



0318

Detection and quantification of the Cytomegalovirus genome with Real Time PCR

REV

 ST.RT-12-ENITA.5

REF

 RT-12 - 48 tests

Instructions For Use

INTRODUCTION AND PURPOSE OF USE

The **quany CMV** system is a quantitative test that allows the DNA amplification and quantification, by means of Real Time PCR, of IEA region of CMV genome.

The Procedure allows the detection of the DNA target by means a genomic amplification reaction.

The analysis of the results is made using a Real Time PCR analyzer (thermal cycler integrated with a system for fluorescence detection and a dedicated software).

CONTENT

The kit contains reagents enough to perform 48 amplification tests:

	Quantity	Description
R1	3 x 220 µl	Amplification mMix dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , Taq Polymerase, <i>AmpErase</i> Uracil N-Glycosylase (<i>UNG</i>) Nuclease-free water, ROX (pink Cap)
R2	3 x 130 µl	CMV probes Mix Upstream primer, downstream primer, Target probe (FAM), Inhibition controls (β-globin) Probe (VIC) Nuclease-free water (white Cap)
R3	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the <i>IEA</i> region at the concentration of 10 ⁵ copies/µl
R4	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the <i>IEA</i> region at the concentration of 10 ⁴ copies/µl
R5	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the <i>IEA</i> region at the concentration of 10 ³ copies/µl
R6	3 x 35 µl	Cloned DNA corresponding to the <i>IEA</i> region at the concentration of 10 ² copies/µl
R7	3 x 100 µl	Inhibition control
R8	1 x 30 µl	Negative Control

MATERIALS AND STRUMENTATION REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Disposable latex powder-free gloves or similar material;

Bench microcentrifuge (12,000 - 14,000 rpm);

Micropipettes and Sterile tips with aerosol filter;

Vortex;

Plastic materials (microplate and optical adhesive cover);

Heat block (only for extraction)

EZ1 Advanced XL DSP Virus Card. - Ref. 9018703 - QIAGEN.

ATL Buffer - Ref. 939016 - QIAGEN.

Reagents

The **quany CMV** kit was developed and validated to be used with the following extraction method:

Manual Extraction

Ref. 51304/51306

QIAamp DNA mini kit.

The kit allows the DNA extraction from tested samples. The kit contains reagents for 50/250 samples. (QIAGEN).

Automatic Extraction

Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit

The kit allows the automatic viral DNA from Human samples.

The kit contains reagents for 48 samples. (QIAGEN)

Instruments

The **quany CMV** kit was evaluated to be used with the following instruments:

Extraction System

Ref. 9001492. EZ1 Advanced XL.

Robotic Workstation for the automatic purification of the nucleic acids until 14 samples simultaneously (QIAGEN)

Real Time PCR

The **quany CMV** kit was evaluated to be used with the following real time PCR instruments:

- 7500 Fast from Lifetechnologies
- Versant kPCR AD from Siemens o Stratagene MX3005P/MX3000P
- Rotor-Gene Q MDx from QIAGEN
- CFX96 Real Time PCR System from Bio-Rad
- LightCycler 480 from Roche

Please ensure that the instruments have been installed, calibrated, checked and maintained according to the manufacturer's instruction and recommendations.

SAMPLES

The **quanty CMV** system must be used with extracted DNA from the following biological samples: **Blood EDTA Liquor (Cerebrospinal fluid – CSF) and Urine**. Collected material must be shipped and stored at +2 - +8°C. Store the samples at -20°C if not used within 3 days.

PRECAUTIONS FOR USE

- This kit is for in vitro diagnostics (IVD), for professional use only and not for in vivo use.
- Carefully read this Instruction For Use before using the kit.
- If required, Clonit offers the necessary technical support for the correct use of the kit.
- In compliance with Good Laboratory Practice, define three separate laboratory's areas for: RNA extraction, PCR reaction mix preparation; manipulation of controls provided with the kit. Each area must have dedicated pipettes and laminar flow hood.
- Periodically wipe the working area with 0,5% hypochlorite.
- Wear protective clothing such as laboratory coats and disposable gloves while assaying samples.
- Use powder-free gloves. Do not leave fingerprints on optical caps. Do not write on caps as this may cause an interference with fluorescent detection.
- Avoid any contact between hands and eyes or nose during specimen collection and testing.
- Materials containing or potentially containing infectious agents must always be manipulated in a separated microbiological safety room under a Biohazard biological hood. Waste should be discarded according to local law.
- Never pipette solutions by mouth.
- Use calibrated and regularly checked pipettes and instrumentation only.
- Avoid the air bubbles during the master mix dispensing. Eliminate them before starting amplification.
- Wash hands carefully after handling samples and reagents.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
- Provided reagents are not infectious and hazardous for the health (see Material Safety data Sheet – MSDS).

LIMITS OF THE METHOD

The extreme sensitivity of gene amplification may cause false positives due to cross-contamination between samples and/or controls. Therefore, you should:

- physically separate all the products and reagents used for amplification reactions from those used for other reactions, as well as from post-amplification products
- use tips with filters to prevent cross-contamination between samples
- use disposable gloves and change them frequently
- carefully open test tubes to prevent aerosol formation
- close every test tube before opening another one

As with any diagnostic device, the results obtained with this product must be interpreted taking into consideration all the clinical data and other laboratory tests available for the patient

As with any diagnostic device, with this product there is a residual risk of obtaining invalid, false positives or false negatives results.

Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis.

The proper functioning of the amplification mix depends on the correct collection, correct transportation, correct storage and correct preparation of a biological sample.

WARNINGS

- Read carefully the instructions for use before using this test.
 - Use only extracted DNA from Blood EDTA and/or Liquor (Cerebrospinal fluid – CSF) and/or Urine
- Do not mix reagents from different lots.
- Thaw and carefully mix the reagents of the kit before use.
- The PCR mix has to be freshly prepared every time.

After reconstitution, the amplification master mix must be used in one time (16 reactions). Repeat thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The individual reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.

- Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
- Do not use the product when stored at temperatures other than those indicated on the labels or described in this Instructions For Use.
- In case of spillage of the kit contents, please refer to the specific Material Safety Data Sheet (MSDS, available on request).
- In case of damaged package, contact the technical support before using the kit.
- In case of any serious incident that has occurred in relation to the device, a notice shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

STORAGE AND STABILITY

Store the product **quanty CMV** (IEA region) at -20°C.

The **quanty CMV** kit is shipped on dry ice. The kit components should be frozen.

If one or more components are not frozen upon receipt or if the tubes have been compromised during transport, contact Clonit srl for assistance.

An intact and well stored product has a stability of 18 months from the date of production. Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.

Repeat thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.

ANALYTICAL PROCEDURE

Manual Extraction

Ref. 51304/51306 - *QIAmp DNA mini kit*. (QIAGEN).

Procedure to Whole blood

Follow the instructions inside the kit *QIAmp DNA mini kit*.

Elute the sample in 50 µl of buffer AE

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C.

Procedure to Urine

Ref. 51304/51306 - *QIAmp DNA mini kit* (QIAGEN).

Follow the instructions inside the kit *QIAmp DNA Mini Kit*.

After the lysis step at 56°C, add 5 µl of Inhibition controls.

Follow the instructions in the kit.

Elute the sample in 50 µl of buffer AE.

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C.

Procedure to Liquor (CSF)

Ref. 51304/51306 - *QIAmp DNA mini kit* (QIAGEN).

Follow the instructions inside the kit *QIAmp DNA Mini Kit*.

After the lysis step at 56°C add 5 µl of Inhibition Control to the samples.

Follow the instructions inside the kit

Elute the sample in 50 µl of buffer AE

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C.

Automatic Extraction

Ref. 62724 - EZ1 XL DSP Virus Kit on EZ1 Advanced XL.

Procedure to Whole Blood

Follow the instructions inside the kit EZ1 XL DSP Virus Kit.

Volume of sample to be used:

Whole blood [μ l]	ATL [μ l]	Final volume Samples [μ l]
200	200	400

Preparation of the Carrier

Solve completely the lyophilize RNA carrier in elution buffer (AVE), from 310 μ l, split in aliquots and store to $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Not thawing and freezing the aliquots more than 2 times.

For each analyzed sample, dilute 3,6 μ l of a original solution include the RNA Carrier in total volume of 60 μ l using elution buffer (AVE)

Follow the instructions inside the kit EZ1 XL DSP Virus Kit.

Select the protocol starting from 400 μ l of samples with the elution of 60 μ l.

Procedure to Urine

Before the reaction on EZ1 Advanced XL instrument mix.

Urine [μ l]	ATL [μ l]	final sample volume [μ l]
300	100	400

Preparation of the Carrier and the Inhibition control (Internal)

Solve completely the lyophilize RNA carrier in elution buffer (AVE), from 310 μ l split in aliquots and store to $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Not thawing and freezing the aliquots more than 2 times.

For each analyzed sample, dilute 3,6 μ l of an original solution include the RNA Carrier and 5 μ l of *Inhibition control* in total volume of 60 μ l using elution buffer (AVE)

Follow the instructions inside the kit EZ1 XL DSP Virus Kit.

Select the protocol starting from 400 μ l of samples with the elution of 60 μ l.

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C .

Procedure to Liquor (CSF)

Before the reaction on EZ1 Advanced XL instrument mix.

CSF - Liquor [μ l]
200

Preparation of the Carrier and the Inhibition control (Inhibition control)

Solve completely the lyophilize RNA carrier in elution buffer (AVE), from 310 μ l split in aliquots and store to $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Not thawing and freezing the aliquots more than 2 times.

For each analyzed sample, dilute 3,6 μ l of a original solution include the RNA Carrier and 5 μ l of *Inhibition control* in total volume of 60 μ l using elution buffer (AVE)

Follow the instructions inside the kit EZ1 XL DSP Virus Kit.

Select the protocol starting from 200 μ l of samples with the elution of 60 μ l.

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C .

SOFTWARE SETTING

Lifetechnologies 7500 fast

Turn the instrument and the computer on and open the control software. Click on "**Advance Setup**": by default the software will shows the page "**experiment properties**". Write in the "**experiment name**" the file name, choose the type of instrument (**7500 o 7500fast**), the type of reaction (**quantitation standard curve**), the type of used reagent (**Taqman®Reagents**) and the reaction time of analysis (**Standard $\approx$ 2 hours to complete a run**).

Open the page named "**page setup**" (sheet **Define Target and Samples**).

In the window **Define Targets** set:

Target	Reporter	Quencer
CMV probe:	FAM	TAMRA
IC (β-globin) probe:	VIC	TAMRA

Set the samples' name in the window "**Define Samples**".

In the same page "**plate setup**" select the sheet "**Assign Target and Samples**". On the screen you will see the microplate draft.

Select an area of the plate where the controls will be placed: select wells of the plate and set both targets (CMV and β -globin). Select "**Assign target to selected wells**" in the blank, the "**task Standard (S)**" for CMV target and set the controls' concentration.

Choose an area in the plate where negative control will be placed: select "**Assign target to selected wells**" in the blank, the "**task Negative (N)**" for the CMV target.

Select an area of the plate where samples will be placed: select the wells and set both targets (CMV and β -globin). Link every well to a sample, through the window "**Assign samples to selected wells**".

For each sample, select in the blank "**Assign targets to selected wells**" the "**task UnKnown (U)**" for the CMV target.

Set ROX as passive reference, using it as normalizer of detecting fluorescence.

Open "**Run Method**" (sheet **Graphic View**) and set the right thermal cycling:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

In the window "**Reaction volume plate per well**" set a volume of 25 μ l.

After preparing the plate, and correctly inserting it in the instrument, press the button "**Start Run**".

Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P/MX3000P

Turn the instrument on and wait until both green lamps have fixed light, turn on the computer and start the control software. In the main screen will appear the window "**New Experiment Options**": select "**Experiment type**": **quantitative PCR (Multiple Standard)**.

Turn the lamp on 20 minutes before doing a new experiment. For turning the lamp on, click on the icon of the lamp in the tool bar or select "**Lamp On**" from the menu "**Instruments**".

Verify the right setting of the gain of the fluorescent reporters: in the menu of settings, choose: "**Instrument**" and then "**Filter set gain setting**".

Reporter	Gain
FAM	4
HEX	4
ROX	1

Click on button "**setup**" in the tool bar and choose "**Plate Setup**".

Sign the wells corresponding to calibrators. Define the calibrator's positions in right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Standard	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well, the window "well information" will appear: choose the name of the calibrator.

In the window "Select Quantity", set the concentrations of the 4 calibrators, following the instructions indicated in the paragraph **Interpretation of the results**.

Sign the wells correspondent to Negative control. Define the NTC positions in right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
NTC	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well, the window "well information" will appear: set NTC as the name.

Sign the wells correspondent to the Samples. Define the samples positions in right menu, setting:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
UnKnown	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Clicking on every single well, the window "well information" will appear: set the name or the code of the sample.

It's possible, indeed, set near the name of fluorescent reporter the name of analyzed targets:

FAM	HEX
CMV	β-Globin

In the tool bar choose the sheet "Thermal Profile Setup" and set the correct thermal cycle and reading the fluorescence in the annealing/extension step.

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

After preparing the plate and inserting it in the instrument, press the button "Run", selecting the sheet Thermal profile status and check the correctness of thermal profile.

Select the box **Turn Lamp Off** at the end of execution. Push the button Start: the software will ask you to indicate the name of saved file. The analysis will start.

Rotor-Gene Q MDx

The experiments can be **set using the Quick Start Wizard or the Advanced Wizard**, which appears when the software is started.

Select the wizard "Advanced". As a first step, select the model "Two Step Reaction" with a double click in the "New Run".

In the next window, select the type of rotor installed on the instrument from the list that appears. Check the "Locking Ring Attached", check the checkbox and then click "Next".

Enter the name of the operator and the reaction volume of 25 µl, and then click "Next".

In the next window click on "edit profile". Set the following thermal cycle:

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Select the annealing/extension from the thermal profile and click on "Acquiring A to cycling."

In the next window, select yellow from the available channels and add it to acquiring channel along with the green channel and click "OK". In the next window click on "OK" and then click "Next".

Click on "Edit Gain" button and set the following values for each channel:

Reporter	Gain
Green	5
Yellow	5

To begin the course, click on the button "Start Run". You can save the model before you begin your run by clicking on "Save Template".

After clicking on the button "Start Run" window appears "Save As". The stroke can be saved in the desired position by the user.

Once the run started, the window "Edit Samples" allows you to set the name of samples and controls in the positions in which they were loaded on the instrument.

Select the locations where they were positioned the controls of known concentration and designate them as CMV Standard. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analyzed. Select "Standards". Enter the concentrations of the controls.

Select the location where you placed the Negative Control and name it as Negative Control. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analyzed. Select "Negative Controls".

Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analyzed. Select "UnKnown".

At the end of the operation click "OK" in the "edit samples" and wait until the end of the race for the analysis (see "Interpretation of Results").

CFX96 Real Time PCR

Turn the instrument and the computer on and start the control software. In the principal screen will appear the window "Startup wizard": select "CFX96" and press "ok". In the next window push "create new" and set the thermal protocol and the reaction volume (25µl):

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95° C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Save the protocol and click the next button. The software will open in default the sheet "plate". Click "create new", select "Fluorophores button" to choose fluorophores (FAM and VIC). Select the locations where they were positioned the controls of known concentration and choose the "Sample Type" Standards. Click "Load" check boxes to load fluorophores and type or select Target Name. In the box "load concentration" set the concentrations of the 4 calibrators, following the instructions indicated in the paragraph **Analysis of the results**.

Select the location where you placed the Negative Control. Choose the "Sample Type" NTC. Click "Load" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name

Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Choose the **"Sample Type" Unknown**. Click **"Load"** check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name
Save the plate clicking the next button and start the experiment.

LightCycler 480

Turn the instrument and the computer on and start the control software. In the principal screen, on **"Experiment Creation"** select the **"Plate type"** and push the **"New experiment"** button. The window "experiment" appears. On the "Run protocol" sheet set: Thermal protocol, Reaction volume (25µl) and Detection format (**dual colour hydrolysis probe**).

cycles	denaturation	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Push the **"Subset editor"** button and in this window, select an area of the plate where controls and samples will be placed.

Push the **"Sample editor"** button. Select the correct workflow (Step1: **Abs quantification**), choose the samples Subset created in the step before and insert the name for each well. Choose the correct type for each well: Positive CTR, Negative CTR or Unknown sample.

Push again the **"experiment button"**, insert the plate in the instrument and push **"start run"**.

PREPARATION OF THE REACTIONS:

Thaw a tube of **Amplification mMix**;

Thaw a tube of **CMV probes Mix**;

Mix carefully by vortex **210µl** of **Amplification mMix** and **126µl** of **CMV probes Mix** (the mix as produced is enough to prepare **16 reactions** of amplification: **4 positive controls, 1 negative control and 11 samples**).

For a total number of tests other than 16, prepare a mixture for $n + 1$ tests, following the volumes shown in the table:

Reagent	Description	Volume for single test (µl)
R1 -	Amplification mMix	12,5
R2	CMV probes Mix	7,5

Distribute, in the amplification plate, **20µl** of just reconstituted mix in chosen positions as already set on the instrument software.

Distribute, in the negative control position, **5 µl** of solution taken by the negative control vial.

Distribute, in chosen position for each sample, **5 µl** of corresponding sample.

Distribute, in chosen positions for the positive controls, **5µl** of **10² copies/µl** solution, **10³ copies/µl** solution, **10⁴ copies/µl** solution and **10⁵ copies/µl** solution.

Seal up accurately the plate using an optical adhesive film and verify that there aren't air bubbles in the mix, to avoid the amplification interferences.

For the Rotor-Gene Q MDx, seal each tube with the appropriate cap. The air bubbles presence is not influent; the rotor centrifugal force will allow automatic deletion.

Transfer the plate in the instrument and push the button **"Start Run"**.

QUANTITATIVE ANALYSIS

Lifetechnologies 7500 Fast

At the end of the PCR run, the software automatically opens the **"Analysis"** window in the **"Amplification plot"** sheet on the menu on the left.

Select the wells corresponding to the positive control, negative control and samples for analysis.

Select in the **"Option"** window inside the **"Target"** pop-up menu the **CMV target**. Check the correct setting of the threshold.

Select in the **"Option"** window inside the **"Target"** pop-up menu the **IC Control target**. Check the correct setting of the threshold.

The analysis of the results is made selecting from the menu in the left the page **"Analysis"**. From the page **"Standard Curve"**, maintaining open the sheet **"view well plate"** in the right side of the software select the wells containing the points of the curve and verify the parameters described in the paragraph **"Interpretation of the Results"** (coefficient of correlation, slope ecc...).

From the page **"Amplification Plot"** verify the amplification plot for every single sample.

Opening the sheet **"view well table"** in the right side of the software it is possible to verify the data obtained from experiments: Threshold Cycles, emitted fluorescence and the target quantification expressed in copies/reaction or copies/ml, depending on the settings of the calibration curve.

Clicking from the menu file and selecting the box export, the window **"export properties"** will open. Indicate the file name, select the position to save it (**Browse**) and click on button

"Start export". In this way the software will permit to save a excel file with all the data corresponding to selected experiment.

Versant kPCR AD or Stratagene MX3005P/MX3000P

Click on button **"Analysis"** in the toolbar. The software will open in default the sheet **"Analysis Term Setting"**. Activate the buttons FAM and HEX in the lower part of the screen and select testing samples.

Click on sheet **"results"**; the software will open in default the page **"Amplification plot"**. Check the correct setting of the threshold in the specific window **"Threshold fluorescence"**, in the menu on the right of the screen.

Selecting the box **"Standard Curve"** from menu **"Area to Analyze"** it's possible to visualize the data related to the calibration curve and verify the parameters described in paragraph **"Interpretation of Results"** (coefficient of correlation, slope ecc...). Selecting the box **Text report** from menu **"Area to Analyze"** in the right side of the screen it's possible to verify the data obtained from the experiments: Threshold Cycles, emitted Fluorescences and the target quantification expressed in copies/reaction or copies/ml depending on the settings of the calibration curve.

From the window **Text Report** it's possible to export the results obtained clicking **file, export** on main menu.

Rotor-Gene Q MDx

At the end of the PCR run open the **"Analysis"** window. Select the **"Quantification"** sheet and click on **"cycling A (green)"**.

Select from the menu **"Dynamic Tube"** and subsequently **"Slope correct"**.

Check the correct setting of the threshold in the space provided **"CT calculation – Threshold"**.

Open the **"Analysis"** window. Select the **"Quantification"** sheet and click on **"cycling A (yellow)"**.

Select from the menu **"Dynamic Tube"** and subsequently **"Slope correct"**.

Check the correct setting of the threshold in the space provided **"CT calculation – Threshold"**.

Also in this case, you can print a report of the analysis by clicking on the **"Report"** window and selecting the file in the first **Quantification cycling A (green)** and then the file **cycling A (yellow)**.

CFX96 real time PCR system

At the end of the PCR, select the **"quantitation"** sheet. On the top of the screen, select **"settings"** from the menu and choose **"Baseline Threshold..."**
You can export the report pushing the paper block figure on the top of the screen.

LightCycler 480

When the run is completed select analysis and choose the correct kind of analysis you want: **"Abs Quant/Fit Points"**. Choose the samples subset you want to analyze. Select the **"NoiseBand"** sheet, under the plot you can choose **"NoiseBand (Fluoresc.)"**; and move the line of the NoiseBand on the plot with the mouse of your PC. Repeat this action for each fluorophore using the **"Filter comb"** button.

Clicking the sheet **"Analysis"** you can set the threshold choosing the option "Threshold(manual)".

After setting parameters push the **"Calculate"** button. Repeat this action for each fluorophore.

INTERPRETATION OF RESULTS

Through Real Time PCR reaction it is possible to give the DNA quantification of CMV DNA, with the correct settings of positive controls values, that compose the calibration curve. This setting must consider all the dilutions and the passages that the sample has to be undergone during extraction and amplification steps.

The Ct values obtained from the amplification of 4 controls of known titer are used by the software for the calculation of the calibration curve from which the unknown samples are interpolated.

A proper functioning of the amplification mix can be verified analyzing these parameters:

Parameter	Ref
RTS conc. 10 ⁵ copies/ µl (FAM)	Ct ≤ 25
Correlation Coefficient	0.990 ≤ r ² ≤ 1
Slope	-3,6 ≤ Slope ≤ -3.1
PCR efficiency	90 ≤ efficiency ≤ 110

If the RTS amplification reaction at a concentration of 10⁵ copies produces a Ct > 25 or undetermined the session can't be considered valid and must be repeated.

Verify that the correlation coefficient value (r²), the slope or the reaction efficiency fit to the limited indicated in the above table or do not deviate much from them, which represent the ideal range for a proper PCR reaction.

By correctly setting the standards concentration as a function of the extraction system you can get the quantization of the sample directly in copies / ml:

		Manual Extraction	Automatic Extraction			Alternative extraction
		Ref. 51304/51305 (QIAGEN)	Whole Blood Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit	CSF (Liquor) Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit	Urine Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit	
	RTS 1	25.000.000 copies	30.000.000 copies	30.000.000 copies	20.000.000 copies	500.000 copies
	RTS 2	2.500.000 copies	3.000.000 copies	3.000.000 copies	2.000.000 copies	50.000 copies
	RTS 3	250.000 copies	300.000 copies	300.000 copies	200.000 copies	5.000 copies
	RTS 4	25.000 copies	30.000 copies	30.000 copies	20.000 copies	500 copies

When alternative systems are used sample concentration expressed in copies/ml will be obtained using the formula:

$$copie/ml = \frac{1000}{V_e} \times \frac{E_v}{E_a} \times C_{reaz}$$

where:

- **Ve:** extracted sample Volume expressed in µl
- **Ev:** eluted sample Volume during extraction step expressed in µl
- **Ea:** extracted sample volume used for amplification expressed in µl
- **C_{reaz}:** copies provided by the instrument.

As with any diagnostic device, the results obtained with this product must be interpreted taking in consideration all the clinical data and the other laboratory tests done on the patient.

As with any diagnostic device, with this product there is a residual risk of obtaining invalid, false positives or false negatives results.

The use of positive and negative controls in each amplification session allow to verify the correct functioning of the amplification mix and the absence of any contamination.

In the amplification reaction of each sample, the Ct values for the Inhibition control (β-globin) specific probe are used to validate the analysis session, from extraction process until detection step.

A good extraction performance presents Inhibition control (β-globin) threshold cycle between 22 and 25.

Be sure that emitted fluorescence from Inhibition control amplification has not a Ct > 28 or undetermined. If a sample shows an undetermined CMV DNA and an Inhibition control Ct > 28, this means that there have been problems in the extraction stage or in the amplification stage; therefore, the sample could be a false negative.

Repeat the sample.

It can be considered valid the samples with a Ct > 28 for the Inhibition control, and a high concentration of CMV DNA. In this case, the competitive nature of PCR reaction can hide or disadvantage the Inhibition control amplification.

Detector FAM	Detector VIC/Hex	PCR Run	Sample
Ct undetermined	Ct > 28 or undetermined	Not Valid	repeat
Ct undetermined	Ct < 28	Valid	Negative
High Ct	Ct < 28	Valid	Positive
Low Ct	Ct > 28 or undetermined	Valid	HighPositive

PERFORMANCES

Analytical sensitivity:

It is considered as analytical sensitivity the highest dilution (title) to which a positive sample can be diluted without the system losing the ability to detect with a positivity rate of ≥ 95%. The analytical sensitivity of the system was assessed by analyzing plasmid DNA, quantified by spectrophotometric analysis, containing the genomic regions of interest (IEA region) of the virus in serial dilutions.

The analytical sensitivity of **quany CMV** virus is determined by Probit analysis.

Instrument	Copies/ul	95% confidence interval
7500 FAST	1,989 cps/ul	Inf. 1,273 cps/ul Sup. 16,65 cps/ul
Versant kPCR	2,653 cps/ul	Inf. 1,148 cps/ul Sup. 18,707 cps/ul
Rotorgene Q MDx	0,534 cps/ul	Inf. 0,27 cps/ul Sup. 5,65 cps/ul
Biorad CFX96	2,13 cps/ul	Inf. 0,71cps/ul Sup. 19.94 cps/ul
LightCycler 480	1,54 cps/ul	Inf. 0,64cps/ul Sup. 20.45 cps/ul

The analytical sensitivity of **quany CMV** virus is determined by Probit analysis.

Average A.Sens.	Manual Extraction			Automatic Extraction		
	Whole Blood Cps/ml	CSF Cps/ml	Urine Cps/ml	Whole Blood Cps/ml	CSF Cps/ml	Urine Cps/ml
1,679 cps/ul	420 Cps/ml	420 Cps/ml	420 Cps/ml	500 Cps/ml	500 Cps/ml	330 Cps/ml

Clinical sensitivity:

It is considered as clinical sensitivity the ability to detect true positive samples in the totality of the samples screened as positive. The analysis was made on CMV positive samples and the test was performed following the method recommendations. Positive samples were confirmed with another CE approved method available on the market.

Manual Extraction

N.Sample	Whole Blood	CSF	Urine Cps/ml
Positive	32	10	12
Negative	0	0	0
C. Sensitivity	100%	100%	100%

Automatic Extraction

N.Sample	Whole Blood	CSF	Urine Cps/ml
Positive	10	10	10
Negative	0	0	0
C. Sensitivity	100%	100%	100%

Obtained results show a clinical sensitivity of 100% evaluated on each instrument indicated on instruction for use.

Traceability versus NIBSC controls material

The used standard (NIBSC code 09/162, Version 4.0, Dated 20/03/2012) was established as the 1st WHO International Standard for CMV, with an assigned potency of 5x10⁶ IU/ml when reconstituted in 1 ml of nuclease-free water.

Manual Extraction

	Founded Average Copies/ml	Founded Average IU//ml	Awaited conc IU/ml	Conversion Factor
7500 Fast	14.200.000 (Log ₁₀ 7.15)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	2.84
MX3000P	7.265.000 (Log ₁₀ 6.86)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.453
RotorGene Q	7.077.000 (Log ₁₀ 6.84)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.4154
CFX 96	9.420.000 (Log ₁₀ 6.97)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.884
LightCycler 480	2.830.000 (Log ₁₀ 6.45)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	0.566

Average conversion factor quantity CMV Kit:

$$1.63 \text{ copies/ml} = 1 \text{ IU/ml}$$

Automatic Extraction

	Founded Average Copies/ml	Founded Average IU//ml	Awaited conc IU/ml	Conversion Factor
7500 Fast	7.560.000 (Log ₁₀ 6,88)	5.000.000 (Log ₁₀ 6,7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.512
MX3000P	9.339.000 (Log ₁₀ 6,97)	5.000.000 (Log ₁₀ 6,7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.8678
RotorGene Q	5.647.200 (Log ₁₀ 6,75)	5.000.000 (Log ₁₀ 6,7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.12944
CFX 96	4.824.000 (Log ₁₀ 6,68)	5.000.000 (Log ₁₀ 6,7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	0.9648
LightCycler 480	7.560.000 (Log ₁₀ 6,88)	5.000.000 (Log ₁₀ 6,7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.512

Average conversion factor quantity CMV Kit:

$$1.39 \text{ copies/ml} = 1 \text{ IU/ml}$$

Traceability versus controls material

Cytomegalovirus was checked versus QCMD Cytomegalovirus DNA

Linearity/Proportionality

System linearity is valued analyzing plasmidic DNA (pCM5018), quantified by spectrophotometric analysis, containing the genomic regions of interest (IEA region) of the virus in serial dilutions (1:10) from 100.000 copies to 1 copy of DNA in 5µl of extracted material added in the amplification reaction. The evaluation is performed analyzing 10 calibration curves, that showed these parameters:

RTS conc. 10 ⁵ copies (FAM)	Ct ≤ 25	Medium Ct 23,5254
Correlation Coefficient	0.990 ≤ r ² ≤ 1	Medium r ² 0,998
Slope	-3,6 ≤ Slope ≤ -3.1	Medium slope -3,42
PCR efficiency	90 ≤ Efficiency ≤ 110	Medium Eff 97%

Reproducibility and Repeatability:

The reproducibility and repeatability of the system are valued analyzing 3 dilutions of plasmidic DNA containing the IEA region of interest for CMV quantified by spectrophotometric analysis (pCM5018) and 1 negative control (negative DNA). For each session 5 replicates are made for 3 different sessions, made by different workers, with 3 different lots.

Hypothetical value	Lot	N° repetitions	Med. Reveal. Conc.	Inaccuracy %
100.000 copies	L1	30	85355	19%
100.000 copies	L2	30	77376	11%
100.000 copies	L3	30	76631	10%
100.000 copies	L28	15	100167	11%
100.000 copies	L29	45	349217	14%
100.000 copies	L30	45	323609	11%
100.000 copies	L31	30	266542	22%
1.000 copies	L1	30	746	8%
1.000 copies	L2	30	723	6%
1.000 copies	L3	30	698	5%
1.000 copies	L28	15	976	8%
1.000 copies	L29	45	2779	14%
1.000 copies	L30	45	2835	15%
1.000 copies	L31	30	2930	14%
10 copies	L1	30	5	24%
10 copies	L2	30	4	10%
10 copies	L3	30	4	16%
10 copies	L28	15	10	7%
10 copies	L29	45	27	11%
10 copies	L30	45	29	15%
10 copies	L31	30	32	14%

The medium inaccuracy % is 13%.

Diagnostic Specificity:

For the purposes of this evaluation is considered as diagnostic specificity the skill of the method of determining real negative samples. The diagnostic specificity of the system is valued analyzing human genomic samples tested and confirmed as negative with another disposable system.

Manual Extraction

N.Sample	Whole Blood	CSF	Urine Cps/ml
Positive	1	0	0
Negative	36	10	15
C. Sensitivity	97.2%	100%	100%

Automatic Extraction

N.Sample	Whole Blood	CSF	Urine Cps/ml
Positive	0	0	0
Negative	15	10	15
C. Sensitivity	100%	100%	100%

Analytical Specificity:

Test's specificity was guaranteed by the use of specific primers for CMV.

The alignment of the choose regions for specific primers' hybridization for CMV with available sequences of the IEA region present in database, demonstrated: their conservation, the absence of significative mutations and the complete specificity for the analysed target.

Cross-Reactivity:

To check the cross-reactivity of the assay, samples tested as positive for other herpetic viruses were analyzed following the method instructions.

Positive sample	7500 Fast	KVersant MX3005P	Rotorg-Q	CFX96	Light Cycler
HSV- 1	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HSV- 2	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
VZV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
EBV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-6	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-8	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie

INTERFERENCES

Verify that in the DNA extracted from the sample there is no contamination from mucoproteins and haemoglobin, to exclude possible inhibition of PCR reaction. The interference due to contaminants can be detected through a spectrophotometric analysis, verifying the ratio between the absorbance readings at 260 nm (maximum absorbtion of Nucleic Acids) and 280 nm (maximum absorbtion of Proteins). A pure DNA should have a ratio of approximately 1.8.

QUALITY CONTROL

It is recommended to include in each analytical run, as quality control of every extraction, amplification and detection step, an already tested negative and positive sample, or a reference material with known concentration

In accordance with the Clonit srl ISO EN 13485 Certified quality Management System, each lot of quanty CMV is tested against predetermined specification to ensure consistent product quality.

BIBLIOGRAPHY

D.Lassner, F.Geissler, S. Bosse, J.Hofmann, H.Witzigmann, H.Remke, J.Hauss, O.Wagner. "**Diagnosis and monitoring of acute cytomegalovirus infection in peripheral blood of transplant recipients by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)**". Transpl Int (2000) 13 [Suppl 1]: S366±S371.

Y Tanaka, Y Kanda, M Kami, S Mori, T Hamaki, E Kusumi, S Miyakoshi, Y Nannya, S Chiba, Y Arai, K Mitani, H Hirai, Y Mutou for the Japan Hematology and Oncology. "**Monitoring cytomegalovirus infection by antigenemia assay and two distinct plasma real-time PCR methods after hematopoietic stem cell transplantation**". Bone Marrow Transplantation (2002) 30, 315–319.

P. C. Evans, J. J. Gray, T. G. Wreghitt, R. E. Marcusf- and G. J. M. Alexander. "**Comparison of three PCR techniques for detecting cytomegalovirus (CMV) DNA in serum, detection of early antigen fluorescent foci and culture for the diagnosis of CMV infection**". J. Med. Microbiol. - Vol. 48 (1999), 1029-1035.

S. Marchetti, R. Santangelo, S. Manzara, S. D'onghia, G. Fadda, P. Cattani. "**Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants**". New Microbiologica, 34, 157-164, 2011.

Jacqueline F. Fryer, Alan B. Heath, Rob Anderson, Philip D. **Minor and the Collaborative Study Group "Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays"**. WHO/BS/10.2138

TECHNICAL ASSISTANCE

For any question and support please contact our Technical support:

e-mail: info@clonit.it

phone: +39 02 56814413



0318

quanti CMV

Rilevazione e quantificazione del genoma di Cytomegalovirus mediante Real Time PCR

REV ST.RT-12-ENITA.5

REF RT-12 - 48 tests

Istruzioni per l'uso

INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO

Il prodotto quanti CMV è un saggio quantitativo che consente la rilevazione e la quantificazione, mediante metodica *Real Time PCR*, del genoma di Cytomegalovirus correttamente estratto da campioni biologici.

La procedura prevede il rilevamento del DNA target di interesse mediante una reazione di amplificazione genomica in micropiastra. L'analisi dei risultati viene effettuata tramite uno strumento di Real Time PCR, composto da un thermal cycler provvisto di un sistema di rilevamento della fluorescenza.

COMPOSIZIONE

Il sistema contiene reagenti sufficienti per l'esecuzione di 48 test.

	Quantità	Descrizione
R1	3 x 220 µl	Amplification mMix dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , Taq Polymerase, <i>AmpErase</i> Uracil N-Glycosylase (<i>UNG</i>) Nuclease-free water, ROX (Tappo rosa)
R2	3 x 130 µl	CMV probes Mix Upstream primer, downstream primer, Target probe (FAM), Inhibition controls (β-globina) Probe (VIC) Nuclease-free water (Tappo bianco)
R3	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione IEA a titolo noto 10 ⁵ copie/µl
R4	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione IEA a titolo noto 10 ⁴ copie/µl
R5	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione IEA a titolo noto 10 ³ copie/µl
R6	3 x 35 µl	DNA clonato corrispondente alla regione IEA a titolo noto 10 ² copie/µl
R7	3 x 100 µl	Inhibition controls
R8	1 x 30 µl	Controllo negativo

MATERIALE E STRUMENTAZIONE NECESSARIA MA NON FORNITA

Guanti senza polvere monouso in lattice o simili;
Micropipette e puntali sterili con filtro incorporato per la prevenzione di aerosol;
Vortex;
Materiale plastico monouso sterile (Micropiastra e pellicole ottiche adesive);
Microcentrifuga da banco;
Termoblocco (solo per estrazione manuale)
EZ1 Advanced XL DSP Virus Card. - Ref. 9018703 - QIAGEN.
ATL Buffer - Ref. 939016 - QIAGEN.

Reagenti

Il kit quanti CMV è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti metodi di estrazione:

Estrazione Manuale

Ref. 51304/51306

QIAmp DNA mini kit. Il Sistema consente l'estrazione del DNA dai campioni in esame. Il kit contiene reagenti utili per 50/250 estrazioni (QIAGEN).

Estrazione Automatica

Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit - Il kit permette l'estrazione automatica del DNA virale da campioni umani. Il kit contiene reagenti utili per 48 estrazioni. (QIAGEN).

STRUMENTAZIONE

Il kit quanti CMV è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti

Sistema di Estrazione

Ref. 9001492. EZ1 Advanced XL.

Robotic Workstation per la purificazione automatica degli acidi nucleici fino a 14 campioni simultaneamente (QIAGEN).

Real Time PCR

Il kit quanti CMV è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di real time PCR:

- 7500 Fast fornito da Lifetechnologies
- Versant kPCR AD fornito da Siemens o Stratagene MX3005P/MX3000P
- Rotor-Gene Q MDx fornito da QIAGEN
- CFX96 Real Time PCR System fornito da Bio-Rad
- LightCycler 480 fornito da Roche

Assicurarsi che gli strumenti siano stati correttamente installati, calibrati e controllati con la manutenzione tecnica appropriata in accordo con le istruzioni del produttore.

CAMPIONI

Il prodotto quanti CMV è progettato per essere utilizzato con DNA estratto dai seguenti campioni biologici: **Sangue interno EDTA, Liquor (liquido cerebrospinale - CSF) e Urine**. I campioni raccolti devono essere trasportati e conservati a +2-+8°C ed utilizzati entro 3 giorni dalla data del prelievo. Conservare il campione a -20°C se utilizzato dopo 3 giorni.

PRECAUZIONI D'USO

- Questo kit è per la diagnostica in vitro (IVD), solo per uso professionale e non per uso in vivo.
- Leggere attentamente queste istruzioni per l'uso prima di utilizzare il kit.
- Se richiesto, Clonit offre il supporto tecnico necessario per il corretto utilizzo del kit.
- In conformità con la Buona Pratica di Laboratorio, definire tre aree separate del laboratorio per: estrazione del RNA, preparazione della miscela di reazione PCR; manipolazione dei comandi forniti con il kit. Ogni area deve avere pipette dedicate e cappa a flusso laminare.
- Pulire periodicamente l'area di lavoro con ipoclorito allo 0,5%.
- Indossare indumenti protettivi come camici da laboratorio e guanti monouso durante l'analisi dei campioni.
- Utilizzare guanti senza polvere. Non lasciare impronte sui tappi ottici. Non scrivere sui tappi in quanto ciò potrebbe causare un'interferenza con il rilevamento fluorescente.
- Evitare qualsiasi contatto tra le mani e gli occhi o il naso durante la raccolta e l'analisi dei campioni.
- I materiali contenenti o potenzialmente contenenti agenti infettivi devono essere sempre manipolati in una stanza di sicurezza microbiologica separata sotto una cappa biologica a rischio biologico. I rifiuti devono essere smaltiti secondo la legge locale.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Utilizzare esclusivamente pipette e strumenti calibrati e regolarmente controllati.
- Evitare le bolle d'aria durante l'erogazione della master mix. Eliminarli prima di iniziare l'amplificazione.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area in cui vengono manipolati i campioni e reagenti del kit.
- I reagenti forniti non sono infettivi e pericolosi per la salute (vedere la scheda di sicurezza del materiale – MSDS).

LIMITI DEL METODO

L'estrema sensibilità dell'amplificazione genica può causare falsi positivi a causa della contaminazione incrociata tra campioni e/o controlli. Pertanto, si consiglia di:

- separare fisicamente tutti i prodotti e reagenti utilizzati per le reazioni di amplificazione da quelli utilizzati per le altre reazioni, nonché dai prodotti di post-amplificazione;
- utilizzare puntali con filtri per prevenire la contaminazione incrociata tra i campioni;
- usare guanti monouso e cambiarli frequentemente;
- aprire accuratamente le provette per evitare la formazione di aerosol;
- chiudere ogni provetta prima di aprirne un'altra.

Come per qualsiasi dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i dati clinici e gli altri test di laboratorio disponibili per il paziente.

Come con qualsiasi dispositivo diagnostico, con questo prodotto esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi o falsi negativi. Il trattamento farmacologico può interferire con il risultato finale dell'analisi di biologia molecolare.

Il corretto funzionamento della miscela di amplificazione dipende dalla corretta raccolta, corretto trasporto, corretta conservazione e corretta preparazione di un campione biologico.

I risultati ottenuti utilizzando il prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e laboratoristici legati al paziente. Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi che non può essere eliminato o ridotto ulteriormente.

AVVERTENZE

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare questo test.
 - Utilizzare solo DNA estratto da Sangue intero EDTA e/o Liquor (liquido cerebrospinale – CSF) e/o Urine
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Scongela e mescola accuratamente i reagenti del kit prima dell'uso.
- La miscela PCR deve essere preparata fresca ogni volta.
- Dopo la ricostituzione, la miscela di amplificazione deve essere utilizzata in una sola volta (16 reazioni). Evitare di ripetere lo scongelamento e il congelamento dei reagenti (più di due volte), poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test.
- I singoli reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente.
- Non utilizzare oltre la data di scadenza che appare sull'etichetta della confezione.
- Non utilizzare il prodotto se conservato a temperature diverse da quelle indicate sulle etichette o descritte nelle
- presenti Istruzioni per l'uso.
- In caso di fuoriuscita del contenuto del kit, fare riferimento alla specifica Scheda di Sicurezza del Materiale (MSDS, disponibile su richiesta).
- In caso di pacco danneggiato, contattare il supporto tecnico prima di utilizzare il kit.
- In caso di incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo, deve essere notificato un avviso al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utente e/o il paziente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il prodotto **quany CMV** (IEA region) a -20°C.

Quany CMV viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit dovrebbero arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al ricevimento, o se i tubi sono stati compromessi durante il trasporto, contattare Clonit srl per l'assistenza.

Il prodotto integro e correttamente conservato ha una stabilità di 18 mesi dalla data di produzione. Non utilizzare oltre la data di scadenza riportata sulla scatola.

Il congelamento e scongelamento dei reagenti più di due volte dovrebbe essere evitati, in quanto questo potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente

PROCEDURA ANALITICA

Estrazione Manuale

Ref. 51304/51306 - *QIAmp DNA mini kit*. (QIAGEN).

Procedure da Sangue Intero

Seguire le istruzioni riportate nel kit *QIAmp DNA mini kit*. Eluire il campione 50 µl di buffer AE.

Procedure da Urina

Ref. 51304/51306 - *QIAmp DNA mini kit* (QIAGEN)

Seguire le istruzioni riportate nel kit *QIAmp DNA mini kit*.

Dopo la fase di lisi a 56°C, aggiungere 5 µl di Inhibition control. Seguire le istruzioni riportate nel kit. Eluire il campione 50 µl di buffer AE.

Procedure da CSF (Liquor)

Ref. 51304/51306 - *QIAmp DNA mini kit* (QIAGEN)

Seguire le istruzioni riportate nel kit *QIAmp DNA mini kit*.

Dopo la fase di lisi a 56°C, aggiungere 5 µl di Inhibition control. Seguire le istruzioni riportate nel kit. Eluire il campione 50 µl di buffer AE. Il campione così preparato può essere utilizzato subito oppure conservato a -20°C.

Estrazione Automatica

Ref. 62724 - *EZ1 XL DSP Virus Kit* su strumento *EZ1 Advanced XL*.

Procedure da Sangue Intero

Il presente protocollo è destinato al pretrattamento di campioni di sangue intero prima della purificazione degli acidi nucleici:

Sangue Intero [µl]	ATL [µl]	Volume finale campioni [µl]
200	200	400

Preparazione del Carrier.

Dissolvere completamente il carrier RNA (CARRIER) liofilizzato nel tampone di eluizione (AVE) da 310 µl, dividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservare a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Non congelare-decongelare le aliquote più di 2 volte.

Per ogni campione elaborato, diluire 3,6 µl di una soluzione madre contenente il *carrier RNA* (CARRIER) in un volume totale di 60 µl utilizzando tampone di eluizione (AVE).

Seguire le istruzioni riportate nel manuale del kit EZI® DSP Virus. Selezionare il protocollo partendo da un volume di 400µl di campione iniziale con eluizione finale in 60µl.

Procedure da Urina

Il presente protocollo è destinato al pretrattamento di campioni di urina prima della purificazione degli acidi nucleici:

Urina [µl]	ATL [µl]	Volume finale campioni [µl]
300	100	400

Preparazione del Carrier e del Inhibition control (Inhibition Control)

Dissolvere completamente il carrier RNA (CARRIER) liofilizzato nel tampone di eluizione (AVE) da 310 µl, dividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservare a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Non congelare-decongelare le aliquote più di 2 volte.

Per ogni campione elaborato, diluire 3,6 µl di una soluzione madre contenente il *carrier RNA* (CARRIER) e 5 µl di *Inhibition Control* in un volume totale di 60 µl utilizzando tampone di eluizione (AVE).

Seguire le istruzioni riportate nel manuale del kit EZI® DSP Virus.

Selezionare il protocollo con volume iniziale di campione a 400 µl e volume di eluizione a 60 µl.

Il campione così preparato può essere utilizzato subito oppure conservato a -20°C .

Procedure da Liquor (CSF)

Il presente protocollo è destinato al pretrattamento di campioni di sangue intero prima della purificazione degli acidi nucleici:

CSF - Liquor [µl]
200

Preparazione del Carrier.

Dissolvere completamente il carrier RNA (CARRIER) liofilizzato nel tampone di eluizione (AVE) da 310 µl, dividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservare a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Non congelare-decongelare le aliquote più di 2 volte.

Seguire le istruzioni riportate nel manuale del kit EZI® DSP Virus. Selezionare il protocollo partendo da un volume di 200µl di campione iniziale con eluizione finale in 60µl.

Il campione così preparato può essere utilizzato subito oppure conservato a -20°C .

IMPOSTAZIONI DEL SOFTWARE

Lifetechnologies 7500 fast

Accendere lo strumento, il computer ed avviare il software di controllo. Dalla schermata principale del software cliccare sul bottone "**Advanced Setup**": di default il software vi mostra la pagina "**experiment properties**". Digitare nella finestra "**experiment name**" il nome con il quale verrà salvato l'esperimento. Scegliere il tipo di strumento che si utilizza (**7500 o 7500fast**), scegliere il tipo di esperimento (**quantitation-standard curve**), il tipo di reagenti utilizzati (**Taqman@reagents**) ed il tempo di reazione (**Standard $\approx$ 2 hours to complete a run**).

Aprire la pagina "**page setup**" (sheet **Define Target and Samples**).

Nella finestra "**Define Targets**" impostare:

Target	Reporter	Quencer
CMV probe	FAM	TAMRA
IC (β-globin) probe:	VIC	TAMRA

Nella finestra "**Define Samples**" impostare il nome dei campioni in analisi.

Sempre nella pagina "**plate setup**" selezionare lo sheet "**Assign Target and Samples**": comparirà nella vostra schermata la piastra schematizzata. Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i controlli: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare entrambi i target (CMV e β -globina).

Selezionare nello spazio "**Assign target to selected wells**" il "**task Standard (S)**" per il target CMV ed impostare le concentrazioni dei controlli.

Scegliere una zona della piastra dove verrà posizionato il controllo negativo: selezionare nello spazio "**Assign target to selected wells**" il "**task Negative (N)**" per il target CMV.

Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i campioni: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare entrambi i target (CMV e β -globina).

Associare ad ogni pozzetto un campione in analisi mediante la finestra "**Assign samples to selected wells**".

Selezionare per ciascun campione nell'apposito spazio "**Assign targets to selected wells**" il "**task UnKnown (U)**" per il target CMV.

Impostare come passive reference, utilizzato come normalizzatore della fluorescenza rilevata, il ROX.

Aprire la pagina "**Run Method**" (sheet **Graphic View**) ed impostare il ciclo termico corretto:

cicli	denaturazione	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Nella finestra "**Reaction volume plate per well**" impostare il volume di 25 µl.

Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "**Start Run**".

Rotor-Gene Q MDx

Nuovi esperimenti possono essere impostati utilizzando la procedura guidata di avvio rapido o la procedura guidata avanzata, che appare quando il software viene avviato.

Selezionare la procedura guidata "**Advanced**". Come primo passo, selezionare il modello "**Two Step Reaction**" con un doppio clic nella finestra "**New Run**".

Nella finestra successiva, selezionare il tipo di rotore montato sullo strumento dalla lista che appare. Controllare il "**Locking Ring Attached**", spuntare la casella di controllo e quindi fare clic su "**Avanti**".

Inserire il nome dell'operatore e il volume di reazione di 25 µl e fare clic su "**Avanti**".

Nella finestra successiva fare clic su "**edit profile**". Impostare ciclo termico seguente:

cicli	denaturazione	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Selezionare la fase di annealing/extension dal profilo termico e fare clic su "**Acquiring to cycling A**".

Nella finestra successiva, selezionare il giallo da **available channel** e aggiungerlo a **acquiring channel** insieme al canale verde e fare clic su "**ok**".

Cliccare sul pulsante "Edit Gain" ed impostare i seguenti valori per i due canali interessati:

Reporter	Gain
Green	5
Yellow	5

Nella finestra successiva fare clic su "ok" e poi su "Avanti".

Per avviare la corsa, fare clic sul pulsante "Start Run". E' anche possibile salvare il modello prima di iniziare la corsa facendo clic su "Save Template". Dopo aver fatto clic sul pulsante "Start Run", viene visualizzata la finestra "Save As". La corsa può essere salvata nella posizione desiderata dall'utente. Una volta che la corsa è iniziata, la finestra "Edit Samples" permette di impostare il nome di campioni e controlli nelle posizioni in cui sono stati caricati sullo strumento.

Selezionare le posizioni dove sono stati posizionati i controlli a concentrazione nota e nominarli come **CMV Standard**. Cliccando sulla casellina "Type" corrispondente, nel menu a tendina "Samples" è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "Standards". **Inserire le concentrazioni dei controlli.**

Selezionare la posizione dove è stato posizionato il controllo Negativo e nominarla come **Negative Control**. Cliccando sulla casellina "Type" corrispondente, nel menu a tendina "Samples" è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "Negative Controls".

Selezionare la posizione di ogni singolo campione ed inserire il nome o il codice del paziente. Cliccando sulla casellina "Type" corrispondente, nel menu a tendina "Samples" è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "Unknown".

Al termine delle operazioni cliccare "OK" nella finestra "edit samples" e attendere il termine della corsa per l'analisi (vedi "Interpretazione dei risultati").

Versant kPCR AD o Stratagene MX3005P/MX3000P

Accendere lo strumento ed attendere che le due lampade verdi abbiano luce fissa, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale del software apparirà la finestra di dialogo "New Experiment Options": selezionare "Experiment type: quantitative PCR (Multiple Standard)".

Accendere la lampada almeno 20 minuti prima di eseguire un nuovo esperimento. Per accendere la lampada cliccare sull'icona lampada dalla barra degli strumenti o selezionare "Lamp On" dal menù "Strumenti".

Verificare la corretta impostazione dei guadagni dei reporter fluorescenti: Nel menù di impostazione scegliere "Instrument" e quindi "Filter set gain setting".

Reporter	Gain
FAM	4
JOE/HEX	4
ROX	1

Cliccare sul pulsante "setup" nella barra degli strumenti e scegliere lo sheet "Plate Setup".

Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai calibratori. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Standard	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo "well information" in cui sarà possibile impostare il nome del calibratore. Nella finestra "Select Quantity" impostare le concentrazioni dei 4 calibratori seguendo le istruzioni indicate nel paragrafo **Analisi dei Risultati**.

Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai controlli negativi. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
NTC	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo "well information" in cui sarà possibile impostare NTC come nome.

Contrassegnare i pozzetti corrispondenti ai campioni clinici. Definire le posizioni del calibratore nel menù di destra impostando:

Well type:	Collect Fluorescent Data:	Reference Dye:	Replicate Symbol:
Unknown	FAM/HEX/ROX	ROX	None

Cliccando su ogni singolo pozzetto apparirà la finestra di dialogo "well information" in cui sarà possibile impostare il nome o il codice del campione clinico.

Selezionare i pozzetti in analisi e Impostare, accanto al nome dei fluorofori, il nome del target in analisi:

FAM	HEX
CMV	β-Globin

Nella barra degli strumenti scegliere lo sheet "Thermal Profile Setup" ed impostare il ciclo termico corretto:

cicli	denaturazione	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "Run", selezionare lo sheet Thermal profile status e controllare la correttezza del profilo termico. Selezionare la casella **Turn Lamp Off** alla fine dell'esecuzione nella finestra di dialogo. Premere il pulsante **start**: il software vi chiederà di indicare il nome con cui salvare il file e avvierà l'analisi.

CFX 96 Real Time PCR

Accendere lo strumento, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale del software apparirà "Startup wizard": selezionare "CFX96" e cliccare il bottone "ok". Nella schermata successiva premere "create new" ed impostare il protocollo termico ed i volumi di reazione (25µl):

cicli	denaturazione	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Salvare il protocollo termico e cliccare "Next". Il software aprirà automaticamente la pagina "Plate". Premere "create new", premere il bottone "Fluorophores button" per selezionare i fluorofori corretti (FAM and VIC). Selezionare i pozzetti contenenti i controlli a concentrazione nota e scegliere dal menù a tendina "Sample Type": Standards. Cliccare "Load check boxes" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. Nella finestra "load concentration" impostare le concentrazioni dei 4 calibratori seguendo le istruzioni indicate nel paragrafo **Interpretazione dei Risultati**. Selezionare i pozzetti contenenti il controllo negativo e scegliere dal menù a tendina "Sample Type": NTC. Cliccare "Load check boxes" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. **Selezionare i pozzetti contenenti i campioni in esame e scegliere dal menù a tendina "Sample Type": Unknown. Cliccare "Load check boxes" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. Salvare la piastra cliccando il pulsante "Next" e, non appena preparata la piastra ed averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "Start Run".**

LightCycler 480

Accendere lo strumento, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale selezionare "Plate type" in "Experiment Creation" e premere il pulsante "New experiment". Appare la finestra "experiment". Nella schermata "Run protocol" impostare: Profilo termico, volume di reazione (25µl) e il Detection format (dual colour hydrolysis probe).

cicli	denaturazione	annealing/extension
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
45	95° C 15 sec	60° C 1 min

Premere il pulsante "**Subset editor**" e selezionare, in questa finestra, un'area della piastra dove verranno posizioni i controlli e i campioni. Premere il pulsante "**Sample editor**" e selezionare il corretto workflow (Step1: **Abs quantification**), scegliere il "samples Subset" creato nello step precedente e inserire i nomi in ogni pozzetto. Selezionare il corretto tipo per ogni pozzetto: Controllo Positivo, Controllo Negativo o Unknown sample. **Premere ancora il pulsante "experiment button", e, non appena preparata la piastra ed averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "Start Run".**

ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI:

Scongelerare una provetta di **Amplification mMix**;

Scongelerare una provetta di **CMV probes Mix**;

Miscelare accuratamente mediante vortex **210µl** di **Amplification mMix** e **126µl** di **CMV probes Mix** (la miscela così prodotta è sufficiente per l'esecuzione di **16 reazioni** di amplificazione: **4 controlli positivi, 1 controllo negativo ed 11 campioni**).

Per un numero totale di test diverso da 16, preparare una miscela per n+1 test, seguendo i volumi riportati in tabella:

Reagente	Descrizione	Volume per singolo Test (µl)
R1	Amplification mMix	12,5
R2	CMV probes Mix	7,5

Dispensare, nella piastra di amplificazione, **20 µl della miscela appena ricostituita** nelle posizioni prescelte e già predisposte sul software dello strumento.

Dispensare, nella posizione del controllo negativo, **5 µl** di soluzione prelevata dalla vial **controllo negativo**.

Dispensare, nelle posizioni predefinite per ciascun campione, **5 µl** del **campione corrispondente**.

Dispensare, nelle posizioni predisposte per i controlli positivi, **5 µl** di soluzione **10² copie/µl, 10³ copie/µl, 10⁴ copie/µl e 10⁵ copie/µl**.

Sigillare accuratamente la piastra mediante l'utilizzo di optical adhesive film e verificare che, nella miscela, non vi siano bolle d'aria che possano interferire con l'amplificazione.

Per il Rotor-Gene Q MDx, sigillare ogni tubo con il tappo appropriato. La presenza di bolle d'aria non interferisce con l'amplificazione; la forza centrifuga del rotore consente l'eliminazione automatica.

Trasferire la piastra nello strumento e premere il pulsante "**Start Run**".

ANALISI QUANTITATIVA

Lifetechnologies 7500 Fast

Al termine della corsa di PCR, il software apre automaticamente la finestra "**Analysis**" nella sezione "**Amplification plot**" posta nel Menu a sinistra.

Selezionare dalla piastra i pozzetti corrispondenti ai controlli positivi, al controllo negativo ed ai campioni in analisi.

Selezionare nella finestra "**Option**" il Menu a tendina "**Target**" e impostare **CMV**. Controllare il corretto settaggio del threshold.

Selezionare nella finestra "**Option**" il Menu a tendina "**Target**" e impostare **IC Control**. Controllare il corretto settaggio del threshold.

L'analisi dei risultati si gestisce selezionando nel menù a sinistra la pagina "**Analysis**". Dalla sottopagina "**Standard Curve**", mantenendo aperta nella parte destra del software lo sheet "**view well plate**", selezionare i pozzetti contenenti i punti della curva e verificare i parametri descritti nel paragrafo "**Interpretazione dei Risultati**" (coefficiente di correlazione, slope ecc...).

Dalla sottopagina "**Amplification Plot**" verificare le curve di amplificazione di ogni singolo campione.

Apprendo lo sheet "**view well table**" nella parte destra del software è possibile verificare i dati ottenuti dagli esperimenti: Threshold Cycles, Fluorescenze emesse e ovviamente la Quantificazione del target espressa in copie/reazione o copie/ml in funzione di come è stata impostata la curva di calibrazione.

Cliccando dal menù **file** e selezionando il comando **export** si aprirà la finestra "**export properties**". Indicare il nome del file, selezionare la posizione in cui salvarlo (**Browse**) e cliccare il pulsante "**Start export**". In questo modo il software consentirà di salvare un file excel con tutti i dati relativi all'esperimento selezionato.

Rotor-Gene Q MDx

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "**Analysis**". Selezionare lo sheet "**Quantification**" e fare doppio clic spuntando la voce "**cycling A (green)**".

Cliccare il tasto "**Dynamic Tube**" e successivamente "**Slope correct**".

Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "**CT calculation – Threshold**".

Aprire nuovamente la finestra "**Analysis**". Selezionare lo sheet "**Quantification**" e fare doppio clic spuntando la voce "**cycling A (yellow)**".

Cliccare il tasto "**Dynamic Tube**" e successivamente "**Slope correct**".

Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "**CT calculation – Threshold**".

Anche in questo caso è possibile stampare un report dell'analisi cliccando sulla finestra "Report" e selezionando nella sezione Quantification prima il file **cycling A (green)** e successivamente il file **cycling A (yellow)**.

Versant kPCR AD o Stratagene MX3005P/MX3000P

Fare clic sul pulsante "**Analysis**" nella barra degli strumenti. Il software aprirà di default lo sheet "**Analysis Term Setting**". Attivare i pulsanti FAM e JOE/HEX nella parte inferiore dello schermo e selezionare i campioni in esame.

Selezionare dalla piastra i pozzetti corrispondenti ai controlli positivi, al controllo negativo ed ai campioni in analisi.

Cliccare lo sheet "**Results**"; il software aprirà di default la pagina "**Amplification plot**". Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposita finestra "**Threshold fluorescence**".

Spuntando la casella "**Standard Curve**" dal menù "**Area to Analyze**" è possibile visualizzare i dati inerenti alla curva di calibrazione verificandone i parametri descritti nel paragrafo "**Interpretazione dei Risultati**" (coefficiente di correlazione, slope ecc...). Spuntando la casella "**Text report**" dal menù "**Area to Analyze**" nella parte destra del software è possibile verificare i dati ottenuti dagli esperimenti: Threshold Cycles, Fluorescenze emesse e ovviamente la Quantificazione del target espressa in copie/reazione o copie/ml in funzione di come è stata impostata la curva di calibrazione.

Dalla finestra Text Report è possibile esportare i risultati ottenuti cliccando dal menù principale il comando **file, export**

CFX96 Real Time PCR System

Alla fine della reazione di PCR, selezionare lo sheet "**quantitation**". Nella parte alta dello schermo, selezionare "**settings**" dal menù e scegliere "**Baseline Threshold...**". È possibile esportare il report cliccando sulla figura block notes posta nella parte superiore dello schermo.

LightCycler 480

Quanto la corsa è terminata, selezionare "analysis" e scegliere la corretta tipologia di analisi che si vuole: "**Abs Quant/Fit Points**".

Selezionare il corretto "samples subset" che si vuole analizzare. Selezionare la finestra "**NoiseBand**", sotto il plot si può scegliere "**NoiseBand (Fluoresc.)**"; e posizionare la linea della NoiseBand sul plot con il mouse del PC. Ripetere quest'azione per ogni fluoroforo utilizzando il pulsante "**Filter comb**". Cliccando sulla finestra "**Analysis**" si possono settare i threshold selezionando l'opzione "Threshold (manual)".

Dopo aver settato i parametri premere "**Calculate**". Ripetere per ogni fluoroforo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Grazie alla reazione di Real Time PCR è possibile fornire la quantificazione del DNA di CMV mediante la corretta impostazione dei valori dei controlli positivi che costruiscono la curva di calibrazione. Tale impostazione deve considerare tutte le diluizioni ed i passaggi che il campione subisce durante le fasi d'estrazione e di amplificazione. I valori dei Ct ottenuti dall'amplificazioni dei 4 controlli a titolo noto vengono utilizzati dal software per il calcolo della curva di calibrazione su cui vengono interpolati i campioni incogniti.

Un corretto funzionamento della miscela di amplificazione può essere verificato analizzando i seguenti parametri:

Parametro	Riferimento
RTS conc. 10 ⁵ copie/µl (FAM)	Ct ≤ 25
Coefficiente di correlazione	0.990 ≤ r ² ≤ 1
Slope	-3,6 ≤ Slope ≤ -3,1
Efficienza di PCR	90 ≤ Efficienza ≤ 110

Se il risultato della reazione di amplificazione del RTS alla concentrazione di 10^5 copie produce un Ct > 25 o undetermined la sessione non può considerarsi valida e quindi deve essere ripetuta.

Verificare che i valori del coefficiente di correlazione (r^2), della slope, e quindi dell'efficienza di reazione, rientrino nei limiti indicati in tabella o comunque non si discostino di molto da essi, i quali rappresentano i range ideali per una corretta reazione di PCR.

Impostando correttamente le concentrazioni degli standard in funzione del sistema di estrazione è possibile ottenere la quantizzazione del campione direttamente in copie/ml:

		Estrazione Manuale	Estrazione Automatica			Estrazione Alternativa
		Ref. 51304/51305 (QIAGEN)	Whole Blood Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit	CSF (Liquor) Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit	Urine Ref. 62724. EZ1 XL DSP Virus Kit	
	RTS 1	25.000.000 copies	30.000.000 copies	30.000.000 copies	20.000.000 copies	500.000 copies
	RTS 2	2.500.000 copies	3.000.000 copies	3.000.000 copies	2.000.000 copies	50.000 copies
	RTS 3	250.000 copies	300.000 copies	300.000 copies	200.000 copies	5.000 copies
	RTS 4	25.000 copies	30.000 copies	30.000 copies	20.000 copies	500 copies

Nel caso in cui vengano utilizzati sistemi di estrazione alternativi la concentrazione del campione espressa in copie/ml potrà essere ricavata utilizzando la formula seguente:

$$\text{copie/ml} = \frac{1000}{V_e} \times \frac{E_v}{E_a} \times C_{\text{reaz}}$$

dove:

- **Ve:** Volume del campione estratto
- **Ev:** Volume in cui il campione viene eluito durante la fase di estrazione
- **Ea:** Volume di campione estratto utilizzato per l'amplificazione
- **Creaz:** copie fornite dallo strumento.

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

L'utilizzo del controllo positivo e negativo all'interno di ogni sessione di amplificazione consente di verificare il corretto funzionamento della miscela e l'assenza di possibili contaminazioni.

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun campione, i valori di Ct della sonda specifica per il Inhibition control (β -globina) vengono utilizzati per convalidare la sessione d'analisi a partire dal processo di estrazione sino alla fase di detection. Assicurarsi che la fluorescenza emessa dall'amplificazione del Inhibition control non presenti un Ct > 28 o undetermined.

Una buona estrazione mostra un Inhibition control (β -globin) con Ct compreso tra 22 e 25.

Se un campione presenta CMV DNA undetermined e Ct del Inhibition control > 28 significa che si sono verificati problemi nella fase di estrazione o nella fase di amplificazione e quindi il campione potrebbe essere un falso negativo.

Ripetere il campione.

Possono essere considerati validi i campioni che presentano un Ct > 28, per quanto riguarda il Inhibition control, ed una concentrazione di CMV DNA elevata. In questo caso, la natura competitiva della reazione di PCR può nascondere o sfavorire l'amplificazione del Inhibition control.

Detector FAM	Detector VIC/Hex	PCR Run	Sample
Ct undetermined	Ct > 28 or undetermined	Not Valid	repeat
Ct undetermined	Ct < 28	Valid	Negative
High Ct	Ct < 28	Valid	Positive
Low Ct	Ct > 28 or undetermined	Valid	High Positive

CARATTERISTICHE FUNZIONALI

Sensibilità analitica:

Ai fini della presente valutazione, viene considerata sensibilità analitica la maggiore diluizione (titolo) a cui un campione positivo può essere diluito senza che il sistema perda la capacità di rilevarlo come positivo con un rate $\geq 95\%$. La sensibilità analitica del sistema è stata valutata analizzando DNA plasmidico (CMV), quantificato mediante analisi spettrofotometrica, contenente la regione genomica di interesse (IEA region) del virus in diluizioni scalari. La sensibilità analitica per **quanty CMV** virus è stata determinata mediante analisi Probit

Strumento	Copies/ul	Intervallo confidenza 95%
7500 FAST	1,989 cps/ul	Inf. 1,273 cps/ul Sup. 16,65 cps/ul
Versant kPCR	2,653 cps/ul	Inf. 1,148 cps/ul Sup. 18,707 cps/ul
Rotorgene Q MDx	0,534 cps/ul	Inf. 0,27 cps/ul Sup. 5,65 cps/ul
Biorad CFX96	2,13 cps/ul	Inf. 0,71cps/ul Sup. 19.94 cps/ul
LightCycler 480	1,54 cps/ul	Inf. 0,64cps/ul Sup. 20.45 cps/ul

La sensibilità analitica per **quanty CMV** virus è stata determinata mediante analisi Probit

Media A.Sens.	Estrazione Manuale			Estrazione Automatica		
	Sangue Intero Cps/ml	CSF Cps/ml	Urine Cps/ml	Sangue Intero Cps/ml	CSF Cps/ml	Urine Cps/ml
1,679 cps/ul	420 Cps/ml	420 Cps/ml	420 Cps/ml	500 Cps/ml	500 Cps/ml	330 Cps/ml

Sensibilità clinica:

Ai fini della presente valutazione viene considerata sensibilità clinica la capacità di determinare veri positivi sulla totalità di campioni positivi screenati. L'analisi è stata effettuata su campioni positivi per CMV ed il test è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nella metodica. I campioni positivi sono stati confermati con un altro sistema marcato CE presente in commercio.

Estrazione Manuale

N.Campioni	Sangue Intero	CSF	Urine Cps/ml
Positivi	32	10	12
Negativi	0	0	0
C. Sensitivity	100%	100%	100%

Estrazione Automatica

N.Campioni	Sangue Intero	CSF	Urine Cps/ml
Positivi	10	10	10
Negativi	0	0	0
C. Sensitivity	100%	100%	100%

I risultati ottenuti mostrano una sensibilità clinica del 100% valutata su ciascuno strumento indicato sulle istruzioni d'uso.

Tracciabilità verso materiale di controllo NIBSC

Lo standard utilizzato (NIBSC code 09/162, Version 4.0, Dated 20/03/2012) è stato dichiarato come il 1° WHO International Standard per CMV: Al presente standard, se ricostituito in 1 ml di acqua nuclease free è stata assegnata una concentrazione di 5×10^6 IU/ml.

Estrazione Manuale

	Media Trovata Copie/ml	Media Trovata IU//ml	Risultato Atteso IU/ml	Fattore di conversione
7500 Fast	14.200.000 (Log ₁₀ 7.15)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	2.84
MX3000P	7.265.000 (Log ₁₀ 6.86)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.453
RotorGene Q	7.077.000 (Log ₁₀ 6.84)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.4154
CFX 96	9.420.000 (Log ₁₀ 6.97)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.884
LightCycler 480	2.830.000 (Log ₁₀ 6.45)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	0.566

Fattore di conversione medio per quanty CMV Kit:

$$1.63 \text{ copie/ml} = 1 \text{ IU/ml}$$

Estrazione Automatica

	Media Trovata Copie/ml	Media Trovata IU//ml	Risultato Atteso IU/ml	Fattore di conversione
7500 Fast	7.560.000 (Log ₁₀ 6.88)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.512
MX3000P	9.339.000 (Log ₁₀ 6.97)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.8678
RotorGene Q	5.647.200 (Log ₁₀ 6.75)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.12944
CFX 96	4.824.000 (Log ₁₀ 6.68)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	0.9648
LightCycler 480	7.560.000 (Log ₁₀ 6.88)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	5.000.000 (Log ₁₀ 6.7)	1.512

Fattore di conversione medio per quanty CMV Kit:

$$1.39 \text{ copie/ml} = 1 \text{ IU/ml}$$

Tracciabilità verso materiale di controllo

Cytomegalovirus è stato valutato utilizzando QCMD Cytomegalovirus DNA.

Linearità/Proporzionalità

La linearità del sistema è stata valutata analizzando DNA plasmidico (pCM5018), quantificato mediante analisi spettrofotometrica, contenente la regione genomica di interesse (IEA region) del virus in diluizioni scalari (1:10) da 100.000 copie a 100 copie di DNA nei 5µl di estratto aggiunto alla reazione di amplificazione. La valutazione è stata effettuata analizzando 10 curve di calibrazione che hanno mostrato tutte i seguenti parametri:

RTS conc. 10^5 copie (FAM)	Ct ≤ 25	Ct medio 23,5254
Coefficiente di correlazione	$0.990 \leq r^2 \leq 1$	r^2 medio 0.998
Slope	$-3,6 \leq \text{Slope} \leq -3.1$	slope. media -3.42
Efficienza di PCR	$90 \leq \text{Efficienza} \leq 110$	Eff. media 97%

Riproducibilità e Ripetibilità:

La Riproducibilità e la Ripetibilità del sistema sono state valutate analizzando 3 diluizioni di DNA plasmidico contenente la regione IEA di interesse di CMV e quantificata mediante analisi spettrofotometrica (pCM5018) ed 1 controllo negativo (DNA negativo). Vengono eseguiti 5 replicati per ogni sessione per 3 sessioni differenti eseguite da operatori differenti su 3 lotti diversi.

Concentrazione	Lot	N° ripetizioni	Conc. Media rilevata	Inaccuratezza %
100.000 copie	L1	30	85355	19%
100.000 copie	L2	30	77376	11%
100.000 copie	L3	30	76631	10%
100.000 copie	L28	15	100167	11%
100.000 copie	L29	45	349217	14%
100.000 copie	L30	45	323609	11%
100.000 copie	L31	30	266542	22%
1.000 copie	L1	30	746	8%
1.000 copie	L2	30	723	6%
1.000 copie	L3	30	698	5%
1.000 copie	L28	15	976	8%
1.000 copie	L29	45	2779	14%
1.000 copie	L30	45	2835	15%
1.000 copie	L31	30	2930	14%
10 copie	L1	30	5	24%
10 copie	L2	30	4	10%
10 copie	L3	30	4	16%
10 copie	L28	15	10	7%
10 copie	L29	45	27	11%
10 copie	L30	45	29	15%
10 copie	L31	30	32	14%

L'inaccuratezza % media risulta essere del 13%

Specificità Diagnostica:

Ai fini della presente valutazione viene considerata specificità diagnostica la capacità del metodo di determinare campioni veri negativi. La specificità diagnostica del sistema è stata valutata analizzando campioni genomici umani testati e confermati negativi con un altro sistema presente in commercio.

Estrazione Manuale

N.Campioni	Sangue Intero	CSF	Urine Cps/ml
Positivi	1	0	0
Negativi	36	10	15
C. Sensitivity	97.2%	100%	100%

Automatic Extraction

N.Campioni	Sangue Intero	CSF	Urine Cps/ml
Positivi	0	0	0
Negativi	15	10	15
C. Sensitivity	100%	100%	100%

Specificità Analitica:

La specificità del test è garantita dall'utilizzo di primers specifici per la determinazione di CMV.

L'esame di allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione dei primers specifici per CMV con le sequenze disponibili in banca dati della regione IEA ha dimostrato la loro conservazione, l'assenza di mutazioni significative e la completa specificità per il target analizzato.

Cross-Reattività:

E' stata inoltre effettuata un'analisi su campioni positivi per altri virus erpetici ed il test è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nella metodica.

Campioni Positivi	7500 Fast	KVersant MX3005P	Rotorg-Q	CFX96	Light Cyclor
HSV- 1	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HSV- 2	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
VZV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
EBV	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-6	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie
HHV-8	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie	<10copie

INTERFERENZE

Verificare che nel DNA estratto dal campione di partenza non vi siano presenti mucoproteine ed emoglobina in modo da escludere eventuali inibizioni nella reazione di PCR. L'interferenza dovuta a contaminanti può essere evidenziata mediante l'analisi spettrofotometrica e rapporto dei dati ottenuti a 260 nm (Assorbimento massimo Acidi Nucleici) e 280 nm (Assorbimento massimo Proteine). Un DNA puro dovrebbe avere un rapporto di circa 1.8.

CONTROLLO QUALITA'

Si consiglia inoltre di inserire come controllo di qualità interno di ciascuna sessione di estrazione, amplificazione e rilevamento un campione negativo ed un campione positivo già testati in precedenza o materiale di riferimento a titolo noto.

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Clonit srl, ogni lotto di **quany CMV** è stato testato contro specifiche predeterminate al fine di garantire una qualità costante del prodotto

BIBLIOGRAFIA

D.Lassner, F.Geissler, S. Bosse, J.Hofmann, H.Witzigmann, H.Remke, J.Hauss, O.Wagner. **Diagnosis and monitoring of acute cytomegalovirus infection in peripheral blood of transplant recipients by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).** Transpl Int (2000) 13 [Suppl 1]: S366±S371.

Y Tanaka, Y Kanda, M Kami, S Mori, T Hamaki, E Kusumi, S Miyakoshi, Y Nannya, S Chiba, Y Arai, K Mitani, H Hirai, Y Mutou for the Japan Hematology and Oncology. **Monitoring cytomegalovirus infection by antigenemia assay and two distinct plasma real-time PCR methods after hematopoietic stem cell transplantation.** Bone Marrow Transplantation (2002) 30, 315-319.

P. C. Evans, J. J. Gray*, T. G. Wreghitt*, R. E. Marcussf- and G. J. M. Alexander. **Comparison of three PCR techniques for detecting cytomegalovirus (CMV) DNA in serum, detection of early antigen fluorescent foci and culture for the diagnosis of CMV infection.** J. Med. Microbiol. - Vol. 48 (1999), 1029-1035.

Simona Marchetti, Rosaria Santangelo, Stefania Manzara, Sara D'onghia, Giovanni Fadda, Paola Cattani. **Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants.** New Microbiologica, 34, 157-164, 2011.

Jacqueline F. Fryer, Alan B. Heath, Rob Anderson, Philip D. **Minor and the Collaborative Study Group "Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays".** WHO/BS/10.2138

ASSISTENZA TECNICA

Per ogni domanda o per assistenza contattare il nostro servizio tecnico:

e-mail: info@clonit.it

phone: +39 02 56814413

F Pour obtenir ces instructions en français, veuillez nous contacter par téléphone ou par e-mail:

Tel. +39 02 56814413 / e-mail: support@clonit.it

Legenda dei Simboli Utilizzati Key to symbols used			
REF	Codice del prodotto Catalogue number		Limitazioni di temperatura Temperature limitation
IVD	Dispositivo medico diagnostico in vitro In Vitro Diagnostic Medical Device	REV	Revisione Revision
LOT	Numero di lotto Batch code		Leggere le istruzioni d'uso Consult instructions for use
	Data di scadenza Use by		Sufficiente per un <n> di test Contains sufficient for <n> tests
	Fabbricante Manufacturer	CE	Conforme ai requisiti della Direttiva 98/79/CE According to 98/79/CE Directive



CLONIT S.r.l.

Headquarter: Via Varese 20 - 20121 Milano

Production Site: Via Umberto Saba 25 - 20081 Abbiategrasso (MI)

Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515

www.clonit.it - info@clonit.it



0318

for in vitro diagnostic use

ST-RT-12-ENITA.5
Revision 10th January 2025