogni campione è stato testato in duplicato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI / mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione per **ELITE STAR** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE STAR				
Campione	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ UI / mL
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,580
CMV12-02	3,925	0,335	2/2	4,111
CMV12-03	2,297	0,507	1/2	2,423
CMV12-04	2,021	0,617	1/2	2,320
CMV12-05	3,158	0,613	2/2	3,529
CMV12-06	3,448	0,361	2/2	3,594
CMV12-07	3,490	0,377	2/2	3,321
CMV12-08	Negativo	NA	0/2	Non rilevato
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	4,580
CMV12-10	2,826	0,456	1/2	4,111

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente. I risultati quantitativi ottenuti rientrano nell'intervallo definito dal Consensus dei saggi commerciali ± 1 Deviazione Standard come richiesto.

Ulteriori test sono stati eseguiti utilizzando come materiale di riferimento calibrato e certificato un pannello di diluizioni di CMV entro la concentrazione limite (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito). Ciascun campione del pannello è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI / mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione per **ELITE GALAXY** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e ELITE GALAXY				
Campione	Consensus Log ₁₀ conc. virale	Deviazione Standard	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log ₁₀ UI / mL
CMV12-01	4.409	0,349	2/2	4,010
CMV12-02	3.925	0,335	2/2	3,484
CMV12-03	2.297	0,507	1/1	1,811
CMV12-04	2.021	0,617	2/2	1,647
CMV12-05	3.158	0,613	2/2	2,511
CMV12-06	3.448	0,361	2/2	3,106
CMV12-07	3.490	0,377	2/2	3,319
CMV12-08	Negativo	NA	0/2	Non rilevato
CMV12-09	3.767	0,374	2/2	3,486
CMV12-10	2.826	0,456	2/2	2,593

Un replicato di CMV12-03 è stato escluso dall'analisi a causa di un guasto del sistema durante la fase iniziale di estrazione. Nell'analisi qualitativa, tutti i campioni sono stati correttamente rilevati. Nell'analisi quantitativa, 8/9 campioni positivi sono stati correttamente quantificati entro l'intervallo di 0,5 log rispetto al titolo previsto. I campioni CMV12-01 e CMV12-07 sono associati. La differenza tra CMV12-01 (4,035 Log₁₀) e CMV12-07 (3,296 Log₁₀) è risultata pari a 0,739 e ricade nell'intervallo previsto. Il risultato CMV12-07 è ritenuto valido.

Sensibilità analitica: Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione da utilizzare con questo saggio per trasformare il risultato quantitativo da gEq / mL ad Unità Internazionali / mL con **campioni di sangue intero** raccolto in EDTA è stato definito come:

0,76 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il kit di estrazione manuale «**EXTRAblood**»;

0,79 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il sistema di estrazione **ELITE STAR**;

0,51 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il sistema di estrazione **ELITE GALAXY**;

0,61 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il sistema di estrazione «NucliSENS® easyMAG®»;

0,46 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il sistema di estrazione «QIASymphony® SP/AS».

Il fattore di conversione da utilizzare con questo saggio per trasformare il risultato quantitativo da gEq / mL a Unità Internazionali / mL con **campioni di plasma** raccolto in EDTA è stato definito come:

1,10 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il sistema di estrazione **ELITE STAR**;

0,27 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il sistema di estrazione **ELITE GALAXY**;

0,87 Unità Internazionali / gEq quando si utilizza il sistema di estrazione «QIASymphony® SP/AS».

I dati relativi a ciascun fattore di conversione sono riportati di seguito.

Sangue intero raccolto in EDTA

Il fattore di conversione è stato determinato utilizzando un pannello di quattro diluizioni (0,5 Log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Regno Unito, codice 09/162), in sangue intero raccolto in EDTA.

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 8 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione con «**EXTRAblood**» e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,76 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sangue intero ed «EXTRAblood» (Fc = 0,76 UI / gEq)					
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	362.383	275.411	5,440	
100.000	5,000	155.738	118.361	5,073	
31.625	4,500	39.503	30.022	4,477	
10.000	4,000	13.623	10.353	4,015	

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,79 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato in campioni di sangue intero.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sangue intero ed ELITE STAR (Fc = 0,79 UI / gEq)					
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	566.090	464.398	5,620	
100.000	5,000	135.119	106.744	4,997	
31.625	4,500	42.655	33.698	4,488	
10.000	4,000	14.486	11.444	4,014	
3.162	3,500	3.717	2.936	3,401	

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,51 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato in campioni di sangue intero.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sangue intero ed ELITE GALAXY (Fc = 0,51 UI / gEq)					
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL	
316.228	5,500	473.265	240.507	5,370	
100.000	5,000	217.626	110.595	5,036	
31.623	4,500	55.656	28.284	4,438	
10.000	4,000	24.229	12.313	4,076	
3.162	3,500	7.809	3.968	3,575	

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 8 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «NucliSENS® easyMAG®», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,61 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sangue intero e «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 0,61 UI / gEq)					
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	564.835	344.549	5,537	
100.000	5,000	178.704	109.009	5,037	
31.625	4,500	51.454	31.387	4,497	
10.000	4,000	14.141	8.626	3,936	

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 8 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «QIASymphony® SP/AS», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,46 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sangue intero e «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,46 UI / gEq)					
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	599.940	275.972	5,435	
100.000	5,000	222.073	102.153	5,004	
31.625	4,500	70.712	32.527	4,497	
10.000	4,000	24.326	11.190	4,038	

Plasma raccolto in EDTA

Il fattore di conversione è stato determinato utilizzando un pannello di quattro diluizioni (0,5 Log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Regno Unito, codice 09/162), in plasma raccolto in EDTA.

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 1,10 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato in campioni di plasma. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con plasma ed ELITE STAR (Fc = 1,10 UI / gEq)					
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	282.851	311.136	5,481	
100.000	5,000	107.043	117.747	5,048	
31.625	4,500	30.868	33.955	4,512	
10.000	4,000	8.632	9.495	3,972	
3.162	3,500	2.814	3.096	3,468	

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 15 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,27 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato in campioni di plasma. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con plasma ed ELITE GALAXY (Fc = 0,27 UI / gEq)					
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL	
316.228	5,500	1.095.881	301.020	5,413	
100.000	5,000	460.141	126.393	5,033	
31.623	4,500	117.258	32.209	4,448	
10.000	4,000	43.980	12.081	4,053	
3.162	3,500	13.713	3.767	3,546	

I quattro punti del pannello sono stati impiegati in 8 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «QIASymphony® SP/AS» e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a 0,87 Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato in campioni di plasma. I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con plasma e «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,87 UI / gEq)				
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	330.340	287.396	5,458
100.000	5,000	101.683	88.464	4,947
31.625	4,500	40.963	35.638	4,551
10.000	4,000	13.148	11.438	4,058

Sensibilità diagnostica: efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi

La sensibilità diagnostica del saggio, come efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi, 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 dell'esone 4 del gene MIEA di CMV, tra cui quelle dei ceppi AD169 e Merlin, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative.

La sensibilità diagnostica del saggio, come efficienza di rilevazione e quantificazione su diversi genotipi / sottotipi, è stata valutata utilizzando un costrutto plasmidico contenente la regione amplificata del CMV del ceppo Merlin.

L'efficienza di rilevazione e quantificazione è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento un costrutto plasmidico contenente la regione amplificata del CMV del ceppo Merlin (GENEART A.G., Germania). Il DNA plasmidico è stato diluito alle concentrazioni di 100.000, 10.000, 1.000, 100 e 10 copie per reazione. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Efficienza di rilevazione e quantificazione con CMV ceppo Merlin			
Campione	Concentrazione teorica copie / reazione	Positivi / Replicati	Media dei risultati copie / reazione
plasmide pMerlin 10 ⁵	100.000	3 / 3	93.699
plasmide pMerlin 10 ⁴	10.000	3 / 3	8.815
plasmide pMerlin 10 ³	1.000	3 / 3	898
plasmide pMerlin 10 ²	100	3 / 3	100
plasmide pMerlin 10 ¹	10	9 / 9	11

Il plasmide pMerlin è stato rilevato e quantificato correttamente anche alla concentrazione di 10 copie per reazione.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma di campioni clinici positivi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici di sangue intero positivi per il DNA di CMV.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 54 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione manuale con «EXTRAblood» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per il DNA di CMV	54	53	0

Un campione è risultato "non valido" in due diverse sessioni di analisi. Il risultato "non valido" è stato probabilmente causato da un inibitore non identificato presente nel campione. Questo campione è stato escluso dal calcolo della sensibilità diagnostica. La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di sangue intero raccolto in EDTA positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	60	57	0

Tre campioni hanno riportato un risultato "non valido" in due sessioni di analisi indipendenti. La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 100%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 68 campioni di plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	68	66	2

Due campioni hanno riportato un risultato negativo con i prodotti ELITechGroup S.p.A. Questa discordanza può essere spiegata essendo il titolo CMV del campione (280 gEq/mL) vicino al limite di rivelazione del metodo usato.

La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 97,1%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di sangue intero raccolto in EDTA positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	60	59	1

Un campione ha riportato un risultato negativo con i prodotti ELITechGroup S.p.A. Questa discordanza potrebbe essere spiegata con una degradazione del campione.

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

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 51 campioni di plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	51	47	4

Quattro campioni hanno riportato un risultato negativo con i prodotti ELITechGroup S.p.A. Questa discordanza può essere spiegata essendo i titoli CMV dei campioni discrepanti (rispettivamente <350 gEq/mL, <350 gEq/mL, 961 gEq/mL e 534 gEq/mL) vicini al limite di rivelazione del metodo usato.

La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 92,16%.

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 50 campioni di sangue intero raccolto in EDTA di donatori normali presumibilmente negativi, positivamente per il DNA di CMV con un campione di materiale di riferimento certificato e calibrato (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 1500 copie / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «NuclISENS® easyMAG®», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	50	50	0

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

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

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di sangue intero raccolto in EDTA di donatori normali presumibilmente negativi, positivamente per il DNA di CMV con un campione di materiale di riferimento certificato e calibrato (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 700 copie / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «QIASymphony® SP/AS», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivamente per il DNA di CMV	60	60	0

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

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi, positivamente per il DNA di CMV con un campione di materiale di riferimento certificato e calibrato (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito) a un titolo di 360 copie / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico «QIASymphony® SP/AS» e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA positivamente per il DNA di CMV	60	60	0

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

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di liquido cefalorachidiano negativi, positivamente per il DNA di CMV con un campione di materiale di riferimento certificato e calibrato (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Regno Unito) ad un titolo di 300 copie / mL. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «NucliSENS® easyMAG®», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano positivamente per il DNA di CMV	60	60	0

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

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 52 campioni clinici di urina positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «NucliSENS® easyMAG®», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Urina positiva per il DNA di CMV	52	52	0

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

Specificità analitica: assenza di crossreattività con marcatori potenzialmente interferenti

La specificità analitica del saggio, come 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 CMV, tra cui quelle del genoma completo di HHV6, il virus erpetico umano più simile a CMV, ha dimostrato la loro specificità e l'assenza di omologie significative.

La specificità analitica del saggio, come assenza di crossreattività con altri marcatori potenzialmente interferenti, è stata verificata utilizzando alcuni campioni clinici negativi per il DNA di CMV ma positivi per il DNA di HHV6, EBV e VZV che sono stati confermati negativi.

La specificità analitica è stata verificata utilizzando come materiale di riferimento 16 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, negativi per il DNA di CMV ma positivi per il DNA di HHV6, EBV e VZV (testati con prodotti CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per il DNA di HHV6	8	0	8
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per il DNA di EBV	7	0	7
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per il DNA di VZV	1	0	1

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma di campioni negativi, è stata valutata utilizzando alcuni campioni clinici di sangue intero negativi per il DNA di CMV.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 56 campioni di sangue intero raccolto in EDTA, negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione manuale con «EXTRAblood», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	56	0	56

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

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 70 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	70	0	63

Sette campioni hanno riportato un risultato "non valido" in due sessioni di analisi indipendenti.

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

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 61 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE STAR** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	61	0	61

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

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 66 campioni di sangue intero raccolto in EDTA negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	66	0	65

Un campione è risultato "non valido" a causa di un inibitore non identificato nel campione. Questo esempio non è stato incluso nel calcolo della sensibilità diagnostica.

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

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 64 campioni di plasma raccolto in EDTA negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione e impostazione PCR con il sistema di estrazione automatico **ELITE GALAXY** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	64	0	64

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

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 50 campioni di sangue intero raccolto in EDTA di donatori normali presumibilmente negativi per il DNA di CMV. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «NucliSENS® easyMAG®», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	50	0	50

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

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di sangue intero raccolto in EDTA di donatori normali presumibilmente negativi per il DNA di CMV. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «QIASymphony® SP/AS», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	60	1	59

Un campione di sangue negativo per il DNA di CMV ha dato un risultato positivo con un titolo di CMV molto basso (circa 2 gEq / reazione) con i prodotti ELITechGroup S.p.A. Questa discordanza può essere spiegata con un'infezione latente di CMV, un virus ampiamente diffuso nella popolazione. La specificità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 98,3%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di plasma raccolto in EDTA di donatori normali presumibilmente negativi per il DNA di CMV. Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «QIASymphony® SP/AS» e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Plasma raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	60	1	59

Un campione di plasma negativo per il DNA di CMV ha dato un risultato positivo con un titolo di CMV molto basso (circa 2 gEq / reazione) con i prodotti ELITechGroup S.p.A. Questa discordanza può essere spiegata con un'infezione latente di CMV, un virus ampiamente diffuso nella popolazione. La specificità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 98,3%.

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 60 campioni di liquido cefalorachidiano negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «NucliSENS® easyMAG®» e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Liquido cefalorachidiano negativo per il DNA di CMV	60	0	60

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

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 56 campioni di urina negativi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time). Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione, con il sistema di estrazione automatico «NucliSENS® easyMAG®», e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

CMV ELITE MGB® Kit
reagente per l'amplificazione Real Time del DNA

REF RTK015PLD

Campioni	N	positivi	negativi
Urina negativa per il DNA di CMV	56	1	55

Un campione di urina negativo per il DNA di CMV ha dato un risultato positivo per CMV con i prodotti ELITechGroup S.p.A. La discordanza può essere spiegata con il titolo di CMV molto basso (circa 4 gEq / reazione), probabilmente inferiore al limite di rilevazione della metodica di riferimento. La specificità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 98,2%.

Robustezza: assenza di contaminazione incrociata

La robustezza del saggio, come assenza di contaminazione incrociata, è stata verificata analizzando i risultati di cinque sessioni in cui campioni negativi per il DNA di CMV sono stati alternati a campioni positivizzati per il DNA di CMV. Nessun campione negativo per il DNA di CMV è risultato positivo.

L'assenza di contaminazione incrociata è stata verificata utilizzando un campione di sangue intero negativo per il DNA di CMV positivizzato con il materiale di riferimento calibrato e certificato OptiQuant CMV DNA (ceppo AD169, AcroMetrix Europe B.V., Paesi Bassi) ad un titolo di 8.300 gEq / mL e un campione di sangue intero negativo per il DNA di CMV. Cinque serie di 12 campioni, alternando un campione positivizzato con un campione negativo, sono state impiegate per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	30	30	0
Sangue intero raccolto in EDTA negativo per il DNA di CMV	30	0	30

Robustezza: tasso globale di errore del sistema

La robustezza del saggio, come tasso globale di errore del sistema che porta a risultati falsi negativi, è stata verificata eseguendo l'analisi di un pannello di campioni positivizzati per il DNA di CMV a basso titolo ed è risultato inferiore all'1,7%.

Il tasso globale di errore è stato verificato utilizzando un pannello di campioni di sangue intero negativo per il DNA di CMV positivizzato con il materiale di riferimento calibrato certificato OptiQuant CMV DNA (ceppo AD169, AcroMetrix Europe B.V., Paesi Bassi) ad un titolo di 900 gEq / mL. Ciascun campione del pannello è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi, estrazione e amplificazione, con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivizzato per il DNA di CMV	60	60	0

Roche cobas z 480 analyzer

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **DNA estratto** dai seguenti campioni clinici:

Sangue intero raccolto in EDTA

I campioni di sangue intero destinati all'estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA ed identificati secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati a +2 / +8 °C e conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. I campioni possono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di sangue intero con lo strumento «**MagNA Pure 24 System**», con **versione di software 1.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione "**Pathogen200**" e seguire queste indicazioni: dispensare **350 µL** di campione nel MagNA Pure Tube 2.0 mL, caricare il tubo sullo strumento e avviare l'estrazione. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE 20 µL** / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL. Il **CPE** deve essere diluito 1:2 in acqua ultrapura per biologia molecolare. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Plasma raccolto in EDTA

I campioni di plasma 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 tre giorni altrimenti devono essere congelati e conservati a -20 °C per un massimo di trenta 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.

Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione per evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di plasma con lo strumento «**MagNA Pure 24 System**», con **versione di software 1.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione "**Pathogen200**" e seguire queste indicazioni: dispensare **350 µL** di campione nel MagNA Pure Tube 2.0 mL, caricare il tubo sullo strumento e avviare l'estrazione. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE 20 µL** / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL. Il **CPE** deve essere diluito 1:2 in acqua ultrapura per biologia molecolare. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Urine

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 conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni. Se possibile, evitare di congelare i campioni di urina primo getto. Il congelamento può causare la precipitazione di inibitori e la perdita di titolo del DNA.

In caso di congelamento, si consiglia di suddividere in più aliquote i campioni in modo da non sottoporli a cicli di congelamento / scongelamento ripetuti e di conservarli a -20 °C per un massimo di trenta giorni oppure a -70 °C per tempi più lunghi.

Nota bene: quando si esegue l'estrazione del DNA da campioni di urine con lo strumento «**MagNA Pure 24 System**», con **versione di software 1.0** (o versioni successive equivalenti) utilizzare il protocollo di estrazione "**Pathogen200**" e seguire queste indicazioni: dispensare **350 µL** di campione nel MagNA Pure Tube 2.0 mL, caricare il tubo sullo strumento e avviare l'estrazione. Questo protocollo processa 200 µL di campione, aggiunge **CPE 20 µL** / estrazione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL. Il **CPE** deve essere diluito 1:2 in acqua ultrapura per biologia molecolare. Per dettagli sulla procedura di estrazione seguire attentamente le indicazioni riportate nel Manuale di istruzioni per l'uso del kit.

Altri campioni:

Non sono disponibili dati relativi alle prestazioni del prodotto con DNA estratto dai seguenti campioni clinici: liquido cefaloarachidiano (CSF), tampone buccale, liquido amniotico, lavaggio broncoalveolare (BAL) e bronco aspirato (BA), sospensioni di leucociti, sospensioni di granulociti.

Sostanze interferenti

Il DNA estratto dal campione di partenza non deve contenere eparina, emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo per evitare fenomeni di inibizione e la comparsa di frequenti risultati non validi.

Quantità di DNA genomico umano elevate nel DNA estratto dal campione possono inibire la reazione di amplificazione.

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.

Come controllo negativo utilizzare acqua ultrapura per biologia molecolare (non fornita nel kit) da aggiungere alla reazione al posto del DNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto «**CMV - ELITE Positive Control**» o in alternativa «**CMV - ELITE Positive Control RF**» oppure il prodotto «**CMV ELITE Standard**».

Controlli di qualità

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

PROCEDURA

Impostazione della sessione di amplificazione real time

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

Se si utilizza uno strumento **cobas z 480 analyzer (Roche)**:

- Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:
 - accendere il computer di controllo, accendere il thermal cycler per real time, avviare il software dedicato e, dalla finestra principale, aprire una sessione "New Experiment";
 - impostare il volume di reazione ("Reaction Volume") a 40 µL;
 - assegnare un identificativo a ogni campione ("Sample Editor");
 - definire il Ciclo termico della reazione secondo la tabella seguente:

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Decontaminazione	50 °C	2 min.
Denaturazione iniziale	94 °C	2 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.

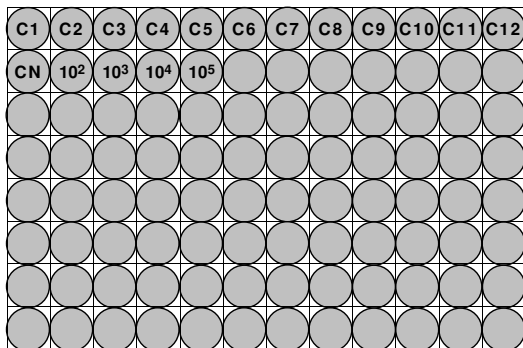
Nota bene: l'acquisizione della fluorescenza avviene in modo singolo, impostare le Ramp Rate (°C/s) a 4,4°C/s.

- selezionare i canali di detezione del segnale: il "detector" per la sonda per CMV con il "canale FAM 465-510" e il "detector" per la sonda per il controllo interno CI con il "canale VIC 540-580";

Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni oppure stampare l'organizzazione della micropiastra. 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** (10^5 gEq, 10^4 gEq, 10^3 gEq, 10^2 gEq) per ottenere la **Curva standard**.

Si illustra di seguito, a titolo di esempio, come può essere organizzata l'analisi quantitativa di 12 campioni.



Legenda: C1 - C12: Campioni da analizzare; CN: Controllo negativo di amplificazione; 10^2 : Standard 10^2 gEq; 10^3 : Standard 10^3 gEq; 10^4 : Standard 10^4 gEq; 10^5 : Standard 10^5 gEq.

Allestimento dell'amplificazione

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

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare e scongelare le provette con i campioni da analizzare. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare le provette di **CMV Q - PCR Mix** necessarie per la sessione ricordando che il contenuto di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **25 reazioni**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare la provetta di **CMV - Positive Control** o in alternativa **CMV - ELITE Positive Control RF** o le provette di **CMV Q - PCR Standard**. Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare l'**AD-plate** che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.

1. Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL** di miscela di reazione **CMV Q - PCR Mix** nei pozzetti dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.

Nota bene: Se non si utilizza tutta la miscela di reazione, conservare il volume rimasto al buio a -20 °C per un massimo di un mese. Congelare e scongelare la miscela di reazione per un massimo di **5 VOLTE**.

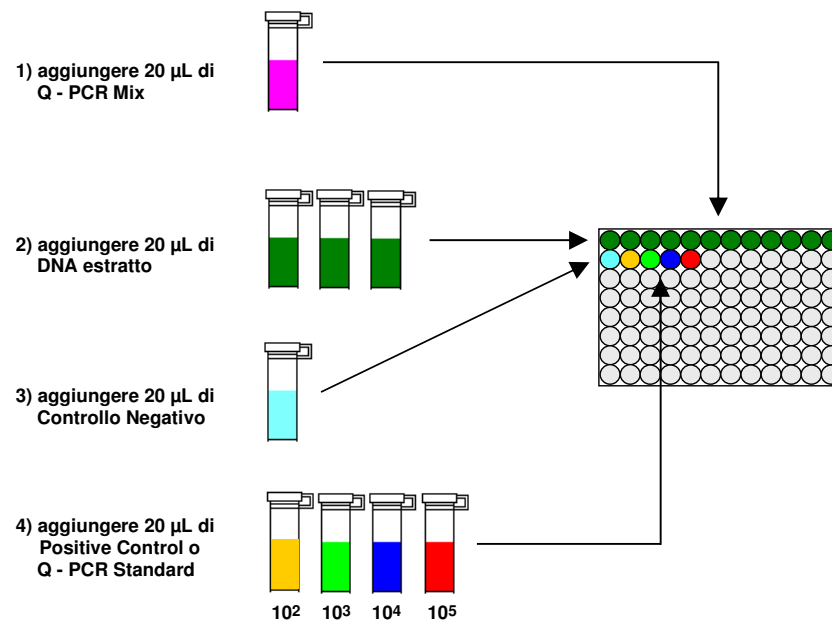
2. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **DNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il campione pipettando per tre volte il **DNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **DNA estratti**.

3. Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **Acqua ultrapura per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**AD-plate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo negativo pipettando per tre volte l'**Acqua ultrapura per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.

- 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 DNA di CMV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **CMV - Positive Control** o in alternativa **CMV - ELITE Positive Control RF** nel corrispondente pozzetto dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **CMV - Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle.
 - Quando è richiesto un risultato **quantitativo** dell'analisi (quantificazione del DNA di CMV): trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **20 µL** di **CMV Q - PCR Standard 10^2** nel corrispondente pozzetto dell'**AD-plate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene lo standard pipettando per tre volte il **CMV Q - PCR Standard 10^2** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle. Procedere allo stesso modo con i **CMV Q - PCR Standard 10^3 , 10^4 , 10^5** .
- Sigillare accuratamente l'**AD-plate** con il **Sealing Film**.
- Trasferire l'**AD-plate** 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 es. "anno-mese-giorno-CMV-EGSpA").

Nota bene: Al termine del ciclo termico l'**AD-plate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata in modo da non generare contaminazioni ambientali. **Non sollevare mai il Sealing Film 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.



Analisi qualitativa dei risultati

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

Selezionare il menù "Analysis" e scegliere il tipo "Absolute Quant/Fit Points" (n°2 punti)

Selezionare il gruppo di campioni su cui applicare l'analisi

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

- impostare manualmente (bottone Background) l'intervallo di calcolo del **Livello di fluorescenza di fondo (Background)** dal ciclo 2 al ciclo 6;

Selezionare il detector (bottone Filter Comb) su cui applicare l'analisi

Per campioni di **Plasma e Urine**:

- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector FAM "CMV" a **0,55**;
- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector VIC "CI" a **1,2**

Per campioni di **Sangue intero**:

- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector FAM "CMV" a **0,80**;
- impostare manualmente **Soglia (Threshold)** e **Noiseband** per il detector VIC "CI" a **1,5**

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

Nella reazione di amplificazione con il **Positive Control***, il valore di **Ct** per CMV (result > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Positive Control detector "CMV"	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRETTA

Curva Standard detector "CMV"	Range di Accettabilità	Amplificazione / Rilevazione
Coefficiente di Correlazione (R2)	0.99 ≤ R2 ≤ 1.0	CORRETTA

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)**, il DNA bersaglio non è stato rilevato correttamente. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, degradazione della miscela di reazione o del controllo positivo, impostazione errata della posizione del controllo positivo, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

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

Reazione Controllo negativo detector "CMV"	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 CMV, è stata rilevata la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per CMV è utilizzato per rilevare la presenza di DNA 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 (finestra Analysis) 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).

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

Reazione del campione		Idoneità del campione	Risultato del saggio	DNA di CMV
detector "CMV"	detector "CI"			
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 CMV e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il DNA del Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (amplificazione non efficiente o nulla) o nella fase di estrazione (degradazione del DNA del campione, campione con numero di cellule insufficienti, perdita del DNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nel DNA estratto) 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 CMV e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, il DNA di CMV non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di CMV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi 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 DNA di CMV, 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 di CMV. 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 è possibile svolgere l'analisi quantitativa dei risultati relativi ai campioni positivi.

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Q - PCR Standard 10⁵** è **Ct > 25** o **Ct Non determinato (Undetermined)** o i valori di **Ct** nelle reazioni di amplificazione dei quattro **Q - PCR standard** non sono posizionati regolarmente sulla retta standard, il DNA bersaglio non è stato rilevato correttamente. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o degli standard, degradazione della miscela di reazione o degli standard, impostazione errata della posizione degli standard, impostazione errata del ciclo termico) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

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

Questo prodotto è in grado di quantificare da 1.000.000 a circa 10 genomi Equivalenti per reazione, da 25.000.000 a 250 genomi Equivalenti per mL di sangue intero usando il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** (vedi Caratteristiche delle prestazioni), come descritto nella tabella seguente:

Risultato del campione detector FAM "CMV"	genomi Equivalenti di CMV per reazione
Quantità > 1 x 10 ⁶	SUPERIORI A 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Quantità ≤ 1 x 10 ⁶	= Quantità
Quantità < 1,0 x 10 ¹	INFERIORI A 10

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

$$Nc = \frac{Vc \times \text{Quantità}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Dove:

Vc è la quantità del campione usato nell'estrazione in rapporto all'unità di misura richiesta;

Ep è l'efficienza della procedura, estrazione 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 amplificazione **espresso in µL**;

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

Quando si utilizzano campioni di sangue intero e plasma raccolti in EDTA e urine e il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** e si vuole ottenere il risultato **espresso in gEq / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero, plasma e urine e MagNA Pure 24

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 25 \times \text{Quantità}$$

Conversione dei risultati alle Unità Internazionali

Quando si utilizzano campioni di sangue intero raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per sangue intero e MagNA Pure 24

$$Fc = 0,5 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 12,5 \times \text{Quantità}$$

Quando si utilizzano campioni di plasma raccolto in EDTA e il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per plasma e MagNA Pure 24

$$Fc = 0,4 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 10 \times \text{Quantità}$$

Quando si utilizzano campioni di urine e il sistema di estrazione **MagNA Pure 24** e si vuole ottenere il risultato **espresso in UI / mL**, la formula diventa:

Formula semplificata per urine e MagNA Pure 24

$$Fc = 1,1 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 27,5 \times \text{Quantità}$$

Dove **Fc** è il fattore di conversione stabilito utilizzando il materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification (NAT) Techniques", NIBSC, Regno Unito, codice 09/162 (vedi Caratteristiche delle prestazioni).

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Sensibilità analitica: limite di rilevazione

La sensibilità analitica di questo saggio, come limite di rilevazione, permette di rilevare la presenza di circa 10 copie nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio, come limite di rilevazione, è stata testata utilizzando un DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. Il DNA plasmidico è stato diluito ad un titolo di 10 copie / 20 µL in 150.000 copie di pBETAGLOBINA / 20 µL. Questo campione è stato impiegato in 27 replicati per eseguire l'amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati finali sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
10 copie DNA plasmidico + 150.000 copie di pBETAGLOBINA	27	26	1

La sensibilità analitica del saggio con le matrici sangue intero, plasma e urine è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV ed in associazione a **MagNA Pure 24**. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in matrice negativa per il DNA di CMV. Il pannello era composto da sei punti intorno alla concentrazione limite e ciascun punto del pannello è stato testato in 12 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** 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 finali per ogni matrice sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di rilevazione con MagNA Pure 24 (UI / mL)

Matrice	95% positività	intervallo di confidenza 95%	
		limite inferiore	limite superiore
sangue intero	135 UI / mL	84 UI / mL	354 UI / mL
plasma	88 UI / mL	54 UI / mL	279 UI / mL
urine	296 UI / mL	174 UI / mL	851 UI / mL

La sensibilità analitica espressa in gEq / mL è calcolata applicando il fattore di conversione specifico riportato a pagina 68.

La sensibilità analitica per ogni matrice come gEq/mL è riportata sotto.

Limite di rilevazione con MagNA Pure 24 (gEq / mL)

Matrice	95% positività	intervallo di confidenza 95%	
		limite inferiore	limite superiore
sangue intero	270 gEq / mL	168 gEq / mL	708 gEq / mL
plasma	220 gEq / mL	108 gEq / mL	698 gEq / mL
urine	269 gEq / mL	158 gEq / mL	774 gEq / mL

Sensibilità analitica: intervallo di misurazione lineare

La sensibilità analitica di questo saggio, come intervallo di misurazione lineare, permette di quantificare da circa 1.000.000 a circa 10 genomi Equivalenti nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La sensibilità analitica del saggio è stata valutata utilizzando un pannello di diluizioni (1 Log₁₀ tra una diluizione e la successiva) di DNA plasmidico contenente il prodotto di amplificazione, la cui concentrazione iniziale è stata misurata allo spettrofotometro. I punti del pannello da 10⁷ molecole per reazione a 10¹ molecole per reazione sono stati impiegati in 9 replicati per eseguire l'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 (coefficiente di correlazione lineare superiore a 0,99).

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a circa 10 gEq / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più bassa (10² gEq / 20 µL).

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato a 10⁶ gEq / reazione, entro un logaritmo dal valore dello standard di amplificazione Q - PCR Standard a concentrazione più alta (10⁵ gEq / 20 µL).

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare con MagNA Pure 24		
	Limite inferiore	Limite superiore
gEq / mL	250	25.000.000
gEq / reazione	10	1.000.000

Le trasformazioni da gEq / mL a gEq / reazione e viceversa sono state calcolate come illustrato a pagina 64.

La linearità del saggio con le diverse matrici è stata verificata utilizzando un pannello di diluizioni di CMV ed in associazione a **MagNA Pure 24**. Il pannello è stato preparato diluendo il "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC codice 09/162, Regno Unito) in matrice negativa per il DNA di CMV. Il pannello presentava 5 passaggi di diluizione di 1 Log da 10⁶ a 10² UI / mL. Ciascun punto del pannello è stato testato in 4 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** 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 al di sopra del Limite di Rilevazione.

Limite di quantificazione

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato alla più bassa concentrazione che presenti il 100% di positività e risultati quantitativi sufficientemente accurati e precisi.

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare è stato fissato alla più alta concentrazione testata che fornisce risultati quantitativi sufficientemente accurati e precisi.

I limiti dell'intervallo di misurazione lineare come gEq / mL sono stati calcolati applicando per ogni matrice il fattore di conversione specifico riportato a pagina 68.

I risultati finali per ogni matrice sono riportati nelle tabelle seguenti.

Limite di misurazione lineare con campioni di sangue intero e MagNA Pure 24		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	178	1.000.000
gEq / mL	356	2.000.000

Limite di misurazione lineare con campioni di plasma e MagNA Pure 24		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	100	1.000.000
gEq / mL	250	2.500.000

Limite di misurazione lineare con campioni di urine e MagNA Pure 24		
Unità di misura	Limite inferiore	Limite superiore
UI / mL	1000	1.000.000
gEq / mL	909	909.091

Sensibilità analitica: Precisione e Accuratezza

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) massimo dei valori di Ct inferiore al 1,36% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

La precisione del saggio, come variabilità dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione, ha permesso di ottenere un Coefficiente di Variazione percentuale (CV %) medio delle quantità misurate di circa il 12,5% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

L'accuratezza del saggio, come differenza tra la media dei risultati ottenuti in una stessa sessione di amplificazione con diversi replicati di un campione e il valore teorico della concentrazione del campione, ha permesso di ottenere un'Inaccuratezza percentuale media delle quantità logaritmiche misurate di circa il 2,2% nell'intervallo da 10⁶ molecole a 10¹ molecole nei 20 µL di DNA aggiunti alla reazione di amplificazione.

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 di materiale di riferimento certificato

La sensibilità analitica del saggio è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento calibrato il pannello di «AcroMetrix® CMV_{ic} Panel» (Acrometrix, Life Technologies; Stati Uniti). Ciascun campione è stato impiegato in 2 replicati per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

I risultati in UI / mL sono stati determinati applicando il fattore di conversione per **MagNA Pure 24** e plasma e sono riportati nella tabella seguente.

Prove con materiale di riferimento certificato e MagNA Pure 24				
Campione	Titolo nominale UI / mL	Titolo nominale Log UI / mL	Positivi / Replicati	Media dei risultati Log UI / mL
CMV DNA 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,299
CMV DNA 3E5	300.000	5,477	2/2	5,280
CMV DNA 3E4	30.000	4,477	2/2	4,298
CMV DNA 3E3	3.000	3,477	2/2	3,364
CMV DNA 3E2	300	2,477	2/2	2,262

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati come positivi ad un titolo che rientra nell'intervallo atteso ± 0,5 Log.

Fattore di conversione alle Unità Internazionali

Il fattore di conversione da utilizzare con questo saggio per trasformare il risultato quantitativo da gEq / mL in Unità Internazionali / mL è stato determinato utilizzando un pannello di materiale di riferimento calibrato approvato dall'OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Regno Unito, codice 09/162) nelle diverse matrici negative per il DNA di CMV ed in associazione a **MagNA Pure 24**. Il pannello presentava 6 passaggi di diluizione di 1 Log. Ciascun punto del pannello è stato testato in 16 replicati eseguendo l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a **0,5** Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato con campioni di **sangue intero**.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con sanue intero e «MagNA Pure» (Fc = 0,5 UI/ gEq)				
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL
111.055	5,046	197.188	98.594	4,991
34.903	4,543	73.891	36.945	4,556
10.970	4,040	23.428	11.714	4,050
3.448	3,538	8.863	4.431	3,605
1.084	3,035	2.963	1.481	3,136
341	2,532	995	497	2,638

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a **0,4** Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato con campioni di **plasma**.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con plasma e «MagNA Pure» (Fc = 0,4 UI/ gEq)				
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL
111.055	5,046	235.469	94.188	4,969
34.903	4,543	89.375	35.750	4,548
10.970	4,040	25.950	10.380	4,008
3.448	3,538	9.683	3.873	3,576
1.084	3,035	3.189	1.276	3,086
341	2,532	910	364	2,526

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di calcolare un fattore di conversione (Fc) medio pari a **1,1** Unità Internazionali (UI) per gEq di CMV rilevato con campioni di **urine**.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Conversione alle Unità Internazionali con urine e «MagNA Pure» (Fc = 1,1 UI/ gEq)				
Conc. attesa UI / mL	Conc. attesa Log ₁₀ UI / mL	Quantità media gEq / mL	Quantità media UI / mL	Quantità media Log ₁₀ UI / mL
316.228	5,500	217.719	242.110	5,379
100.000	5,000	91.719	100.891	4,995
31.623	4,500	33.484	36.833	4,557
10.000	4,000	10.550	11.605	4,053
3.162	3,500	3.434	3.777	3,565
1.000	3,000	1.050	1.155	3,054

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 51 campioni di sangue intero raccolto in EDTA positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time), 63 campioni di plasma raccolto in EDTA positivi per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time), 6 campioni di urine positive per il DNA di CMV (testati con un prodotto CE IVD di amplificazione real time) e su 45 campioni di urine negative per il DNA di CMV, che sono state positivizzate per il DNA di CMV aggiungendo "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, Regno Unito, codice 09/162).

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA positivo per il DNA di CMV	51	51	0
Plasma raccolto in EDTA positivo per il DNA di CMV	63	62	1
Urina positiva per il DNA di CMV	6	6	0
Urina positivizzata per il DNA di CMV	45	44	1

Tutti i campioni di sangue intero sono risultati validi e sono stati confermati positivi per il DNA di CMV.

La sensibilità diagnostica del saggio in associazione alla matrice sangue intero in questa prova è risultata uguale al 100%.

Sessantadue (62) campioni su 63 campioni di plasma sono risultati validi al primo test, il campione invalido è risultato positivo dopo ri-amplificazione. Sessantadue (62) campioni su 63 campioni di plasma sono stati confermati positivi per il DNA di CMV, mentre un campione è risultato discrepante negativo.

La sensibilità diagnostica del saggio in associazione alla matrice plasma in questa prova è risultata uguale al 98%.

Tutti i campioni clinici di urine sono risultati validi e sono stati confermati positivi per il DNA di CMV.

Un campione positivizzato ha riportato un risultato negativo con i prodotti ELITechGroup S.p.A. Questa discordanza può essere spiegata con un errore di preparazione dell'operatore.

La sensibilità diagnostica del saggio in questa prova è risultata uguale al 98%.

La sensibilità diagnostica totale del saggio è risultata uguale al 98,8%.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica è stata valutata utilizzando come materiale di riferimento 53 campioni di sangue intero raccolto in EDTA presunti negativi per il DNA di CMV, 50 campioni di plasma raccolto in EDTA presunti negativi per il DNA di CMV e 49 campioni di urine presunti negativi per il DNA di CMV.

Ciascun campione è stato impiegato per eseguire l'intera procedura di analisi: estrazione con il sistema di estrazione automatico **MagNA Pure 24** e amplificazione con i prodotti ELITechGroup S.p.A. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Campioni	N	positivi	negativi
Sangue intero raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di CMV	53	1	52
Plasma raccolto in EDTA presunto negativo per il DNA di CMV	50	2	48
Urina presunta negativa per il DNA di CMV	49	0	49

Tutti i campioni di sangue intero sono risultati validi in prima analisi e cinquantadue (52) su 53 campioni di sangue intero sono stati confermati negativi per il DNA di CMV, mentre un campione è risultato discrepante positivo. La specificità diagnostica del saggio in associazione alla matrice sangue intero in questa prova è risultata uguale al 98%.

Quarantanove (49) su 50 campioni di plasma sono risultati validi in prima analisi, un campione è risultato invalido in prima analisi e negativo dopo ri-amplificazione. Quarantotto (48) su 50 campioni di plasma, sono stati confermati negativi per il DNA di CMV, mentre due campioni sono risultati discrepanti positivi. La specificità diagnostica del saggio in associazione alla matrice plasma in questa prova è risultata uguale al 96%.

Tutti i campioni di urine sono risultati validi in prima analisi e confermati negativi per il DNA di CMV. La specificità diagnostica del saggio in associazione alla matrice urine in questa prova è risultata uguale al 100%.

La specificità diagnostica totale del saggio è risultata uguale al 98%.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche delle prestazioni del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nella Sezione 7 del Fascicolo Tecnico di Prodotto "CMV ELITE MGB® Kit", FTP RTK015PLD.

BIBLIOGRAFIA

- T. E. Fenner et al. (1991) *J Clin Microbiology* **29**: 2621 - 2622
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare con questo prodotto soltanto il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sangue intero raccolto in EDTA, plasma raccolto in EDTA, liquido cefalorachidiano, urina, tamponi buccali e liquido amniotico.

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

Non utilizzare con questo prodotto DNA estratto contaminato da emoglobina, destrano, Ficoll®, etanolo o 2-propanolo: queste sostanze inibiscono la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati non validi.

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

Non sono disponibili dati riguardo le prestazioni di questo prodotto con il DNA estratto dai seguenti campioni clinici: sospensioni di leucociti e sospensioni di granulociti.

Utilizzare questo prodotto solo con gli strumenti validati e i campioni clinici associati indicati nella sezione "Campioni e controlli".

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 CMV, 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, l'amplificazione e la rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

Quando la sessione di amplificazione è allestita manualmente, 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.

Quando la sessione di amplificazione è allestita manualmente, 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 il DNA di CMV non è stato rilevato nel DNA estratto dal campione ma non si può escludere che il DNA di CMV sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione 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 il DNA 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 nella regione del genoma virale in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e la sonda del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione del DNA di CMV.

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 prenatali e di urgenza, può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

PROBLEMI E SOLUZIONI

DNA bersaglio non rilevato nella reazione del Positive Control o dei Q - PCR Standard oppure Coefficiente di correlazione della Curva standard non valido	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastro.	Dispensare con cura i reagenti nella micropiastro seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela di reazione dispensati. Controllare i volumi di standard dispensati.
Preparazione scorretta della sessione con ELITE InGenius ed ELITE BeGenius	Controllare la posizione della miscela di reazione e del Negative Control. Controllare i volumi della miscela di reazione e del Negative Control.
Degradazione della sonda.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela di reazione.
Degradazione del controllo positivo o standard.	Utilizzare una nuova aliquota di controllo positivo o standard.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni dello standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

DNA bersaglio rilevato nella reazione di Controllo negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastro.	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 micropiastro seguendo il piano di lavoro.
Preparazione scorretta della sessione con ELITE InGenius e ELITE BeGenius.	Controllare la posizione della miscela di reazione e del Negative Control. Controllare i volumi della miscela di reazione e del Negative Control.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e standard impostata sullo strumento.
Micropiastro sigillata male.	Sigillare con attenzione la micropiastro.
Contaminazione dell'acqua ultrapura per biologia molecolare.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua.
Contaminazione della miscela di reazione.	Utilizzare una nuova aliquota di miscela 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.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

DNA bersaglio e Controllo Interno non rilevato nelle reazioni dei campioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropiastro.	Dispensare con cura i reagenti nella micropiastro seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela completa di reazione dispensati. Controllare i volumi di campioni dispensati.
Preparazione scorretta della sessione con ELITE InGenius e ELITE BeGenius.	Controllare la posizione della miscela di reazione e dei campioni. Controllare i volumi della miscela di reazione e dei campioni.
Degradazione del controllo interno.	Utilizzare nuove aliquote di controllo interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:2 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only". Ripetere l'estrazione e l'amplificazione del campione.
Problemi di conservazione dei reagenti.	Verificare che la miscela 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 del DNA estratto.
Errore dello strumento.	Contattare il Servizio tecnico di ELITechGroup.

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 degli standard o del controllo positivo.	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 DNA bersaglio con una possibile mutazione. Per confermare la presenza di una mutazione il DNA bersaglio presente nel campione dovrebbe essere sequenziato.

Per ELITE InGenius: Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa: - ripetere la reazione di amplificazione del campione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR only" oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "Extract + PCR".

Alto tasso anormale di risultati positivi nella stessa sessione (reazioni con valori Ct tardivi simili)	
Possibili cause	Soluzioni
Contaminazione da campione a campione durante le fasi pre-analitiche	Evitare qualsiasi contatto tra la micropipetta e la parete del tubo. Pulire la micropipetta con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% o un detergente per DNA / RNA dopo aver pipettato ciascun campione. Non utilizzare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzate con puntali con filtro per aerosol. Introdurre campioni nelle ultime posizioni degli strumenti, come indicato dalla GUI di ELITE InGenius. Seguire la sequenza di caricamento indicata dal software.
Contaminazione ambientale di laboratorio	Pulire tutte le superfici a contatto con l'operatore e i campioni (comprese le pipette) con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio al 3% o detergente per DNA / RNA. Esegui un ciclo di decontaminazione UV. Utilizzare una nuova provetta di PCR Mix e / o CPE.



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*. Certificazione rilasciata da DEKRA Certification B.V., Paesi Bassi.
-  Contenuto sufficiente per "N" test.
-  Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
-  Contenuto.
-  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 per la rivelazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti USA, n. 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 brevetti EP n. 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 oltre a richieste attualmente in corso di approvazione.

Questa licenza limitata permette alla persona o all'entità legale alla quale il prodotto è stato fornito di usare il prodotto e i dati generati con l'uso del prodotto, solo per la diagnostica umana. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite per altri scopi.

«NucLiSENS® easyMAG®» sono marchi registrati della bioMérieux SA.

«QIASymphony®» è un marchio registrato della QIAGEN GmbH.

FicolI® è un marchio registrato di GE Healthcare Bio-Sciences AB.

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

ELITe InGenius® ELITe BeGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup.

MagNA Pure è un marchio di Roche.

CMV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «**CMV ELITE MGB® Kit**» product is a **qualitative** and **quantitative** nucleic acids amplification assay for the detection and quantification of the DNA of Human Cytomegalovirus (CMV) in DNA samples extracted from whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA, cerebrospinal fluid (CSF), urine, buccal swab, amniotic fluid and bronchoalveolar lavage (BAL) / bronchial aspirate (BA).

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of CMV infections, alongside patient clinical data and other laboratory test outcomes.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Whole Blood EDTA and Plasma EDTA** and the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA** and the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030	›	CMV - ELITE Positive Control: CTR015PLD
ELITE BeGenius instrument: INT040	›	CMV ELITE Standard: STD015PLD
ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200	›	ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR	›	300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S (for INT030)
ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS	›	1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 (for INT040)
CPE – Internal Control: CTCPE		

F. ELITE InGenius protocol

- › Sample volume 200 µL
- › CPE Internal Control volume 10 µL
- › Total eluate volume 100 µL
- › PCR eluate input volume 20 µL
- › CMV Q-PCR Mix volume 20 µL
- › Unit of quantitative result International Unit: IU/mL genome equivalent: gEq/mL (equivalent to copies/mL)
- › Frequency of controls 15 days
- › Frequency of calibration 60 days

G. ELITE InGenius/ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	109 IU/mL – 156 gEq/mL	100% 60/60*	93% 55/59*
Plasma	88 IU/mL – 293gEq/mL	100% 54/54*	98% 57/58*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Whole Blood	254 – 1.4x10 ⁸	178 – 1 x10 ⁸	0.7
Plasma	293 – 3.3x10 ⁸	88 – 1 x10 ⁸	0.3

H. ELITe InGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Cerebrospinal fluid	58 IU/mL – 193 gEq/mL	100% 20/20*	100% 20/20*
Urine	151 IU/mL – 216 gEq/mL	100% 31/31*	100% 54/54*
Buccal swab	44 IU/mL – 220 gEq/mL	100% 50/50*	96% 50/52*
Amniotic fluid	57 IU/mL – 285 gEq/mL	100% 31/31*	100% 32/32*
BAL / BA	97 IU/mL – 485 gEq/mL	100% 49/49*	100% 49/49*

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Cerebrospinal fluid	335 – 5x10 ⁷	101 – 1,5 x10 ⁷	0.3
Urine	451 – 5x10 ⁷	316 – 3,5 x10 ⁷	0.7
Buccal swab	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
Amniotic fluid	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
BAL / BA	890 – 5x10 ⁷	178 – 1,0 x10 ⁷	0.2

H. Reference Material

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
Acrometrix: CMVDNA3E	Thermo-Fisher	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014: CMVDNA14	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log**

*confirmed samples/ tested samples

**within the range of quantification

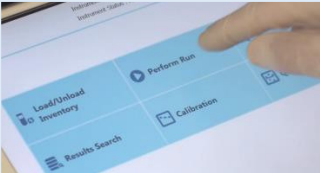
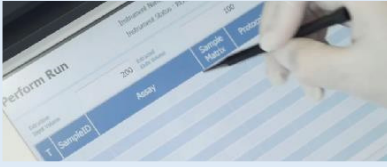

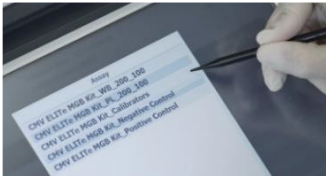


I. ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITe InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

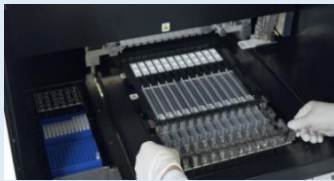
Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
--	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube 	6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block 

7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the Q-PCR Mix in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position :
Primary tube or Secondary tube

6. Load the CPE Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

ELITE BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"

2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired

3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

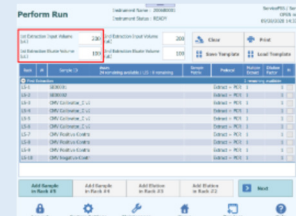
1. Select "Perform Run" on the touch screen



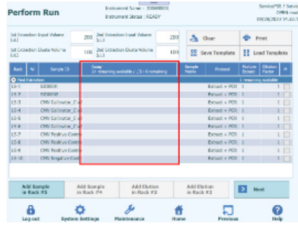
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

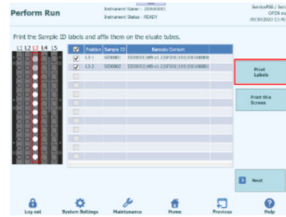


4. Select the "Assay protocol" of interest



Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



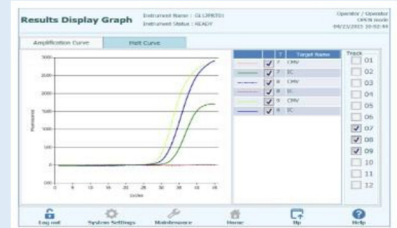
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»

4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack

2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

5. Close the door.
Start the run

3. Select the "Assay protocol" of interest

6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

7. Load: Filter Tips and the Extraction Rack

5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.

8. Close the door
Start the run

6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area

9. Archive the eluate sample

CMV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The CMV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**.
The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Plasma EDTA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030	› CMV ELITE Positive Control: CTR015PLD
ELITE InGenius SP1000 Extraction Cartridge: INT033SP1000	› CMV ELITE Standard: STD015PLD
ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR	› ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS	› Filter Tips 300: TF-350-L-R-S
CPE – Internal Control: CTCRPE	

F. ELITE InGenius protocol

› Sample volume	1000 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL genome equivalent:
› CPE Internal Control volume	10 µL		gEq/mL (<i>equivalent to</i>
› Total eluate volume	100 µL		<i>copies/mL</i>) 15 days
› PCR eluate input volume	20 µL	› Frequency of controls	60 days
› CMV Q-PCR Mix volume	20 µL	› Frequency of calibration	

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma	17 IU/mL – 57 gEq/mL	97% 58/60*	95% 54/57* <small>*confirmed samples/ tested samples</small>
Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Plasma	593 – 5x10 ⁶	178 – 1,5 x10 ⁷	0.3

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2017: CMVDNA17-S	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 0.5 log**

*confirmed samples/ tested samples

**within the range of quantification

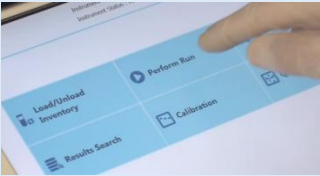
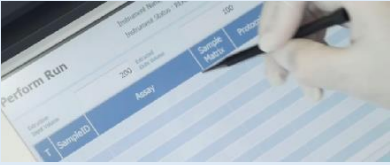

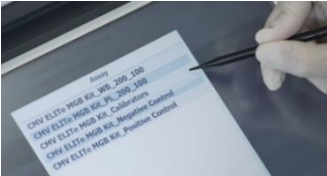

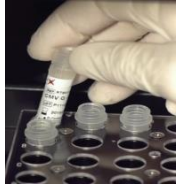



I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the CMV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p>	<p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p>
<p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

CMV ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA › **Plasma** EDTA › **Cerebrospinal fluid** › **Urine**

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument › ELITE STAR: INT010 › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX › ELITE GALAXY: INT020 › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › CMV – ELITE Positive Control: CTR015PLD › CMV ELITE Standard: STD015PLD › easyMAG - Generic protocol 2.0.1 › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit › Molecular biology grade water |
|--|---|

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	263 IU/mL - 332 gEq/mL	100% (57/60)*	100% (63/70)*
	Plasma	222 IU/mL - 201 gEq/mL	97.1% (66/68)*	100% (61/61)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	127 IU/mL - 249 gEq/mL	98.3% (59/60)*	100% (65/66)*
	Plasma	140 IU/mL - 519 gEq/mL	92.2% (47/51)*	100% (64/64)*
easyMAG - ABI	Whole blood	-	100% (50/50)*	100% (50/50)*
	Cerebrospinal fluid	-	100% (60/60)*	100% (60/60)*
	Urine	-	100% (52/52)*	98.2% (55/56)*
QIASymphony - ABI	Whole blood	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*
	Plasma	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*

*confirmed samples/tested samples

System	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
ELITE STAR - ABI	221 → 22 x 10 ⁶ (WB), 308 → 30.8 x 10 ⁶ (PL)	28 (WB,PL)	0.79 (WB), 1.10 (PL)
ELITE GALAXY - ABI	178 → 17.8 x 10 ⁶ (WB), 105 → 10 x 10 ⁶ (PL)	35 (WB,PL)	0.51 (WB), 0.27 (PL)
easyMAG - ABI	305 → 30.5 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB), 10 (CSF, Urine)	0.61 (WB)
QIASymphony - ABI	110 → 11 x 10 ⁶ (WB), 104 → 10 x 10 ⁶ (PL)	24 (WB), 12 (PL)	0.46 (WB), 0.87 (PL)

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Star	WB, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL for 12 samples
ELITe Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	WB	100 µL	-	50 µL	-
	CSF, Urine	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	WB	200 µL	300 µL	60 µL	-
	Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

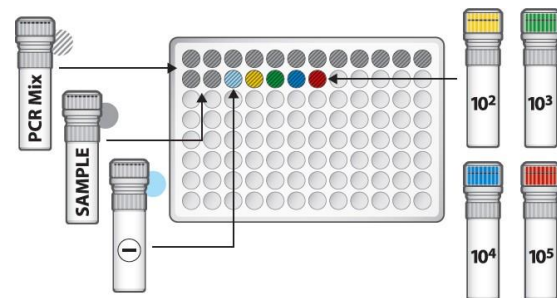
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw CMV Q-PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	CMV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

CMV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 100 to 10⁷ gEq/mL.

CMV ELITE MGB® Kit used with Cobas Z 480 PCR instrument

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas Z 480 analyzer** (Roche) and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA › Plasma EDTA › Urine

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

Ready to use complete reaction mixture
Number of tests per kit: 100
Freeze and thaw cycles per tube: 5
Maximum shelf-life: 24 months
Storage temperature: -20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System
- › CMV – ELITE Positive Control:CTR015PLD
- › CMV – ELITE Positive Control RF:CTR015PLD-R
- › CMV ELITE Standard:STD015PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	135 IU/mL 270 gEq/mL	100% (51/51)*	98% (52/53)*
	Plasma	88 IU/mL - 220 gEq/mL	98% (62/63)*	96% (48/50)*
	Urine	296 IU/mL - 269 gEq/mL	98% (50/51)*	100% (49/49)*

*confirmed samples/tested samples

System	Matrix	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
MagNA Pure 24	Whole blood	178 IU/mL -> 10⁶ IU/mL		0.5
	Plasma	100 IU/mL -> 10⁶ IU/mL	25 (WB, PL, Urine)	0.4
	Urine	10³ IU/mL -> 10⁶ IU/mL		1.1

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB PL, Urine	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL Diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "465-510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540-580"

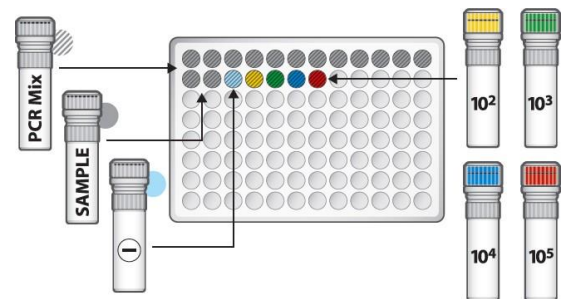
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

acquisition must be set during hybridation step at 60°C

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw CMV Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	Matrix	CMV FAM	Internal Control VIC
Cobas – Z 480	WB	0.80	1.5
	Plasma	0.55	1.2
	Urine	0.55	1.2

Interpretation - Qualitative results

CMV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ gEq/mL.