



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

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

AVVERTENZA del 23/05/2023

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«CMV RNA ELITE MGB[®] Kit» Ref. RTS115ING

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Modifica dell'Uso Previsto*
- *Introdotta la possibilità di visualizzare la curva di melting*

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

NOTA BENE



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



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



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



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



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



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

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

RUO



INDICE

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 4
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 6
PROCEDURA	pag. 7
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 15
BIBLIOGRAFIA	pag. 22
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 23
RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	pag. 24
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 26
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 26
ANNEX	pag. A

USO PREVISTO

Il prodotto **CMV RNA ELITE MGB® Kit** è un reagente *in vitro* che deve essere utilizzato da operatori sanitari professionali come parte di un saggio quantitativo di retrotrascrizione e amplificazione degli acidi nucleici per la rilevazione e la quantificazione dell'**mRNA virionico del Citomegalovirus umano (CMV)** estratto da campioni non-cellulari.

Il saggio è testato in associazione con lo strumento «**ELITE InGenius®**», un sistema automatizzato e integrato per l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione real time e l'interpretazione dei risultati, partendo da campioni di plasma umano raccolti in EDTA.

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

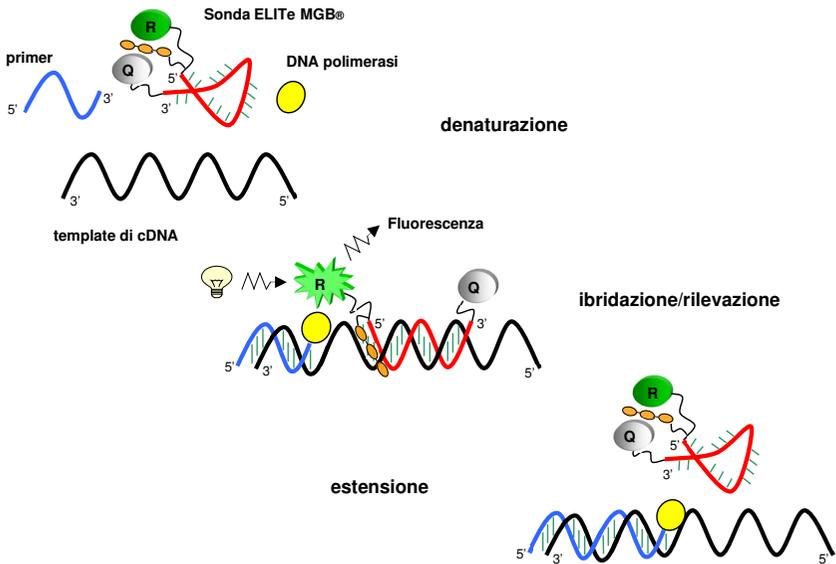
PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione di trascrizione inversa e real time PCR (metodica one step) eseguita con **ELITE InGenius®**, un sistema automatizzato ed integrato per l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione degli acidi nucleici e l'interpretazione dei risultati.

Partendo dall'RNA estratto dal campione in analisi la miscela completa CMV RNA PCR Mix esegue una reazione di trascrizione inversa e amplificazione specifica per l'mRNA del gene UL21.5 del CMV e per una regione dell'RNA genomico del fago MS2 (controllo interno esogeno di estrazione e inibizione). Il controllo interno esogeno viene aggiunto dallo strumento al buffer di lisi e consente di monitorare l'intero processo di estrazione, retrotrascrizione e amplificazione.

La sonda specifica per il CMV, basata sulla tecnologia ELITE MGB®, e marcata con il fluoroforo FAM, è attivata quando ibrida con lo specifico prodotto della reazione di amplificazione del CMV. La sonda specifica per il controllo interno, basata sulla tecnologia ELITE MGB e marcata con il fluoroforo AquaPhluor® 525 (AP525), è attivata quando ibrida con lo specifico prodotto della reazione di amplificazione del controllo interno. L'emissione della fluorescenza aumenta con il prodotto specifico della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dallo strumento ELITE InGenius. L'elaborazione dei dati determina la presenza e il titolo del CMV RNA presente nel campione.

La figura seguente illustra in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza della sonda che applica la tecnologia ELITE MGB. Il fluoroforo non emette segnale quando la sonda non ibrida con il prodotto di reazione specifico. Quando la sonda ibrida con il prodotto specifico di amplificazione, il quencher viene separato dal fluoroforo ed emette il segnale di fluorescenza. Da notare che la sonda non viene idrolizzata durante il processo di amplificazione e può essere utilizzata per l'analisi di dissociazione e il calcolo della temperatura di melting (Tm).



DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto **CMV RNA ELITE MGB Kit** fornisce i seguenti componenti:

• **CMV RNA PCR Mix**

La **CMV RNA PCR Mix** è una miscela ottimizzata e stabilizzata di oligonucleotidi e reagenti per trascrizione inversa e amplificazione real time, pre-aliquotata in **quattro provette** (tappo BIANCO). Ogni provetta contiene **600 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **24 test** (almeno 5 campioni per sessione) in associazione con **ELITE InGenius**.

I primer e la sonda per **CMV RNA** (stabilizzata dal gruppo MGB®, marcata con il fluoroforo FAM e inattivata dal quencher non fluorescente Eclipse) sono specifici per l'mRNA del gene UL21.5 (spliced mRNA) del CMV. Il segnale emesso dalla sonda per CMV RNA è rilevato dal canale 1 (CMV RNA) di **ELITE InGenius**.

I primer e la sonda per il controllo interno (stabilizzata dal gruppo MGB, marcata con il fluoroforo AP525 e inattivata dal quencher non fluorescente Eclipse) sono specifici per una regione di RNA genomico di fago (MS2). Il segnale emesso dal controllo interno è rilevato dal canale 2 (IC) di **ELITE InGenius**.

La miscela di reazione fornisce anche il buffer, il cloruro di magnesio, i nucleotidi trifosfato e la DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

• **RT EnzymeMix**

L' **RT EnzymeMix** è una miscela ottimizzata e stabilizzata di enzimi per trascrizione inversa, pre-aliquotata in **due provette** (con tappo NERO). Ogni provetta contiene **20 µL** di soluzione, che consentono di effettuare **48 test** (almeno 5 campioni per sessione) in associazione con **ELITE InGenius**.

Il **CMV RNA ELITE MGB Kit** consente di effettuare **96 test in associazione con ELITE InGenius**, utilizzando rispettivamente 20 µL di **CMV RNA PCR Mix** e 0,3 µL di **RT EnzymeMix** per reazione.

MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità	Classificazione dei rischi
CMV RNA PCR Mix Ref. RTS115ING	Miscela di reagenti per trascrizione inversa e real time PCR con tappo BIANCO	4 x 600 µL	-
RT EnzymeMix Ref. RTS003-RT	Trascrittasi inversa in provetta con tappo con inserto NERO	2 x 20 µL	-

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti non talcati monouso in nitrile o materiale analogo.
- Agitatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000-14.000 giri/minuto).
- 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).
- Provette Sarstedt da 2,0 ml con tappo a vite corrugato (Sarstedt cod. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione del RNA dai campioni da analizzare, il controllo interno, il controllo positivo di amplificazione, i calibratori e i materiali di consumo **non** sono in dotazione con questo prodotto.

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la trascrizione inversa, l'amplificazione real time e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, è richiesto l'impiego dello strumento **ELITE InGenius** (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030) e dei seguenti Assay Protocol specifici per il prodotto (EG SpA):

- parametri per i calibratori **CMV RNA ELITE_Open_STD**,
- parametri per il controllo positivo di amplificazione **CMV RNA ELITE_Open_PC**,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione **CMV RNA ELITE_Open_NC**,
- parametri per i campioni di plasma in analisi **CMV RNA ELITE_PL_Op_600_50**,

Con lo strumento **ELITE InGenius** è richiesto l'impiego dei seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione **ELITE InGenius® SP 1000** (EG SpA, cod. INT033SP1000),
- materiali di consumo per l'estrazione **ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set** (EG SpA, cod. INT032CS),
- cartucce di amplificazione **ELITE InGenius® PCR Cassette** (EG SpA, cod. INT035PCR),
- puntali **300 µL Filter Tips Axygen** (Axygen BioScience Inc., CA, USA, cod. TF-350-L-R-S),
- contenitori per gli scarti **ELITE InGenius® Waste Box** (EG SpA, cod. F2102-000).

Come controllo interno di estrazione e inibizione, è richiesto l'impiego del prodotto generico **CPE - Internal Control** (EG SpA, cod. CTCPE). Questo prodotto contiene una soluzione stabilizzata di DNA plasmidici e RNA genomico del fago MS2.

Per calcolare la curva standard del sistema (strumento e lotto di prodotto) è richiesto l'impiego del prodotto **CMV RNA ELITE Standard** (EG SpA, cod. STD115ING). Il prodotto fornisce quattro diluizioni stabilizzate di DNA plasmidico a concentrazione nota per ottenere la curva standard.

Note: poichè questo prodotto rileva l'mRNA del virione del CMV e non il DNA genomico del CMV, i risultati del saggio non sono correlabili con lo standard internazionale "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code: 09/162) che è studiato per la quantificazione del DNA genomico.

Per la validazione del sistema (strumento e lotto di prodotto) è richiesto il prodotto specifico **CMV RNA - ELITE Positive Control** (EG SpA, cod. CTR115ING). Il prodotto fornisce una soluzione stabilizzata di DNA plasmidico a concentrazione nota.

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 potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare il materiale che viene a contatto con i campioni biologici per almeno 30 minuti con ipoclorito di sodio al 3% (candeggina) o in autoclave a 121 °C per un'ora prima di smaltirlo. Evitare che i reagenti di estrazione entrino in contatto con l'ipoclorito di sodio (candeggina).

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali utilizzati per eseguire il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Trattare e smaltire i rifiuti nel rispetto di norme di sicurezza adeguate. Incenerire il materiale monouso combustibile. Neutralizzare i rifiuti liquidi contenenti acidi o basi prima di smaltirli.

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.
 Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
 Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.
 Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.
 Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.
 Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.
 Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.
 Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.
 Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il 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 devono essere eseguite da personale qualificato e addestrato per evitare il rischio di risultati errati, soprattutto a causa della degradazione degli acidi nucleici contenuti nei campioni o della contaminazione dei campioni stessi da parte di prodotti di amplificazione.

Utilizzare camici, guanti e strumenti per la preparazione delle sessioni di lavoro.

I campioni devono essere idonei e, se possibile, specifici per questo tipo di analisi. Manipolare i campioni sotto una cappa a flusso laminare. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei campioni solo per questo specifico scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i reagenti sotto una cappa a flusso laminare. Preparare i reagenti necessari per la sessione in modo tale che siano in quantità sufficienti per l'uso in un solo giorno. Utilizzare le pipette destinate alla manipolazione dei reagenti unicamente per questo scopo. Utilizzare pipette a spostamento positivo o con puntali con filtro per aerosol. Utilizzare puntali sterili, esenti da DNasi e RNasi, come anche da DNA e RNA.

Manipolare i prodotti di estrazione in modo tale da ridurre quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

Gestire le "PCR cassette" in modo tale da ridurre quanto più possibile la diffusione dei prodotti di amplificazione nell'ambiente come pure la contaminazione dei campioni e dei reagenti.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti**CMV RNA PCR Mix**

La **CMV RNA PCR Mix** deve essere conservata al buio a temperatura di -20 °C o inferiore.

La **CMV RNA PCR Mix** deve essere utilizzata entro un mese dalla prima apertura del tubo.

La **CMV RNA 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

RT EnzymeMix

L'**RT EnzymeMix** deve essere conservata a temperatura di -20 °C o inferiore.

L'**RT EnzymeMix** deve essere usata entro un mese dalla prima apertura.

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

L'**RT EnzymeMix** non deve rimanere esposta a temperature superiori a -20 °C per un massimo di **dieci volte**: un'ulteriore esposizione può causare un calo delle prestazioni del prodotto.

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

CAMPIONI E CONTROLLI

Questo prodotto deve essere utilizzato con campioni di **Plasma raccolto in provette con EDTA**.

Raccogliere i campioni di plasma per l'estrazione degli acidi nucleici in provette con EDTA, trasportarli e conservarli a temperatura ambiente (~+25 °C) o a +2/+8 °C per un massimo di 24 ore. Diversamente, congelarli e conservarli a ~-20 °C per un massimo di 1 mese.

Si raccomanda di ripartire i campioni in aliquote prima di congelarli, per evitare di ripetere più cicli di congelamento e scongelamento. Se si usano campioni congelati, scongelarli immediatamente prima dell'estrazione in modo da evitare la possibile degradazione degli acidi nucleici.

Nota: I campioni di sangue intero per la preparazione del plasma, deve essere raccolto in EDTA, trasportato e conservato a temperatura ambiente (~+25 °C) o a +2/+8 °C per un massimo di 24 prima della centrifugazione.

Nota: L'estrazione dell'RNA dal plasma raccolto in provette con EDTA si esegue con il sistema **ELITE InGenius** e con **ELITE InGenius Software** versione 1.3 (o versioni equivalenti successive) utilizzando l'Assay Protocol **CMVRNA ELITE_PL_Op_600_50**. Questo protocollo processa 600 µL di campione, partendo da un tubo secondario, aggiunge 10 µL di **CPE** (controllo interno) per ogni estrazione ed eluisce gli acidi nucleici in 50 µL. Il tubo primario non può essere utilizzato in associazione con l'Assay Protocol.

Gli acidi nucleici purificati possono essere conservati a +2 / +8 °C per 16 ore oppure a ~-20 °C per un mese.

Sostanze interferenti

I dati disponibili sull'inibizione indotta da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze potenzialmente interferenti" al capitolo "Caratteristiche delle prestazioni".

Non utilizzare il plasma raccolto in provette con eparina al fine di prevenire l'inibizione della reazione di trascrizione inversa e di amplificazione e frequenti risultati non validi.

Curva di Calibrazione e Controlli di amplificazione

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

- come set di calibrazione, utilizzare i quattro livelli di concentrazione del prodotto **CMV RNA ELITE Standard** (non fornito in questo kit), in associazione con l'Assay Protocol **CMVRNA ELITE_Open_STD**,
- come controllo positivo di amplificazione utilizzare il prodotto **CMV RNA - ELITE Positive Control** (non fornito in questo kit), in associazione con l'Assay Protocol **CMVRNA ELITE_Open_PC**,
- come controllo negativo di amplificazione utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornito in questo kit) in associazione con l'Assay Protocol **CMVRNA ELITE_Open_NC**.

Nota: Il sistema **ELITE InGenius** richiede risultati approvati e validi della curva di calibrazione e dei controlli di amplificazione per ciascun lotto di reagente di amplificazione inserito nel database.

Le curve di calibrazione, approvate e inserite nel database, scadono dopo **60 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi del **CMV RNA ELITE Standard** in associazione con il lotto del reagente di amplificazione in uso.

I risultati dei controlli di amplificazione, approvati e inseriti nel database, scadono dopo **15 giorni**. Alla data di scadenza è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi in associazione con il lotto del reagente di amplificazione in uso.

Inoltre, i calibratori e i controlli di amplificazione devono essere ripetuti nei seguenti casi:

- quando s'inizia un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- quando i risultati delle analisi di controllo della qualità (v. paragrafo successivo) non rientrano nelle specifiche,
- quando lo strumento **ELITE InGenius** deve essere sottoposto a un importante intervento di manutenzione.

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

Controlli di qualità

Si consiglia la validazione programmata della procedura di estrazione e amplificazione. Si possono utilizzare campioni testati o materiale di riferimento omologato.

Quando disponibili, utilizzare i controlli esterni in conformità con le linee guida delle organizzazioni di accreditamento locali, statali e/o federali, a seconda del caso.

PROCEDURA

La procedura per l'uso del prodotto **CMV RNA ELITE MGB Kit** con il sistema **ELITE InGenius** si articola in tre fasi:

- verifica del sistema,
- allestimento della sessione,
- lettura ed esportazione dei risultati.

Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, come descritto nella documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere lo strumento **ELITE InGenius** e selezionare la modalità "OPEN",
- verificare che i calibratori (**CMV RNA Q-PCR Standard**) siano stati processati, approvati e non siano scaduti (Status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Se i calibratori non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nei paragrafi seguenti,
- verificare che i controlli di amplificazione (**CMV RNA Positive Control**, **CMV RNA Negative Control**) siano stati processati, approvati e non siano scaduti (Status) in associazione con il lotto di reagente di amplificazione previsto. Se i controlli di amplificazione non sono approvati o sono scaduti, processarli come descritto nei paragrafi seguenti,
- selezionare il tipo di corsa, seguendo le istruzioni visualizzate sull'interfaccia grafica (GUI) per l'allestimento della sessione e utilizzando gli Assay Protocol forniti da EG S.p.A.

L'Assay Protocol disponibile per analizzare i campioni con il prodotto **CMV RNA ELITE MGB Kit** è descritto nella tabella sottostante:

Protocollo analitico per il prodotto CMV RNA ELITE MGB Kit			
Nome	Matrice	Esito	Caratteristiche
CMVRNA ELITE_PL_Op_600_50	Plasma	Positivo / copie/ml / Negativo	Volume estrazione in ingresso: 600 µL Volume eluizione estratto: 50 µL Controllo Interno: 10 µL Fattore di diluizione: 1,7 Sonicazione: NO Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 20 µL

Se l'Assay protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELITechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

Allestimento della sessione

Il prodotto **CMV RNA ELITE MGB Kit** può essere utilizzato con il sistema **ELITE InGenius** per eseguire:

- A. Sessione integrata (Estrazione + PCR),
- B. Sessione di amplificazione (PCR only),
- C. Sessione di calibrazione (PCR only),
- D. Sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo (PCR Only).

Tutti i parametri necessari per la sessione sono inclusi nell'Assay protocol disponibile sullo strumento e vengono richiamati automaticamente nel momento in cui lo si seleziona.

Nota: il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile caricare i dati della sessione di lavoro. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

Prima di iniziare la sessione, è obbligatorio procedere come segue:

1. Scongellare per 30 minuti a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti **CMV RNA PCR Mix** (tappo BIANCO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna provetta contiene un volume sufficiente per **24 test**. Mescolare mediante agitatore le provette per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

Nota: Scongellare la miscela **CMV RNA PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. Prelevare le provette contenenti **RT EnzymeMix** (tappo NERO) necessarie per la sessione, tenendo presente che ciascuna contiene un volume sufficiente per **48 reazioni**. Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o nel blocco refrigerato.

Nota: Non esporre il prodotto **RT EnzymeMix** a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

3. Preparare una provetta da 2 ml con tappo a vite (Sarstedt cod. 72.694.005, non in dotazione con il kit) per la **miscela di reazione** e contrassegnarla in maniera riconoscibile con un pennarello a inchiostro permanente.
4. Calcolare i volumi di **CMV RNA PCR Mix** e **RT EnzymeMix** necessari per preparare la **miscela di reazione completa** in funzione del numero di campioni da analizzare, come descritto nella tabella sottostante.

Nota: Per calcolare i volumi dei due componenti secondari da preparare per la **miscela di reazione completa**, è necessario definire il numero di campioni (N) da analizzare nell'ambito della sessione e seguire le indicazioni riportate nella tabella sottostante.

Numero di campioni (N)	CMV RNA PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

5. Preparare la **miscela di reazione completa** aggiungendo all'apposita provetta da 2 ml i volumi calcolati dei due componenti.
6. Mescolare mediante **agitatore a bassa velocità** la provetta per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugarla per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio.

Nota: La **miscela di reazione completa** deve essere utilizzata entro **7 ore** se conservata nel blocco refrigerato. La miscela di reazione completa **non** può essere conservata per essere riutilizzata.

Nota: La **miscela di reazione completa** è fotosensibile per cui non esporla alla luce diretta.

Si descrivono di seguito i passaggi principali per la preparazione dei quattro tipi di sessione.

A. Sessione integrata

Per preparare una sessione integrata con estrazione e amplificazione del campione, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

1. Scongellare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni da analizzare e trattarle secondo le linee guida del laboratorio e secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli". Agitare delicatamente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mettere in ghiaccio o blocco refrigerato.

Nota: per l'analisi sono necessari 600 µL di campione, che devono essere trasferiti negli "Extraction tubes" precedentemente etichettati (non forniti con il kit).

2. Scongellare le provette di CPE per 30 minuti a temperatura ambiente (~+25 °C). Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 12 estrazioni. Mescolare mediante agitatore le provette per 10 secondi ripetendo l'operazione per tre volte, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e mantenere su ghiaccio o nel blocco refrigerato.
3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (esegui sessione).

- Verificare che il volume di estrazione sia di 1000 µL (anche se si usano 600 µL di campione) e che il volume di eluato estratto sia di 50 µL.
- Per ciascun campione, identificare un "Track" dedicato inserendo il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
- Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare l'Assay protocol da utilizzare (es. CMVRNA ELITE_PL_Op_600_50).
- Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Nella colonna "Sample Position" (posizione campione) selezionare "Extraction tube" (provetta con campione da estrarre) come posizione in cui caricare il campione.
- Verificare che nella colonna "Dilution Factor" sia riportato il fattore di diluizione 1.7. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.

Nota: Per eseguire l'analisi, trasferire 600 µL di campione nell'Extraction Tube" contrassegnato in maniera riconoscibile. Il sistema **ELITE InGenius** lascerà nell'"Extraction Tube" l'eventuale quantità eccedente.

- Caricare la miscela di reazione completa e il CPE nel "Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di CMV RNA PCR Mix e CPE. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
- Caricare le "PCR cassette", le cartucce per estrazione ELITE InGenius SP 1000, tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITE InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il campione estratto residuo presente nell'Elution tube, tapparlo, identificarlo e conservarlo a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le "PCR cassette" contenenti i prodotti della reazione di amplificazione, le cartucce per estrazione e i materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

B. Sessione di amplificazione

Per allestire la sessione di amplificazione partendo da acidi nucleici estratti, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

- Scongellare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni di acidi nucleici estratti da analizzare. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare su ghiaccio o nel blocco refrigerato.
- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
- Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume estrazione in ingresso sia di 1000 µL e che il volume eluizione estratto sia di 50 µL.
- Per ciascun campione, identificare un "Track" dedicato inserendo il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
- Nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo analitico da utilizzare (es. CMV RNA ELITE_PL_Op_600_50).

- Nella colonna "Protocol" (protocollo) selezionare "PCR Only" (solo PCR).
- Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" (posizione del campione) sia "Elution Tube" (provetta con soluzione di eluizione).
- Verificare che nella colonna "Dilution Factor" sia riportato il fattore di diluizione 1.7. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **CMV RNA PCR Mix**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Caricare le **PCR cassette** e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITE InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere il campione estratto residuo presente nella provetta con soluzione di eluizione, tapparlo e conservarlo a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le "PCR cassette" contenenti i prodotti della reazione di amplificazione e altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

C. Sessione di calibrazione

Per allestire la sessione di calibrazione con Q-PCR Standard, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

- Scongellare le provette **CMV RNA Q-PCR Standard** (Cal1: CMV RNA Q-PCR Standard 10², Cal2: CMV RNA Q-PCR Standard 10³, Cal3: CMV RNA Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: CMV RNA Q-PCR Standard 10⁵) a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare su ghiaccio o nel blocco refrigerato.
- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
- Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume estrazione in ingresso sia di 1000 µL (anche se si usano 600 µL di campione) e che il volume eluizione estratto sia di 50 µL.
- Identificare un "Track" dedicato e nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo analitico "CMVRNA ELITE_STD"; digitare il numero di lotto e la data di scadenza del **CMV RNA Q-PCR Standard**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Nella colonna "Protocol" (protocollo) verificare che sia riportato "PCR Only" (solo PCR).
- Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" (posizione del campione) sia "Elution Tube" (provetta con soluzione di eluizione).
- Verificare che nella colonna "Dilution Factor" sia riportato il fattore di diluizione 1.7. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
- Caricare la **miscela di reazione completa** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di **CMV RNA PCR Mix**. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.

9. Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire la preparazione.
10. Caricare le "PCR cassette" e le provette **CMV RNA Q-PCR Standard** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
11. Chiudere lo sportello dello strumento.
12. Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITE InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il prodotto **CMV RNA Q – PCR Standard** residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C.

Nota: Il prodotto **CMV RNA Q-PCR Standard** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro in modalità "PCR ONLY" indipendenti da 2 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le "PCR cassette" contenenti i prodotti di reazione e altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

D. Sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo

Per preparare la sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo procedere come segue, come risulta dalla GUI:

1. Scongelare le provette di **CMV RNA Positive Control** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e conservare su ghiaccio o nel blocco refrigerato.
2. Come Controllo Negativo, trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un Elution tube, fornito con il prodotto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
3. Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run" (esegui sessione).
4. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che il volume estrazione in ingresso sia di 1000 µL (anche se si usano 600 µL di campione) e che il volume eluzione estratto sia di 50 µL.
5. Per il controllo Positivo, identificare un "Track" dedicato e nella colonna "Assay" (saggio) selezionare il protocollo analitico "CMV RNA ELITE_Open_PC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del CMV RNA Positive Control.
6. Per il controllo negativo, identificare un "Track" dedicato e selezionare nella colonna "Assay" (saggio) "CMV RNA ELITE_Open_NC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
7. Nella colonna "Protocol" (protocollo) verificare che sia riportato "PCR Only" (solo PCR).
8. Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella colonna "Sample Position" (posizione del campione) sia "Elution Tube" (provetta con soluzione di eluzione).
9. Verificare che nella colonna "Dilution Factor" sia riportato il fattore di diluizione 1.7. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
10. Caricare la miscela di reazione completa nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI e digitare il numero di lotto e la data di scadenza di CMV RNA PCR Mix. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
11. Nell'"Inventory Area" (area reagenti) selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.

12. Caricare le "PCR Cassette", la provetta per il Controllo Positivo per CMV RNA e per il Controllo Negativo seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" (avanti) per proseguire.
13. Chiudere lo sportello dello strumento.
14. Premere "Start" (avvio) per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELITE InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, e di stampare e salvare il report.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il **CMV RNA Positive Control** residuo, tapparlo e conservarlo a -20 °C. Smaltire il **Controllo Negativo** residuo.

Nota: Il **CMV RNA Positive Control** può essere utilizzato per 4 sessioni di lavoro in modalità "Extract + PCR" indipendenti da 3 ore ciascuna.

Nota: Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le **cassette di PCR** contenenti i prodotti della reazione di amplificazione e altri materiali di consumo e smaltirli facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

Nota: La **miscela di reazione completa** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e per il tempo necessario per iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente le provette e centrifugarle per 5 secondi prima di iniziare una nuova sessione.

Controllo e approvazione dei risultati

Il sistema **ELITE InGenius** monitora i segnali di fluorescenza del target e del controllo interno per ciascuna reazione e applica automaticamente i parametri del protocollo di analisi per generare curve di amplificazione che vengono poi interpretate nei risultati.

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display" (schermata dei risultati), nella quale sono riportati i risultati relativi a campione/standard/controllo e le informazioni riguardanti la sessione. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i report ("Sample Report" o "Track Report"). Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota: Il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare i risultati della sessione di lavoro al centro elaborazione dati del laboratorio. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Il sistema **ELITE InGenius** genera i risultati del prodotto **CMV RNA ELITE MGB Kit** tramite la seguente procedura:

- A. validazione della curva di calibrazione,
- B. validazione dei risultati relativi al controllo positivo e negativo,
- C. validazione dei risultati relativi al campione,
- D. refertazione dei risultati relativi al campione.

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per CMV RNA (canale "CMV RNA") nelle reazioni di amplificazione del calibratore sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "**CMV RNA ELITE_Open STD**". La curva di calibrazione viene calcolata mettendo in relazione i valori di Ct ottenuti con le concentrazioni.

La curva di calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, viene registrata nel database (calibrazione) e può essere consultata e approvata da personale avente la qualifica di "Administrator" (amministratore) o "Analyst" (operatore), seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

La curva di calibrazione, specifica per il lotto di reagente di amplificazione, scadrà **dopo 60 giorni**.

Nota: se la curva di calibrazione non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Calibration" (calibrazione) si visualizza il messaggio "Failed" (non conforme) che ne impedisce l'approvazione. Le reazioni di amplificazione del calibratore devono essere ripetute.

Nota: Se la curva di calibrazione viene trattata insieme ai campioni da testare e il risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati dell'amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per CMV RNA (canale CMV RNA) nella reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocoli "CMV RNA ELITE_Open_PC" e "CMV RNA ELITE_Open_NC". I valori di Ct ottenuti per il target sono convertiti in valori di concentrazione ed utilizzati per validare il sistema (lotto di reagenti e strumento).

I risultati delle sessioni di amplificazione per il controllo positivo e negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere consultati e approvati da personale avente la qualifica di "Administrator" (amministratore) o "Analyst" (operatore), seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI.

I risultati per il controllo positivo e il controllo negativo, specifici per il lotto di reagente di amplificazione, scadranno **dopo 15 giorni**.

Prima di analizzare qualsiasi campione, è obbligatorio verificare che i risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo siano approvati e validi per il lotto di reagente di amplificazione. Lo stato dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo per ciascun lotto di reagente di amplificazione è mostrato nella schermata "Controlli" (Controls). Se i risultati del controllo positivo e/o del controllo negativo sono falliti o scaduti, eseguire il controllo come descritto sopra.

I risultati delle sessioni di amplificazione per controllo positivo e controllo negativo sono utilizzati dal software dello strumento per calcolare le Carte di controllo ("Control Chart"). A tal fine sono richiesti quattro risultati per il controllo positivo e il controllo negativo da quattro sessioni differenti. A questo punto, i risultati per il controllo positivo e il controllo negativo vengono utilizzati per monitorare le prestazioni durante la fase di amplificazione. Consultare il manuale d'istruzioni dello strumento per maggiori dettagli.

Nota: se il risultato della reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo non soddisfa i criteri di accettazione, sulla schermata "Controls" (controlli) appare il messaggio "Failed" (non conforme) che ne impedisce l'approvazione. In tal caso, ripetere la reazione di amplificazione con il controllo positivo e il controllo negativo.

Nota: se il controllo positivo o il controllo negativo vengono trattati insieme ai campioni da analizzare e il risultato non è valido, i campioni possono essere approvati, ma i risultati non sono validati. In tal caso, anche l'amplificazione di tutti i campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per CMV RNA (canale "CMV RNA") e dalla sonda del controllo Interno (canale "IC") nelle reazioni di amplificazione sono analizzati automaticamente e interpretati mediante il software dello strumento con i parametri inclusi nell' Assay Protocol "CMVRNA ELITE_PL_Op_600_50".

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

La sessione del campione può essere approvata quando sono soddisfatte le tre condizioni riportate nella tabella sottostante.

1) Curva di calibrazione	Status
CMV RNA Q-PCR Standard	APPROVATO
2) Controllo positivo	Status
CMV RNA Positive Control	APPROVATO
3) Controllo negativo	Status
CMV RNA Negative Control	APPROVATO

Per ogni campione, il risultato del saggio viene interpretato automaticamente dal sistema secondo quanto stabilito dall'algoritmo del programma **ELITE InGenius software** e dai parametri dell'Assay Protocol

La tabella sottostante riporta i possibili messaggi relativi al risultato ottenuto.

Risultato di una sessione sul campione	Interpretazione
CMV RNA: RNA rilevato, quantità pari a XXX copie / mL	Il CMV RNA è stato rilevato nel campione nell'intervallo di misurazione del saggio, nella quantità indicata.
CMV RNA: RNA Rilevato, quantità inferiore a LLoQ copie / mL	Il CMV RNA è stato rilevato nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio.
CMV RNA: RNA Rilevato, quantità superiore a ULoQ copie / mL	Il CMV RNA è stato rilevato nel campione oltre il limite superiore di quantificazione del saggio.
CMV RNA: RNA non Rilevato o inferiore a LoD copie / mL	Il CMV RNA non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per il CMV RNA oppure la sua concentrazione è inferiore al limite di rilevazione (LoD) del saggio.
Invalid - Retest Sample.	Risultato del saggio non valido per un problema con il controllo interno (errata estrazione o presenza di inibitori). Il test deve essere ripetuto.

Note: La quantificazione di CMV RNA è espressa solamente in copie / mL e non può essere correlata alle unità dello Standard Internazionale WHO poiché questo standard è riferito al DNA genomico del CMV.

I campioni segnalati con "Invalid - Retest Sample" dal programma **ELITE InGenius software** non sono utilizzabili ai fini dell'interpretazione del risultato. In tal caso, l'RNA del controllo interno non è stato rilevato in maniera efficace per problemi nella fase di retrotrascrizione, amplificazione o estrazione (degradazione o perdita di RNA durante l'estrazione o presenza di inibitori nell'eluato), che possono essere all'origine di risultati errati.

Quando il volume è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato com'è oppure diluito mediante una sessione di amplificazione in modalità "PCR Only". In caso di un secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota in modalità "Extract + PCR" (estrazione + PCR).

I campioni segnalati come "CMV RNA: RNA Non Rilevato o inferiore a LoD" sono idonei per l'analisi, ma non è stato possibile rilevare il CMV RNA. In tal caso non si può escludere che il CMV RNA sia presente in una concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del saggio (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni positivi per il target CMV RNA ad una concentrazione inferiore al limite di rilevazione (LoD), quando vengono rilevati dal saggio, sono identificati nel report come "CMV RNA: RNA Rilevato, quantità inferiore LLoQ (vedi "Caratteristiche delle prestazioni").

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da personale avente la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile stampare e salvare i risultati della sessione analitica sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

D. Refertazione dei risultati del campione

I risultati della sessione analitica sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati o esportati sotto forma di "Sample Report" e "Track Report".

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

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

Entrambi i rapporti possono essere stampati e firmati da personale autorizzato.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) del kit CMV RNA ELITE MGB è stato definito con i campioni di plasma in associazione al sistema ELITE InGenius.

L' LoD è stato definito mediante analisi di un pannello di campioni di plasma negativo per CMV RNA positivizzati con un materiale di riferimento per CMV RNA (surnatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) a titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizione a partire da 0.56 PFU/mL fino a 0.032 PFU/mL. Ogni livello di diluizione è stato testato in 24 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "estrazione + PCR". L' LoD è stato calcolato mediante analisi di regressione Probit dei dati come concentrazione avente una probabilità del 95% di risultare positiva.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Limite di rilevazione per campioni di plasma ed ELITE InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Limite inferiore	Limite superiore
CMV RNA	0,19 PFU/mL	0,15 PFU/mL	0,29 PFU/mL
	30 copie/mL	N.A.	N.A.

Il valore calcolato di LoD è stato verificato analizzando 30 replicati di campioni di plasma positivizzati con un materiale di riferimento per CMV RNA (surnatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) alla concentrazione dichiarata. Il LoD è confermato se almeno 27 replicati su 30 risultano positivi come da linee guida CLSI standard EP17-A.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Verifica del limite di rilevazione (LoD) per plasma ed ELITE InGenius				
Campione	Titolo	N	Positivo	Negativo
Plasma positivizzato con CMV RNA	0,19 PFU/mL	30	29	1

Il valore di LoD per il target CMV RNA è stato confermato come 0.19 PFU/mL, corrispondente a 30 copie/mL per campioni di plasma.

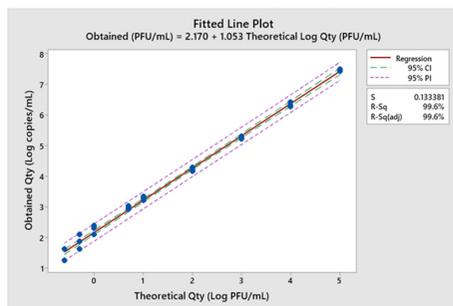
Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare del prodotto CMV RNA ELITE MGB Kit è stato determinato con campioni di plasma in associazione al sistema ELITE InGenius.

L'intervallo di misurazione lineare è stato determinato utilizzando un pannello di diluizioni di materiale di riferimento per CMV RNA (surnatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) in campioni di plasma negativo. Il pannello comprende nove punti di diluizioni da circa 10⁵ PFU/mL a 0.25 PFU/mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

L'analisi dei dati ottenuti, eseguita tramite regressione lineare e analisi polinomiale, ha dimostrato che il saggio mostra una quantificazione lineare per tutte le diluizioni con un coefficiente di correlazione (R2) pari a 0,996.

I risultati della regressione lineare sono illustrati nella figura seguente.



Il limite inferiore di quantificazione (LLoQ) è stato fissato alla concentrazione di LoD che fornisce risultati quantitativi precisi e accurati entro una deviazione standard di ±0,5 Log: 0,19 PFU/mL.

Il limite superiore di quantificazione (ULoQ) è stato fissato alla concentrazione più alta che fornisce risultati quantitativi precisi e accurati entro una deviazione standard di ±0,5 Log: 100.000 PFU/mL.

I risultati finali sono illustrati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare per campioni di plasma EDTA ed ELITE InGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
0,19 PFU / mL	100.000 PFU / mL
30 copies / mL	29.392.000 copies / mL

Inclusività: Efficienza della rilevazione e della quantificazione su differenti genotipi

L'efficienza della rilevazione per differenti genotipi di CMV è stata valutata mediante analisi *in silico* delle sequenze disponibili nei database dei nucleotidi.

L'analisi delle regioni specifiche per l'ibridazione dei primer e della sonda per l'mRNA del gene UL21.5 (spliced mRNA) disponibili nel database ha evidenziato una conservazione delle sequenze e l'assenza di mutazioni significative. Quindi si prevede che la rilevazione e la quantificazione dei differenti genotipi/ceppi di CMV saranno efficienti.

L'inclusività del saggio, intesa come efficienza di rilevazione e quantificazione rispetto a differenti ceppi, è stata verificata analizzando diversi materiali di riferimento (ATCC e Università degli Studi di Torino) che includono i principali ceppi di CMV.

Ogni campione del pannello è stato diluito a bassa concentrazione in campioni negativi di plasma e testato sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	Pos./Rep.	CMV RNA Ct medio	CMV RNA copie/ml medie
AD169	3 / 3	33,79	153
Towne	3 / 3	35,04	57
Davis	3 / 3	33,36	184
Merlin	3 / 3	33,81	142

Tutti i campioni sono stati rilevati correttamente con CMV RNA ELITE MGB Kit ed ELITE InGenius.

Marcatori potenzialmente interferenti: crossreattività

La potenziale crossreattività del saggio con il DNA genomico di CMV e con altri microrganismi è stata valutata mediante analisi *in silico* di sequenze disponibili nei database dei nucleotidi.

Le regioni scelte per l'ibridazione dei primer e della sonda sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di altri microrganismi disponibili nel database. L'analisi delle regioni di ibridazione non ha evidenziato omologie significative con i microrganismi diversi da quello di interesse.

La mancata crossreattività con altri microrganismi che possono essere presenti nei campioni clinici di plasma è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

Campioni di DNA o RNA genomico estratto da marcatori potenzialmente interferenti (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix) sono stati analizzati in concentrazione elevata (almeno 10⁵ copie/reazione) su tre replicati in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only". Al DNA o RNA genomico di ogni microrganismo sono state aggiunte 80.000 copie di controllo interno allo scopo di simulare il campione clinico estratto.

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

ID campione	CMV RNA Pos. / Rep.	IC Ct medio	Esito
HIV1	0 / 3	29,58	Nessuna crossreattività
EBV	0 / 3	29,48	Nessuna crossreattività
HAV	0 / 3	29,72	Nessuna crossreattività
HBV	0 / 3	29,45	Nessuna crossreattività
HHV6	0 / 3	29,35	Nessuna crossreattività
HSV1	0 / 3	29,56	Nessuna crossreattività
HSV2	0 / 3	29,49	Nessuna crossreattività

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

ID campione	CMV RNA Pos. / Rep.	IC Ct medio	Esito
HEV	0 / 3	29,64	Nessuna crossreattività
RSV	0 / 3	29,65	Nessuna crossreattività
VZV	0 / 3	29,60	Nessuna crossreattività
Influenza A virus (H1N1)	0 / 3	29,85	Nessuna crossreattività
Influenza B virus (Florida)	0 / 3	29,71	Nessuna crossreattività
Dengue Virus Type 3	0 / 3	29,62	Nessuna crossreattività
Adenovirus 2	0 / 3	29,89	Nessuna crossreattività
West Nile Virus	0 / 3	29,76	Nessuna crossreattività
Echovirus 4	0 / 3	29,94	Nessuna crossreattività
Parvovirus B19	0 / 3	29,54	Nessuna crossreattività
HCV	0 / 3	29,62	Nessuna crossreattività
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0 / 3	30,19	Nessuna crossreattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 / 3	29,69	Nessuna crossreattività
<i>Candida albicans</i>	0 / 3	29,89	Nessuna crossreattività

Tutti i marcatori potenzialmente interferenti analizzati non hanno evidenziato alcuna crossreattività per il target CMV RNA quando analizzati con il prodotto CMV RNA ELITE MGB® Kit.

Marcatori potenzialmente interferenti: Inibizione

La mancata interferenza con altri microrganismi che possono essere rilevati nei campioni clinici di plasma è stata valutata mediante analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

Campioni di DNA o RNA genomico estratto da marcatori potenzialmente interferenti (ATCC, NIBSC, Zeptomatrix) ad elevata concentrazione (almeno 10⁵ copie/reazione) sono stati positivamente con materiale di riferimento per CMV RNA (surmatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) a bassa concentrazione (circa 20 copie/reazione). A ogni campione sono state aggiunte 80.000 copie di controllo interno allo scopo di simulare il campione clinico estratto. I campioni sono stati analizzati su tre replicati in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only" (solo PCR). I valori medi delle quantità Logaritmiche ottenute (campioni di riferimento e in test) sono stati analizzati e rientrano nell'intervallo accettabile di ±0,5 Log (C. N. Kotton et al., 2018).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

ID campione	CMV RNA Pos. / Rep.	Scostamento della quantificazione	Esito
HIV1	3 / 3	-0,1807	Nessuna interferenza
EBV	3 / 3	-0,1196	Nessuna interferenza
HAV	3 / 3	-0,0964	Nessuna interferenza
HBV	3 / 3	-0,2270	Nessuna interferenza
HHV6	3 / 3	-0,2004	Nessuna interferenza
HSV1	3 / 3	-0,1529	Nessuna interferenza
HSV2	3 / 3	-0,0964	Nessuna interferenza
HEV	3 / 3	-0,1529	Nessuna interferenza
RSV	3 / 3	-0,1784	Nessuna interferenza
VZV	3 / 3	-0,2270	Nessuna interferenza
Influenza A virus (H1N1)	3 / 3	-0,1060	Nessuna interferenza
Influenza B virus (Florida)	3 / 3	-0,2014	Nessuna interferenza
Dengue Virus Type 3	3 / 3	-0,2472	Nessuna interferenza
Adenovirus 2	3 / 3	-0,1682	Nessuna interferenza
West Nile Virus	3 / 3	-0,2382	Nessuna interferenza
Echovirus 4	3 / 3	-0,0253	Nessuna interferenza
Parvovirus B19	3 / 3	-0,1927	Nessuna interferenza
HCV	3 / 3	-0,1666	Nessuna interferenza
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3 / 3	-0,2357	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 / 3	-0,1782	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	3 / 3	-0,0423	Nessuna interferenza

La presenza dei microrganismi potenzialmente interferenti analizzati non ha evidenziato alcuna inibizione dell'amplificazione del target CMV RNA quando analizzati con il prodotto CMV RNA ELITE MGB Kit.

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

Sostanze potenzialmente interferenti: crossreattività

L'effetto di sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato analizzando il pannello "AcroMetrix® Inhibition Panel" (Thermo Fisher Scientific Inc.) di campioni di plasma contenenti sostanze endogene, derivanti da emolisi, ittero e lipemia, e sostanze esogene, EDTA ed eparina.

Inoltre, altre 9 sostanze potenzialmente interferenti, farmaci, sono state testate a concentrazioni significative in campioni di plasma: Azitromicina, Ciclosporina A, Valganciclovir, Cidofovir, Abacavir, Ganciclovir, Foscarnet, Ribavirina e Letemovir.

I campioni sono stati processati in tre replicati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	CMV RNA Pos. / Rep.	IC Ct medio	Esito
Plasma itterico	0 / 3	28,64	Nessuna crossreattività
Plasma lipemico	0 / 3	29,11	Nessuna crossreattività
Sangue emolitico (alto grado)	0 / 3	29,52	Nessuna crossreattività
Sangue emolitico (medio grado)	0 / 3	29,67	Nessuna crossreattività
Sangue emolitico (basso grado)	0 / 3	29,45	Nessuna crossreattività
Plasma eparinato	0 / 3	35,54	Campione non valido
Plasma EDTA	0 / 3	29,16	Nessuna crossreattività
Azitromicina	0 / 3	29,04	Nessuna crossreattività
Ciclosporina A	0 / 3	28,96	Nessuna crossreattività
Valganciclovir	0 / 3	29,37	Nessuna crossreattività
Cidofovir	0 / 3	29,26	Nessuna crossreattività
Abacavir	0 / 3	29,08	Nessuna crossreattività
Ganciclovir	0 / 3	29,26	Nessuna crossreattività
Foscarnet	0 / 3	29,11	Nessuna crossreattività
Ribavirin	0 / 3	28,96	Nessuna crossreattività
Letemovir	0 / 3	29,05	Nessuna crossreattività

Il test ha mostrato che EDTA, emoglobina, trigliceridi, bilirubina, Azitromicina, Ciclosporina A, Valganciclovir, Cidofovir, Abacavir, Ganciclovir, Foscarnet, Ribavirin e Letemovir non inibiscono l'amplificazione di CMV RNA o del Controllo Interno.

L'Eparina si conferma in grado di inibire l'amplificazione di CMV RNA. Tuttavia, grazie al limite di Ct per il controllo interno (IC Ct<32), il campione è risultato "non valido".

Sostanze potenzialmente interferenti: inibizione

La mancata interferenza con altre sostanze potenzialmente interferenti è stata valutata analizzando il pannello "AcroMetrix® Inhibition Panel" (Thermo Fisher Scientific Inc.) di campioni di plasma contenenti sostanze endogene, derivanti da emolisi, ittero e lipemia, e sostanze esogene, EDTA ed eparina.

Inoltre, altre 9 sostanze potenzialmente interferenti, farmaci, sono state testate a concentrazioni significative in campioni di plasma: Azitromicina, Ciclosporina A, Valganciclovir, Cidofovir, Abacavir, Ganciclovir, Foscarnet, Ribavirina e Letemovir.

Campioni di plasma sono stati positivamente con materiale di riferimento per CMV RNA (surmatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) ad una concentrazione pari a 3xLoD (circa 0.60PFU/mL che corrispondono a ~90 copies/mL). I campioni sono stati analizzati su tre replicati in associazione con il sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR". I valori medi delle quantità Logaritmiche ottenute (campioni di riferimento e in test) sono stati analizzati e rientrano nell'intervallo accettabile di ±0,5 Log (C. N. Kotton et al., 2018).

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	CMV RNA Pos. / Rep.	Scostamento della quantificazione	Esito
Plasma itterico	3 / 3	0,0778	Nessuna interferenza
Plasma lipemico	3 / 3	-0,1038	Nessuna interferenza
Sangue emolitico (alto grado)	3 / 3	0,0820	Nessuna interferenza
Sangue emolitico (medio grado)	3 / 3	0,1225	Nessuna interferenza

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

Campione	CMV RNA Pos. / Rep.	Scostamento della quantificazione	Esito
Sangue emolitico (basso grado)	3 / 3	0,0858	Nessuna interferenza
Plasma eparinato	0 / 3	N.A.	Campione non valido
Plasma EDTA	3 / 3	0,0150	Nessuna interferenza
Azitromicina	3 / 3	0,0293	Nessuna interferenza
Ciclosporina A	3 / 3	-0,0581	Nessuna interferenza
Valganciclovir	3 / 3	-0,0956	Nessuna interferenza
Cidofovir	3 / 3	0,0796	Nessuna interferenza
Abacavir	3 / 3	-0,0810	Nessuna interferenza
Ganciclovir	3 / 3	-0,0800	Nessuna interferenza
Foscarnet	3 / 3	0,0565	Nessuna interferenza
Ribavirin	3 / 3	-0,0441	Nessuna interferenza
Letermovir	3 / 3	0,0311	Nessuna interferenza

Il test ha mostrato che EDTA, emoglobina, trigliceridi, bilirubina, Azitromicina, Ciclosporina A, Valganciclovir, Cidofovir, Abacavir, Ganciclovir, Foscarnet, Ribavirin e Letermovir non inibiscono l'amplificazione di CMV RNA o del Controllo Interno.

L'Eparina si conferma in grado di inibire l'amplificazione di CMV RNA. Tuttavia, grazie al limite di Ct per il controllo interno (IC Ct<32), il campione è risultato "non valido" invece che "falso negativo".

Assenza di cross-contaminazione

L'assenza di cross-contaminazione è stata verificata analizzando i risultati di cinque sessioni in cui campioni di plasma negativi per CMV RNA sono stati alternati a campioni di plasma positivamente con materiale di riferimento certificato per CMV RNA (surmatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) alla concentrazione di $\sim 1 \times 10^6$ copie/mL.

Cinque serie di campioni, alternando sei campioni positivi con sei campioni negativi, sono state testate con il sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativo	Positivo
Plasma positivamente con CMV RNA a $\sim 1 \times 10^6$ copie/mL	30	0	30
Plasma CMV RNA negativo	30	30	0

Nessuno dei campioni negativi per CMV RNA ha evidenziato falsi positivi. Non sono state rilevate cross-contaminazioni tra le sessioni, né al loro interno.

Tasso globale di errore del sistema

Il tasso globale di errore del sistema, come frequenza di risultati falsi negativi, è stato verificato analizzando un pannello di campioni positivamente per CMV RNA a basso titolo.

50 differenti campioni di plasma raccolti in EDTA, testati negativi per CMV RNA, sono stati positivamente con un materiale di riferimento certificato per CMV RNA (surmatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 0,60 PFU / mL corrispondenti a ~ 90 copie / mL). I campioni sono stati analizzati sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente.

Campioni	N	Negativi	Positivi
Plasma positivamente con CMV RNA a ~ 90 copie /mL	50	0	50

Nessuno dei campioni positivi per CMV RNA ha evidenziato falsi negativi. In questo test, il tasso globale di errore del sistema è pari allo 0%.

Ripetibilità

La Ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto CMV RNA ELITE MGB Kit in associazione al sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante l'analisi di un pannello di campioni di plasma costituito da un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento per CMV RNA (surmatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 0,60 PFU / mL corrispondenti a ~ 90 copie / mL) e di 10 x LoD (circa 2 PFU / mL corrispondenti a ~ 300 copie / mL).

La Ripetibilità è stata ottenuta mediante l'analisi di ciascun campione del pannello in quattro replicati, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto, in due giorni differenti. Tre lotti di prodotto sono stati utilizzati con lo stesso strumento dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I valori di Ct del target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variazione percentuale (%CV) allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

Le tabelle sottostanti riportano una sintesi dei risultati.

Campione	Ripetibilità intra-sessione							
	CMV RNA				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct medio	StDev	% CV	Pos./Rep.	Ct medio	StDev	% CV
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	27,82	0,23	0,82
3x LoD	8 / 8	33,19	0,43	1,30				
10x LoD	8 / 8	31,69	0,09	0,27				

Campione	Ripetibilità inter-sessione							
	CMV RNA				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct medio	StDev	% CV	Pos./Rep.	Ct medio	StDev	% CV
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	27,93	0,30	1,09
3x LoD	16 / 16	33,19	0,34	1,03				
10x LoD	16 / 16	31,62	0,18	0,56				

Nel test di Ripetibilità, il saggio ha rilevato il target CMV RNA come previsto e ha mostrato un basso coefficiente di variabilità %CV dei valori di Ct inferiore al 5% sia per CMV RNA che per il controllo interno.

Riproducibilità

La Riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto CMV RNA ELITE MGB Kit in associazione al sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante l'analisi di un pannello di campioni di plasma costituito da un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato per CMV RNA (surmatante di coltura di CMV, Università degli studi di Torino) alla concentrazione di 3 x LoD (circa 0,60 PFU / mL corrispondenti a ~ 90 copie / mL) e di 10 x LoD (circa 2 PFU / mL corrispondenti a ~ 300 copie / mL).

La Riproducibilità inter-lotto è stata ottenuta mediante l'analisi di ciascun campione del pannello in quattro replicati, in due sessioni al giorno, un lotto di prodotto al giorno, in due giorni diversi. Tre differenti lotti di prodotto sono stati utilizzati, sullo stesso strumento, e dallo stesso operatore. I campioni sono stati caricati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I valori di Ct del target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità %CV allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

La tabella sottostante riporta una sintesi dei risultati.

Campione	Riproducibilità inter-lotto							
	CMV RNA				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct medio	StDev	% CV	Pos./Rep.	Ct medio	StDev	% CV
Negativo	0 / 48	N.A.	N.A.	N.A.	144 / 144	28,14	0,32	1,13
3x LoD	48 / 48	33,18	0,33	0,99				
10x LoD	48 / 48	31,47	0,31	1,00				

La Riproducibilità inter-strumento è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni del pannello in quattro replicati, in una sessione al giorno, in due giorni diversi per strumento. Tre differenti lotti di prodotto sono stati utilizzati, su tre diversi strumenti, e da tre diversi operatori. I campioni sono stati caricati in posizioni randomizzate sul sistema ELITE InGenius in modalità "Estrazione + PCR".

I valori di Ct del target e del controllo interno sono stati utilizzati per calcolare il coefficiente di variabilità %CV allo scopo di valutare la riproducibilità come imprecisione.

CMV RNA ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

La tabella sottostante riporta una sintesi dei risultati.

Riproducibilità inter-strumento								
Campione	CMV RNA				Controllo interno			
	Pos./Rep.	Ct media	StDev	% CV	Pos./Rep.	Ct media	StDev	% CV
Negativo	0 / 24	N.A.	N.A.	N.A.	72 / 72	28,85	0,28	0,95
3x LoD	24 / 24	34,53	0,56	1,63				
10x LoD	24 / 24	32,28	0,31	0,97				

Nel test di riproducibilità, il saggio ha rilevato il target CMV RNA come previsto e ha mostrato un basso coefficiente di variabilità %CV dei valori di Ct inferiore al 5% sia per CMV RNA che per il controllo interno.

Conferma di campioni negativi

La specificità del saggio, intesa come percentuale di concordanza della negatività dei risultati ottenuti con metodi differenti, è stata valutata analizzando campioni di plasma derivanti da campioni di sangue intero negativi per CMV DNA, testati da un laboratorio esterno con un metodo di riferimento marcato CE IVD (EG SpA).

Ogni campione è stato testato eseguendo l'intera procedura che include estrazione, retrotrascrizione, amplificazione, rilevazione e interpretazione dei risultati mediante impiego di prodotti di ELITechGroup S.p.A. I risultati ottenuti con il prodotto CMV RNA ELITE MGB Kit sono stati analizzati allo scopo di calcolare la percentuale di concordanza della negatività rispetto al metodo di riferimento.

I risultati, dopo l'analisi dei discrepanti, sono riepilogati nella tabella seguente.

Campioni	N	Positivo	Negativo	Specificità
Plasma raccolto da sangue intero CMV DNA negativo	40	0	40	100%

In questo test, tutti i campioni si sono confermati negativi. La specificità del prodotto CMV RNA ELITE MBG Kit è stata pari al 100%.

Per il Controllo Interno è stato definito un cut-off del valore di Ct uguale a 32.

Concordanza tra metodi

La concordanza con un metodo di riferimento è stata valutata analizzando 40 campioni di plasma derivanti da campioni di sangue intero positivi per CMV DNA, provenienti da 12 pazienti sottoposti a terapia antivirale con inibitori del complesso delle terminasi di CMV (Letermovir).

I livelli di CMV DNA dei campioni sono stati testati da un centro esterno con un metodo di riferimento marcato CE IVD (EG SpA).

Come da procedura validata dal laboratorio esterno, questi campioni sono stati inoltre testati per la CMV DNAemia su plasma dopo il trattamento con DNasi (I. Cassaniti et al., 2021). Solo 8 campioni sono risultati positivi al DNA di CMV, mentre 31 campioni sono risultati negativi e 1 campione non valido. I campioni positivi non risentono della digestione da parte della DNasi in quanto hanno il DNA di CMV incapsidato e quindi protetto dall'azione enzimatica.

Gli stessi campioni sono stati testati anche con CMV RNA ELITE MGB Kit. Solo 12 campioni sono risultati positivi al CMV RNA, mentre 26 campioni sono risultati negativi e 2 campioni non validi. I campioni positivi presentano virioni di CMV con mRNA.

I risultati discrepanti sono stati risolti usando la storia clinica dei pazienti e pertanto altri 6 campioni sono stati esclusi.

La concordanza tra il saggio CMV RNA ELITE MGB Kit su plasma e la CMV DNAemia su plasma dopo il trattamento con le DNasi (riferimento) è stata analizzata usando il valore Kappa di Cohen.

Il confronto dopo la risoluzione dei discrepanti è riassunto nella tabella sottostante.

CMV RNA ELITE MGB Kit	CMV DNAemia su plasma trattato con DNasi		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	6	1	7
Negativo	1	24	25
Totale	7	25	32

In questa analisi, il saggio CMV RNA ELITE MGB Kit ha mostrato un'ottima correlazione con il metodo della CMV DNAemia su plasma trattato con DNasi generando un valore di Kappa di Cohen uguale a 0,820.

CMV RNA ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

Un'ulteriore valutazione dei risultati ottenuti con CMV RNA ELITE MGB Kit rispetto alla CMV DNAemia su plasma trattato con DNasi è mostrata nella tabella seguente.

	Risultato
Sensibilità	85,7%
Specificità	96,0%
AUC	93,8%

Il saggio CMV RNA ELITE MGB Kit ha mostrato una concordanza molto buona con il metodo della CMV DNAemia su plasma trattato con DNasi con un'area sottostante la curva (AUC) pari al 93,8%.

BIBLIOGRAFIA

- E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30
- W. D. Rawlinson et al. (1993) *J. Virology* **67**: 5502 - 5513
- Dai et al. (2004) *PNAS* **101**: 16642-16647
- W. A. Bresnahan (2000) *Science* **288**: 2373 - 2376
- A. E. Greijer et al. (2000) *J. Virology* **74**: 9078 - 9082
- E. Terhune et al. (2004) *J. Virology* **78**: 10390 - 10398
- E. Sarcinella et al. (2004) *Virus Research* **104**: 129 - 137
- I. Cassaniti et al. (2021) *Am. J. Transplantat.* **21**: 1622-1628
- C.N. Kotton et al. (2018) *Transplantation* **02**: 900 - 931

LIMITI DELLA PROCEDURA

Utilizzare questo prodotto soltanto con i seguenti campioni clinici: plasma raccolto in EDTA.

Il plasma raccolto in EDTA si può ottenere dal sangue intero conservato a +2/+25 °C per un massimo di 24 ore.

Non utilizzare questo prodotto con plasma raccolto in provette contenenti eparina, perché l'eparina inibisce la reazione di amplificazione degli acidi nucleici e può quindi invalidare i risultati.

Al momento non sono disponibili dati riguardanti le prestazioni del prodotto con altri campioni clinici quali: sangue intero, liquido cefalorachidiano, urina, tamponi salivari, liquido amniotico, lavaggi bronco-alveolari.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Per evitare risultati errati è necessario, pertanto, procedere con cautela durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni per l'uso riportate nel manuale fornito con il prodotto.

La metodica di amplificazione real time utilizzata in questo prodotto ha un'elevata sensibilità analitica che la rende soggetta a contaminazioni da campioni clinici positivi, da controlli positivi e dagli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni possono produrre risultati falsi positivi. Il formato del prodotto è in grado di limitare le cross-contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo attenendosi alle buone prassi di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni riportate nel presente manuale.

Questo prodotto deve essere utilizzato da personale qualificato e addestrato alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede l'uso di dispositivi di protezione individuale e la disponibilità di aree idonee alla manipolazione di campioni biologici potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati come pericolosi al fine di evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede l'uso di dispositivi di protezione individuale e strumenti dedicati alla preparazione delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto deve essere utilizzato da professionisti qualificati e addestrati all'uso di tecniche di biologia molecolare, quali estrazione, amplificazione e rilevazione di acidi nucleici, per evitare risultati errati.

È necessario disporre di aree separate per la preparazione della miscela di reazione completa e per l'estrazione/amplificazione/rilevazione dei prodotti della reazione di amplificazione per prevenire risultati falsi positivi.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'RNA target non è stato rilevato nel RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA target abbia un titolo più basso del limite di rilevabilità del prodotto (vedi "Caratteristiche delle Prestazioni"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Talvolta, i risultati ottenuti con questo prodotto possono non essere validi a causa di un problema di amplificazione del controllo interno. In questo caso il campione dovrà essere analizzato di nuovo, a cominciare dall'estrazione, con conseguente possibile ritardo nel conseguimento dei risultati finali.

Possibili polimorfismi, inserzioni o delezioni nella regione dell' RNA target coperta dai primer e dalle sonde del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione e la quantificazione dell' RNA target.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Reazione non valida con Q-PCR standard o con il controllo positivo	
Curva standard non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore di impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, dei Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, dei Q-PCR standard e del Controllo Positivo.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni (7 ore nell' "Inventory Area"). Non lasciare la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare la RT EnzymeMix a temperatura più alte di -20 °C più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione dei Q-PCR Standard o del Controllo Positivo.	Non utilizzare il Q-PCR standard per più di 4 sessioni indipendenti (2 ore ciascuna nell'area di estrazione). Non utilizzare il Controllo Positivo per più di 4 sessioni indipendenti (3 ore ciascuna nell'area di estrazione). Utilizzare nuove aliquote di Q-PCR standard o di Controllo Positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Reazione non valida del Controllo Negativo	
Possibili cause	Soluzioni
Errore di impostazione della sessione	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del Controllo Negativo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del Controllo Negativo.
Contaminazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione del Controllo Negativo.	Non utilizzare il controllo negativo per più di 1 sessione. Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione dell'area di estrazione, dei rack e degli "Inventory Block".	Pulire le superfici con detergenti acquosi, lavare i camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

Reazione non valida del campione	
Possibili cause	Soluzioni
Errore di impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, del Controllo Interno e del campione. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, del Controllo Interno e del campione.
Errore di preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi dei reagenti utilizzati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni (7 ore nell' "Inventory Area"). Non lasciare la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti. Non lasciare l'RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti. Preparare nuovamente la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del Controllo Interno.	Usare una nuova aliquota of Controllo Interno.
Inibizione dovuta a sostanze interferenti con il campione.	Ripetere la reazione di amplificazione diluendo il campione estratto 1:2 in acqua per biologia molecolare impostando la sessione in modalità "PCR Only". Ripetere l'estrazione diluendo il campione primario 1:2 in acqua per biologia molecolare in una sessione in modalità "Estrazione + PCR".
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica di ELITechGroup S.p.A..

Curva di dissociazione anomala	
Possibili cause	Soluzioni
Assenza di un picco definito. Picco definito ma Tm differenti da quelle degli altri campioni e da quelle del controllo positive.	Controllare che il Ct del target sia inferiore a 30. Elevate quantità del prodotto di amplificazione alla fine della reazione possono interferire con l'analisi della curva di dissociazione. Ripetere l'amplificazione del campione per confermare la presenza del target con una possibile mutazione. Il target nel campione deve essere sequenziato per confermare la mutazione.

Errore nel calcolo del Ct	
Possibili cause	Soluzioni
Concentrazione troppo elevata del target nel campione o campione con anomala forma del plot.	Se nel PCR plot appare un'amplificazione significativa selezionare la corsia relativa al campione e approvare manualmente il risultato come positivo. Se nel PCR plot non appare nessuna amplificazione selezionare la corsia relativa al campione e approvare manualmente il risultato come negativo o lasciarlo invalido. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere la reazione di amplificazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione eluito in una sessione in modalità "PCR Only" (solo PCR) oppure - ripetere l'estrazione con una diluizione 1:10 in acqua per biologia molecolare del campione primario in una sessione in modalità "Extract + PCR" (Estrazione + PCR).

CMV RNA ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e per la real time PCR

REF RTS115ING

LEGENDA DEI SIMBOLI

	Codice articolo.
	Limite superiore di temperatura.
	Codice lotto.
	Da utilizzarsi entro (ultimo giorno del mese).
	Solo per uso di ricerca
	Contenuto sufficiente per "N" test.
	Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.
	Contenuto.
	Conservare al riparo dalla luce del sole.
	Fabbricante.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti fabbricati da Thermo Fisher Scientific e venduti sulla base di accordi di licenza stipulati tra ELITechGroup S.p.A. e le sue affiliate e Thermo Fisher Scientific. Il prezzo d'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili, limitati a utilizzare solo questa quantità di prodotto esclusivamente per attività dell'acquirente direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sulla licenza d'acquisto per questo prodotto per fini diversi da quelli dichiarati sopra, rivolgersi a Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti di rilevazione ELITE MGB® sono coperti da uno o più brevetti U.S.A. numero 6972339, 7112684, 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7582739, 7601851, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 7851606, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8569516, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e da brevetti EP n. 1430147, 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161. Sono state poi presentate domande di brevetto attualmente in attesa di approvazione.

Il "Metodo di rilevazione e quantificazione del Citomegalovirus umano basato su RNA virionici " è coperto dal brevetto Italiano 10202000007357 o è oggetto di domande di brevetto.

La tecnologia ELITE InGenius® è coperta da brevetti o è oggetto di domande di brevetto.

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

ELITe MGB®, il logo ELITE MGB® ed ELITE InGenius® sono marchi registrati di ELITechGroup all'interno dell'Unione Europea

CMV RNA ELITE MGB® Kit

used in association with ELITE InGenius®

Ref: RTS115ING



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

Intended use

The CMV RNA ELITE MGB® Kit product is an *in vitro* reagent intended to be used as part of a quantitative nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the detection and quantification of the human Cytomegalovirus virion mRNA (CMV RNA) extracted from non-cellular specimens.

The assay is tested in association with the ELITE InGenius® instrument, automated and integrated systems for extraction, reverse transcription, real time PCR and results interpretation, using human specimens of Plasma collected in EDTA.

Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	CMV UL21.5 spliced mRNA	FAM	CMV RNA
Internal Control	MS2 phage	AP525	IC

Matrix

- › Plasma EDTA

Kit content

CMV RNA ELITE MGB Kit (RTS115ING)		CMV RNA ELITE Standard (STD115ING)		CMV RNA - ELITE Positive Control (CTR115ING)
 X 4	 X 2	    X 2		 X 3
CMV RNA PCR Mix 4 tubes of 600 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	RT Enzyme Mix 2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	Ready-to-use Calibrators: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 8 sessions per kit 2 set of 4 tubes of 160 µL 4 freeze-thaw cycles		Ready-to-use PC 3 tubes of 160 µL 12 sessions per kit 4 freeze-thaw cycles

Maximum shelf-life: **12 months**

Material required not provided in the kit

- › ELITE InGenius instrument: INT030
- › ELITE InGenius SP 1000 Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS
- › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
- › Filter Tips 300: TF-350-L-R-S

ELITE InGenius protocol

› Sample volume	600 µL	› Unit of quantitative result	copies/mL
› CPE volume	10 µL	› Frequency of controls	15 days
› Total elution volume	50 µL	› Frequency of calibration	60 days
› PCR input volume	20 µL		
› CMV RNA PCR Mix volume	20 µL		

Performance

Matrix	Limit of Detection	Method Agreement	Specificity
Plasma	30 copies / mL (0.19 PFU/mL)	AUC = 93.8% 32 certified samples reference method: "CMV DNAemia on DNase treated plasma"	100% 40 confirmed samples / 40 tested samples reference method: "CMV DNAemia on WB"

Sample preparation

Plasma samples collected in EDTA must be identified according to laboratory guidelines, transported and stored at room temperature (~+25 °C) or at +2 / +8 °C for a maximum of 24 hours. Otherwise, they must be frozen and stored at ~-20 °C for a maximum of one month. For longer periods, storage at ~-70 °C is recommended. Do not use Plasma collected in heparin in order to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, reverse transcription, 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. Log in with username and password. Select the mode "Open". | 2. Verify calibrators: CMV RNA Q-PCR Standard in the "Calibration" menu. Verify controls: CMV RNA Positive Control and CMV RNA Negative Control in the "Controls" menu. <i>Note: Both must have been run, approved and not expired.</i> | 3. Thaw the CMV RNA PCR Mix and the CTR CPE tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec. Keep the RT EnzymeMix in ice. |
|--|---|--|

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	CMV RNA PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL

- 5.** Vortex gently
Spin down 5 sec
Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

- | | | |
|---|--|--|
| 1. Select "Perform Run" on the touch screen | 2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", elution: "50 µL" | 3. Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID |
| 4. Select the "Assay protocol" of interest: CMV RNA ELITE_PL_Op_600_50 | 5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube | 6. Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the inventory block |
| 7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube 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 method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube" | 6. Load the complete reaction mixture in the inventory block |
| 7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid | 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 method "Extraction Only" and set the sample position: Extraction Tube | 6. Load the Internal Control in the inventory block |
| 7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction Tube racks | 8. Close the door
Start the run | 9. Archive the eluate sample |