altona DIAGNOSTICS

Istruzioni per l'uso

RealStar®
CMV PCR Kit 1.0

09/2023 IT

RealStar®

RealStar®

CMV PCR Kit 1.0

Per uso con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)

VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

CE 0483

IVD

REF 021013

Σ 96

09 2023

altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

MAN-021010-IT-S02

Contenuto

1. Uso previsto 6

2. Componenti del kit 6

3. Conservazione 6

4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti 7

5. Informazioni generali 8

6. Descrizione del prodotto 8

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale 10

7. Avvertenze e precauzioni 11

8. Procedura 12

8.1 Raccolta dei campioni, trasporto e conservazione 12

8.2 Preparazione del campione 13

8.3 Preparazione della Master Mix 15

8.4 Preparazione della reazione 16

9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale 17

9.1 Impostazioni 17

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti) 18

9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti 18

10. Analisi dei dati 18

10.1 Validità dei test diagnostici 19

10.1.1 Test diagnostico valido (qualitativo) 19

10.1.2 Test diagnostico invalido (qualitativo) 19

10.1.3 Test diagnostico valido (quantitativo) 20

10.1.4 Test diagnostico invalido (quantitativo) 20

10.2 Interpretazione dei risultati 21

10.2.1 Analisi qualitativa 21
10.2.2 Analisi quantitativa 21

11. Dati di performance 23
11.1 Sensibilità analitica 23
11.1.1 Sensibilità analitica senza estrazione degli acidi nucleici 24
11.1.2 Sensibilità analitica per campioni di plasma EDTA 25
11.1.3 Sensibilità analitica per campioni di sangue intero EDTA 28
11.2 Specificità analitica 29
11.3 Range lineare 30
11.4 Precisione 33
11.5 Valutazione diagnostica 34
11.5.1 Tipo di campione: plasma EDTA 34
11.5.2 Tipo di campione: sangue intero ETDA 36

12. Limitazioni 37

13. Controllo di qualità 38

14. Assistenza tecnica 38

15. Letteratura 39

16. Marchi e brevetti 40

17. Spiegazione dei simboli 41

1. Uso previsto

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la quantificazione del DNA specifico di citomegalovirus (CMV) in plasma umano EDTA e sangue intero umano EDTA.

2. Componenti del kit

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [µl/fiale]
Blu	Master A	8	60
Viola	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rosso	QS1-4*	4	250
Bianco	Water (PCR grade)	1	500

* Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 contiene Standard di quantificazione (QS) a quattro diverse concentrazioni (vedere il capitolo 6. Descrizione del prodotto)

Internal Control (IC) = Controllo interno

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

3. Conservazione

- Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2°C e +8°C non deve superare un periodo di due ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere il capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato (vedere il capitolo 8.2 Preparazione del campione)
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Vortex mixer
- Piastre di reazione o provette di reazione appropriate a 96 pozzetti con materiale di chiusura (ottico) corrispondente
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro (monouso)
- Guanti senza polvere (monouso)

NOTA

Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

NOTA

Si consiglia di utilizzare il rotore a 72 pozzetti con le appropriate provette di reazione da 0,1 ml, se si utilizza il Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o il Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Informazioni generali

Il *citomegalovirus umano* (CMV) è un virus della famiglia degli *Herpesviridae* appartenente alla sottofamiglia degli *Betaherpesvirinae*. Il virus consiste in un capside di forma icosaedrica con un genoma costituito da DNA lineare a doppio filamento di circa 230 kbp circondato da un tegumento e un pericapside esterno.

Il CMV ha distribuzione mondiale e infetta gli esseri umani di tutte le età, senza modelli stagionali o epidemici di trasmissione. La sieroprevalenza del CMV aumenta con l'età in tutte le popolazioni e varia dal 40 al 100%. Similmente alle infezioni da altri Herpesvirus, l'infezione primaria da CMV stabilisce un'infezione persistente o latente. La riattivazione del virus può verificarsi in risposta a stimoli diversi, in particolare in caso di immunosoppressione. Per la maggior parte, le infezioni da CMV sono asintomatiche o subcliniche, ma le infezioni congenite e le infezioni nei pazienti immunocompromessi possono essere sintomatiche e gravi. In pazienti immunocompromessi, come per esempio individui che hanno ricevuto un trapianto, pazienti affetti da HIV o pazienti oncologici, un'infezione o una riattivazione dell'infezione da CMV può trasformarsi in una malattia disseminata pericolosa per la vita.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento e la quantificazione del DNA specifico di citomegalovirus (CMV) in plasma umano EDTA e sangue intero umano EDTA.

Il test include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione della PCR e per confermare l'integrità dei reagenti del kit.

La tecnologia PCR in tempo reale utilizza la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target specifiche e sonde target specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono marcate con un reporter fluorescente (fluoroforo) ed un quencher.

Le sonde specifiche per il DNA di CMV sono marcate con il fluoroforo FAM™. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde marcate con coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo del DNA specifico di CMV, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende due processi in un'unica provetta:

- Amplificazione per PCR del DNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- QS1-4*
- Water (PCR grade)

* Standard di quantificazione (QS) in quattro concentrazioni diverse

Internal Control = Controllo interno

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento del DNA specifico di CMV e del controllo interno in una singola reazione.

Gli Standard di quantificazione contengono concentrazioni standardizzate di DNA specifico di CMV. Essi sono stati calibrati rispetto al 1° Standard Internazionale dell'OMS per le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici per il citomegalovirus umano (codice NIBSC: 09/162). Gli Standard di quantificazione possono essere utilizzati singolarmente come controlli positivi o insieme per generare una **curva standard**, che può essere utilizzata per determinare la concentrazione di DNA specifico di CMV in un campione.

Gli standard di quantificazione hanno le seguenti concentrazioni:

Standard di quantificazione	Concentrazione [UI/µl]
QS1	1,00E+04
QS2	1,00E+03
QS3	1,00E+02
QS4	1,00E+01

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è stato validato per plasma EDTA in combinazione con il QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) sui seguenti strumenti di PCR in tempo reale:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è stato validato per plasma EDTA e sangue intero EDTA in combinazione con VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare) sul seguente strumento di PCR in tempo reale:

- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)

7. Avvertenze e precauzioni

Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.

- Prima del primo utilizzo, controllare il prodotto e i suoi componenti per:
  - Integrità
  - Completezza rispetto a numero, tipo e riempimento (vedere il capitolo 2. Componenti del kit)
  - Etichette corrette
  - Congelamento all'arrivo
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- I campioni devono essere sempre trattati come infettivi e/o pericolosi secondo le procedure di laboratorio sicure.
- Indossare guanti protettivi monouso senza polvere, un camice da laboratorio e una protezione per gli occhi durante la manipolazione dei campioni.
- Evitare la contaminazione microbica e nucleasica (DNasi/RNasi) dei campioni e dei componenti del kit.
- Utilizzare sempre puntali per pipette monouso privi di DNasi/RNasi.
- Indossare sempre guanti protettivi usa e getta senza polvere quando si maneggiano i componenti del kit.

- Utilizzare aree di lavoro separate e isolate per (i) preparazione del campione, (ii) impostazione della reazione e (iii) attività di amplificazione/rilevazione. Il flusso di lavoro in laboratorio dovrebbe procedere in modo unidirezionale. Indossare sempre guanti monouso in ogni area e cambiarli prima di entrare in un'altra area.
- Dedicare materiali di consumo e attrezzature alle aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato da tutti gli altri componenti del kit.
- Non aprire le provette/piastre di reazione dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Controlli aggiuntivi possono essere testati secondo le linee guida o i requisiti delle normative locali, statali e/o federali o delle organizzazioni di accreditamento.
- Non sterilizzare in autoclave le provette dopo la PCR, poiché ciò non distrugge gli acidi nucleici amplificati e rischierà di contaminare l'area di laboratorio.
- Non utilizzare componenti del kit che hanno superato la data di scadenza.
- Eliminare i rifiuti dei campioni e del test in base alle normative di sicurezza locali.

8. Procedura

8.1 Raccolta dei campioni, trasporto e conservazione

Il sangue deve essere prelevato con sistemi standard di raccolta di sangue EDTA commercialmente disponibili (per es. Sarstedt, Becton Dickinson, Greiner o equivalente). Le provette devono essere miscelate subito dopo la raccolta del campione. I campioni di sangue devono essere spediti refrigerati (2–8°C). Il trasporto deve essere effettuato conformemente alle istruzioni locali e nazionali riguardo al trasporto di materiale biologico.

Per la produzione di plasma EDTA, il sangue intero EDTA deve essere centrifugato secondo le istruzioni fornite dal costruttore del sistema di raccolta entro 24 ore dalla raccolta. Il plasma EDTA e il sangue intero EDTA devono essere conservati a 2–8°C per un periodo non superiore a 14 giorni (Abdul-Ali et al. 2011).

8.2 Preparazione del campione

Il DNA estratto da plasma EDTA umano o da sangue interno EDTA è il materiale di partenza per il RealStar® CMV PCR Kit 1.0.

La qualità del DNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero saggio. È necessario garantire che il sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia PCR in tempo reale.

Per il **plasma EDTA** i seguenti metodi di estrazione degli acidi nucleici sono stati validati per l'uso con il RealStar® CMV PCR Kit 1.0:

- QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP in combinazione con VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

Per aumentare la sensibilità del sistema, il protocollo del QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) può essere modificato in base alle specifiche elencate nella Tabella 3: Modifiche del protocollo del QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) (vedere il capitolo 11.1.2 Sensibilità analitica per i campioni di plasma EDTA).

Se si utilizza una procedura di preparazione del campione basata su colonna di centrifugazione che include tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si consiglia di effettuare un'ulteriore fase di centrifugazione per 10 minuti a circa 17000 x g (~ 13000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

Per il **sangue intero EDTA** i seguenti metodi di estrazione degli acidi nucleici sono stati validati per l'uso con il RealStar® CMV PCR Kit 1.0:

- VERSANT® kPCR Molecular System SP in combinazione con VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare)

Per il sangue intero EDTA il protocollo di preparazione per VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents (SMN 10629800 e 10629801) deve essere modificato nel modo seguente: i campioni di sangue intero EDTA devono essere miscelati con un PRE-tampone in un rapporto 1:1 (350 µl + 350 µl) invece che con il rapporto indicato nelle istruzioni per l'uso.

ATTENZIONE	
	Se il sistema di preparazione dei campioni utilizza tamponi di lavaggio contenenti etanolo, assicurarsi di eliminare eventuali tracce di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale.

ATTENZIONE	
	L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro sevizio di assistenza tecnica (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

8.3 Preparazione della Master Mix

Tutti i reagenti e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex) e centrifugati brevemente prima dell'uso.

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato o come controllo di inibizione della PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della PCR.

- ► Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione del campione, impostare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
Volume Master Mix	**21 µl**	**252 µl**

- ► Se l'IC viene utilizzato come controllo per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere l'IC durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- ► Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se l'acido nucleico deve essere eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, devono essere aggiunti 6 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.

► Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, preparare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume Master Mix	**20 µl**	**240 µl**

ATTENZIONE

Se l'IC (controllo interno) è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, almeno il controllo negativo deve includere l'IC.

ATTENZIONE

Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, non aggiungere mai l'IC direttamente al campione.

8.4 Preparazione della reazione

► Pipettare 20 µl di Master Mix in ciascuno dei pozzetti richiesti di un'appropriata piastra di reazione ottica a 96 pozzetti o di un'appropriata provetta di reazione ottica.

► Aggiungere 10 µl di campione (eluato dall'estrazione dell'acido nucleico) o 10 µl del controllo (Standard di quantificazione, controllo positivo o negativo).

Preparazione della reazione	
Master Mix	20 µl
Campione o controllo	10 µl
Volume totale	**30 µl**

- ► Assicurarsi che almeno un controllo positivo (QS) e almeno un controllo negativo siano utilizzati ad ogni esecuzione del saggio.
- ► Ai fini della quantificazione, tutti gli standard di quantificazione (da QS1 a QS4) dovrebbero essere utilizzati.
- ► Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ► Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ► Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

9.1 Impostazioni

- ► Definire i seguenti parametri:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di rampa	Predefinito
Riferimento passivo	ROX™

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

► Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
DNA specifico CMV	CMV	FAM™	(Nessuno)
Controllo interno (IC)	IC	JOE™	(Nessuno)

9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

► Impostare il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Fase	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Tempo [min:sec]
Denaturazione	Mantenimento	1	-	95	10:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	58	01:00

10. Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con RealStar® CMV PCR Kit 1.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 14. Assistenza tecnica).

10.1 Validità dei test diagnostici

10.1.1 Test diagnostico valido (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo** è **valido** se sono soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

Controllo	Canale	
	FAM™	JOE™
Controllo positivo (QS)	+	+/-*
Controllo negativo	-	+

* La presenza o l'assenza di un segnale nel canale JOE™ non è rilevante per la validità dell'esecuzione del test.

10.1.2 Test diagnostico invalido (qualitativo)

Un test diagnostico **qualitativo non è valido**, (i) se l'esecuzione non è stata completata o (ii) se una delle condizioni di controllo per un test diagnostico **valido** non è soddisfatta.

In caso di test diagnostici **non validi** ripetere i test utilizzando gli acidi nucleici purificati rimanenti o ricominciare dai campioni originali.

10.1.3 Test diagnostico valido (quantitativo)

Un test diagnostico **quantitativo** è **valido**, se sono soddisfatte tutte le condizioni di controllo per l'esecuzione di un test diagnostico **qualitativo valido** [vedere il capitolo 10.1.1 Test diagnostico valido (qualitativo)]. I risultati della **quantificazione** sono **validi** se la **curva standard** generata raggiunge il seguente valore del parametro di controllo:

Parametro	Valore valido
R square (R^2)	> 0,98

NOTA

Non tutti gli strumenti PCR in tempo reale visualizzano il valore di (R^2). Per informazioni dettagliate, consultare il manuale dell'utente del rispettivo strumento.

10.1.4 Test diagnostico invalido (quantitativo)

Un test diagnostico **quantitativo non è valido**, (i) se il test non è stato completato o (ii) se non sono soddisfatte le condizioni di controllo per un test diagnostico **quantitativo valido**.

In caso di test diagnostici **non validi** ripetere i test utilizzando gli acidi nucleici purificati rimanenti o ricominciare dai campioni originali.

10.2 Interpretazione dei risultati

10.2.1 Analisi qualitativa

Canale		Interpretazione dei risultati
FAM™	JOE™	
+	+*	Rilevato DNA specifico di CMV.
-	+	Nessun DNA specifico di CMV rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di DNA specifico di CMV.
-	-	Inibizione della PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

* Il rilevamento del controllo interno nel canale di rilevamento JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi nel canale di rilevamento FAM™. Un elevato carico di DNA di CMV nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

È prevedibile un risultato positivo specifico per CMV con un tasso di positività del 95% se il campione analizzato contiene almeno 265 UI di CMV per ml di plasma EDTA [intervallo di confidenza del 95%: 50 – 2278 UI/ml] e 835 UI di CMV per ml di sangue intero EDTA [intervallo di confidenza del 90%: da 614 a 1274 UI/ml].

Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati ottenuti con il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.

10.2.2 Analisi quantitativa

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 include quattro standard di quantificazione (QS). Per generare una **curva standard** per l'analisi quantitativa, questi devono essere definiti come **standard** con concentrazioni appropriate (vedere il capitolo 6. Descrizione del prodotto). Utilizzando **standard** di concentrazioni note è possibile generare una curva standard per l'analisi quantitativa.

$$C_t = m \cdot \log (N_0) + b$$

C_t = Ciclo soglia
m = Pendenza
N_0 = Concentrazione iniziale
b = Intercetta

È possibile quindi determinare la concentrazione non nota di campioni positivi a seconda della curva standard.

$$N_0 = 10^{(C_t - b)/m}$$

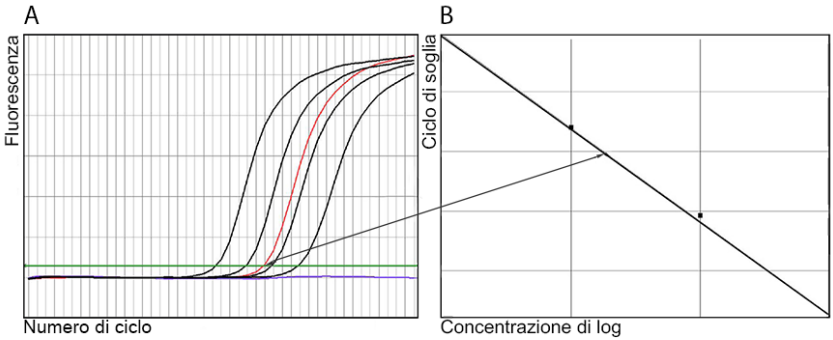


Figura 1: Standard di quantificazione (nero), un campione positivo (rosso) e un negativo (blu) visualizzati in diagramma di amplificazione [**A**] e analisi della curva standard [**B**]

NOTA

La concentrazione del "Campione" è visualizzata in UI/µl e si riferisce alla concentrazione nell'eluato.

Per determinare la **carica virale del campione originale**, è necessario applicare la seguente formula:

$$\text{Carica virale (}\textbf{campione}\text{) [UI/ml]} = \frac{\text{Volume (}\textbf{Eluato}\text{) [µl]} \cdot \text{Carica virale (}\textbf{Eluato}\text{) [UI/µl]}}{\text{Volume iniziale campione [ml]}}$$

11. Dati di performance

La valutazione della performance analitica senza un metodo di estrazione degli acidi nucleici è stata effettuata utilizzando DNA quantificato specifico di CMV. La valutazione della performance analitica con metodi di estrazione degli acidi nucleici è stata effettuata utilizzando il 1° Standard Internazionale dell'OMS per le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici per il citomegalovirus umano (codice NIBSC: 09/162).

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (limite di rilevabilità - LoD) del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è definita come la concentrazione di molecole di DNA di CMV che possono essere rilevate con un tasso di positività del 95%. La sensibilità analitica è stata determinata con e senza un metodo selezionato di estrazione degli acidi nucleici.

11.1.1 Sensibilità analitica senza estrazione degli acidi nucleici

Una serie di diluizioni di DNA di CMV, da 1,21 UI/µl al valore nominale 0,0004 UI/µl, è stata preparata e analizzata utilizzando il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 in combinazione con i seguenti strumenti PCR in tempo reale:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Le analisi sono state effettuate in due giorni con almeno otto replicati per concentrazione alla volta. I risultati sono stati determinati con l'analisi Probit.

Tab. 1: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica [Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)]

Conc. in ingresso [UI/µl]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
1,2100	16	16	100
0,3826	16	16	100
0,1210	16	13	81
0,0383	16	4	25
0,0121	16	2	13
0,0038	16	0	0
0,0012	16	0	0
0,0004	16	0	0

Tab. 2: Sensibilità analitica determinata con analisi Probit utilizzando diversi strumenti PCR in tempo reale

Strumento per PCR in tempo reale	Limite di rilevabilità [95%]	Intervallo di confidenza [95%]
ABI Prism® 7500 Fast SDS	0,668 UI/µl	0,323 – 2,258 UI/µl
Rotor-Gene® 6000/Q 5/6 plex	0,249 UI/µl	0,160 – 0,644 UI/µl
LightCycler® 480 Instrument II	0,238 UI/µl	0,149 – 0,624 UI/µl
Mx 3005P™ QPCR System	0,257 UI/µl	0,150 – 0,704 UI/µl
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	0,943 UI/µl	0,083 – 16,884 UI/µl
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	0,702 UI/µl	0,396 – 1,985 UI/µl

11.1.2 Sensibilità analitica per campioni di plasma EDTA

La sensibilità analitica in considerazione di un metodo selezionato di estrazione degli acidi nucleici per i campioni di plasma EDTA è stata determinata utilizzando una serie di diluizioni del 1° Standard Internazionale dell'OMS per le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici per il citomegalovirus umano (codice NIBSC: 09/162) che vanno da 316 UI/ml al valore nominale di 0,03 UI/ml in plasma EDTA negativo per il CMV.

In due giorni, otto aliquote per concentrazione alla volta sono state sottoposte a estrazione degli acidi nucleici utilizzando il QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN). Il protocollo del QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) è stato modificato in base alla tabella seguente.

Tab. 3: Modifiche del protocollo del QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN)

	Protocollo QIAGEN [µl]	Modifica [µl]
Campione	200	400
Proteasi	25	50
Tampone di lisi (AL)	200	400
Etanolo[1] (abs.)	250	500
Tampone di lavaggio (AW1)	500	700
Tampone di lavaggio (AW2)	500	700
Etanolo[2] (abs.)	500	700

[1] aggiunto al mix campione/tampone di lisi

[2] Fase di lavaggio 3

Ciascun eluato è stato analizzato utilizzando il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 in combinazione con i seguenti strumenti PCR in tempo reale:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

I risultati sono stati determinati con l'analisi Probit.

Tab. 4: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica per i campioni di plasma EDTA [LightCycler® 480 Instrument II (Roche)]

Conc. in ingresso [UI/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
316,23	16	16	100
100,00	16	15	94
31,62	16	13	81
10,00	16	6	38
3,16	16	3	19
1,00	16	0	0
0,32	16	0	0
0,10	16	0	0
0,03	16	0	0

Tab. 5: Sensibilità analitica per i campioni di plasma EDTA determinata con analisi Probit utilizzando diversi strumenti PCR in tempo reale

Strumento per PCR in tempo reale	Limite di rilevabilità [95%]	Intervallo di confidenza [95%]
ABI Prism® 7500 Fast SDS	92,10 UI/ml	46,94 – 288,29 UI/ml
Rotor-Gene® 6000/Q 5/6 plex	106,29 UI/ml	51,05 – 356,08 UI/ml
LightCycler® 480 Instrument II	91,38 UI/ml	49,16 – 271,13 UI/ml
Mx 3005P™ QPCR System	85,14 UI/ml	45,09 – 256,13 UI/ml
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	116,32 UI/ml	59,67 – 357,43 UI/ml
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	264,98 UI/ml	49,54 – 2278,24 UI/ml

11.1.3 Sensibilità analitica per campioni di sangue intero EDTA

La sensibilità analitica in considerazione di un metodo selezionato di estrazione degli acidi nucleici per i campioni di sangue intero EDTA è stata determinata utilizzando una serie di diluizioni del 1° Standard Internazionale dell'OMS per le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici per il citomegalovirus umano (codice NIBSC: 09/162) che vanno da 10000 UI/ml al valore nominale 20 UI/ml in sangue intero EDTA negativo per il CMV.

In tre sedute indipendenti, otto aliquote per concentrazione alla volta sono state sottoposte a estrazione degli acidi nucleici utilizzando il VERSANT® kPCR Molecular System SP in combinazione con il VERSANT® Sample Preparation 1.2 Reagents Kit (Siemens Healthcare).

I risultati sono stati determinati con l'analisi Probit.

Tab. 6: Risultati della PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica per i campioni di sangue intero EDTA [VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)]

Conc. in ingresso [UI/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Tasso di successo [%]
10000	24	24	100
3162	24	24	100
1500	24	24	100
1000	24	24	100
750	24	22	92
500	24	20	83
250	24	16	67
100	24	10	42
20	22	1	5

Tab. 7: Sensibilità analitica per i campioni di sangue intero EDTA determinata con analisi Probit utilizzando VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens)

Strumento per PCR in tempo reale	Limite di rilevabilità [95%]	Intervallo di confidenza [90%]
VERSANT® kPCR Molecular System AD	835 UI/ml	614 – 1274 UI/ml

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è assicurata dall'accurata selezione degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili per garantire che tutti i genotipi CMV pertinenti fossero rilevati.

Più di cento campioni diversi di plasma EDTA CMV-negativo e più di trenta diversi campioni di sangue intero EDTA CMV-negativo sono stati analizzati con il RealStar® CMV PCR Kit 1.0. Nessuno di questi ha prodotto un segnale positivo CMV-specifico, ma tutti hanno prodotto un segnale IC valido. La specificità del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è stata inoltre valutata analizzando un pannello di RNA/DNA genomico estratto da altri herpesvirus o da altri patogeni significativi nei pazienti immunocompromessi.

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Virus herpes simplex 1
- Virus herpes simplex 2
- Virus varicella-zoster
- Virus Epstein-Barr
- Herpesvirus umano 6A
- Herpesvirus umano 6B
- Herpesvirus umano 7
- Herpesvirus umano 8
- Parvovirus umano B19
- Virus BK
- Virus JC
- Simian virus 40
- Virus epatite A
- Virus epatite B
- Virus epatite C
- Virus dell'immunodeficienza umana 1

11.3 Range lineare

Il range lineare del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è stato valutato analizzando una serie di diluizioni logaritmiche di DNA specifico di CMV (concentrazioni da 1,21E+09 a 1,21E+00 UI/µl) utilizzando i seguenti strumenti PCR in tempo reale:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)/Rotor-Gene® Q 5/6 plex Plattform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Ogni concentrazione è stata analizzata in otto replicati per ciascuno strumento PCR in tempo reale. Il range lineare del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 si estende lungo un intervallo di almeno nove ordini di grandezza in tutti gli strumenti PCR in tempo reale utilizzati.

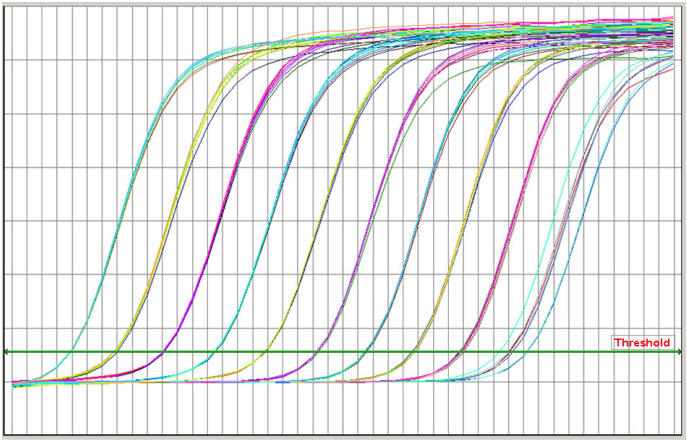
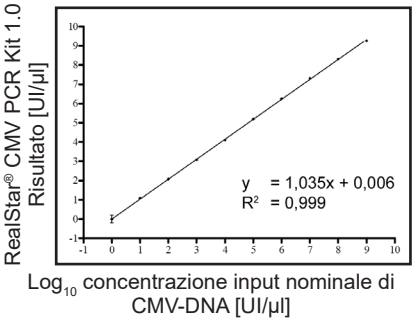
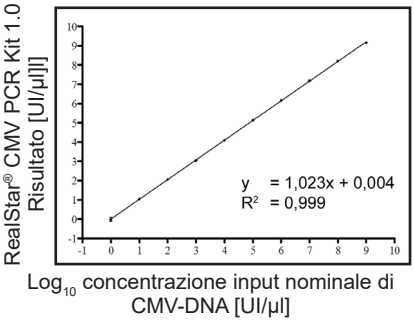


Figura 2: Curve di amplificazione in ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

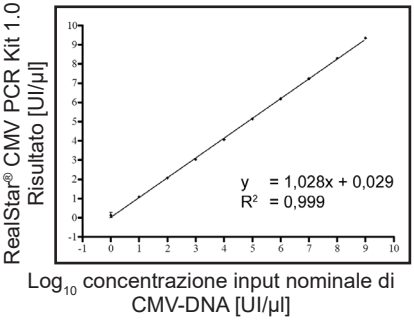
A


RealStar® CMV PCR Kit 1.0
Risultato [UI/µl]
y = 1,035x + 0,006
R² = 0,999
Log10 concentrazione input nominale di
CMV-DNA [UI/µl]

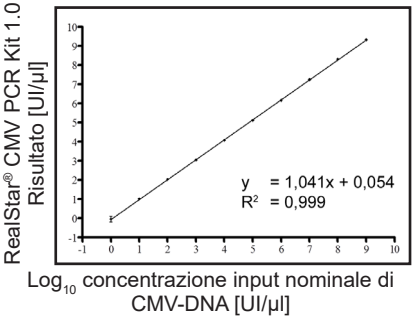
B


RealStar® CMV PCR Kit 1.0
Risultato [UI/µl]]
y = 1,023x + 0,004
R² = 0,999
Log10 concentrazione input nominale di
CMV-DNA [UI/µl]

C


RealStar® CMV PCR Kit 1.0
Risultato [UI/µl]
y = 1,028x + 0,029
R² = 0,999
Log10 concentrazione input nominale di
CMV-DNA [UI/µl]

D


RealStar® CMV PCR Kit 1.0
Risultato [UI/µl]
y = 1,041x + 0,054
R² = 0,999
Log10 concentrazione input nominale di
CMV-DNA [UI/µl]

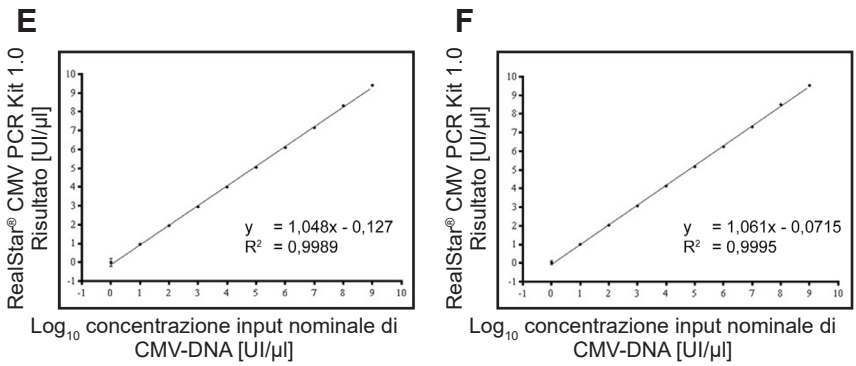


Figura 3: Regressione lineare delle serie di diluizioni analizzate su ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems) [**A**], Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene) [**B**], LightCycler® Instrument 480 II (Roche) [**C**], Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research) / Rotor-Gene™ Q 5/6 plex Platform (QIAGEN) [**D**], CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [**E**] e CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) [**F**]

11.4 Precisione

La precisione del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è stata determinata come variabilità intra-dosaggio (variabilità all'interno di un esperimento), variabilità inter-dosaggio (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra lotti di produzione diversi). La variabilità totale è stata calcolata combinando le tre analisi.

I dati di variabilità sono espressi in termini di coefficiente di variazione della variabilità totale. I dati si basano sull'analisi di quantificazione di un controllo positivo alto (HPC: 121 UI/µl) e sul valore del ciclo di soglia (C_t) in termini di controllo positivo basso (LPC: 1,8 UI/µl) e di controllo interno (IC). Sono stati analizzati almeno otto replicati per campione.

Tab. 8: Precisione in termini di coefficiente di variazione della variabilità totale utilizzando diversi strumenti PCR in tempo reale

Strumento per PCR in tempo reale	Variabilità totale / Coefficiente di variazione [%]		
	Controllo positivo alto	Controllo positivo basso	Controllo interno
ABI Prism® 7500 Fast SDS	4,89	1,49	0,91
LightCycler® 480 Instrument II	6,62	1,13	0,12
Rotor-Gene® 6000/Q 5/6 plex	10,79	4,20	0,65
Mx 3005P™ QPCR System	19,77	1,22	0,60
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System	5,33	1,85	1,74
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	7,28	1,59	3,36

11.5 Valutazione diagnostica

11.5.1 Tipo di campione: plasma EDTA

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è stato valutato in uno studio comparativo con l'Abbott RealTime CMV kit di Abbott Diagnostics marcato CE.

124 campioni di plasma EDTA inviati per analisi di routine per il CMV sono stati trattati utilizzando il sistema di estrazione degli acidi nucleici m2000sp (Abbott Diagnostics) e analizzati con il RealTime CMV kit di Abbot marcato CE su uno strumento m2000rt (Abbott Diagnostics). Gli eluati di DNA sono stati conservati a -20°C e rianalizzati utilizzando il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 su uno strumento m2000rt.

Tab. 9: Risultati della valutazione della sensibilità diagnostica e della specificità

		RealStar® CMV PCR Kit 1.0	
		+	-
Abbott RealTime CMV	+	103	1
	-	0	20

La sensibilità diagnostica e la specificità del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 rispetto al test Abbott RealTime CMV sono state, rispettivamente, del 99,04% e del 100%.

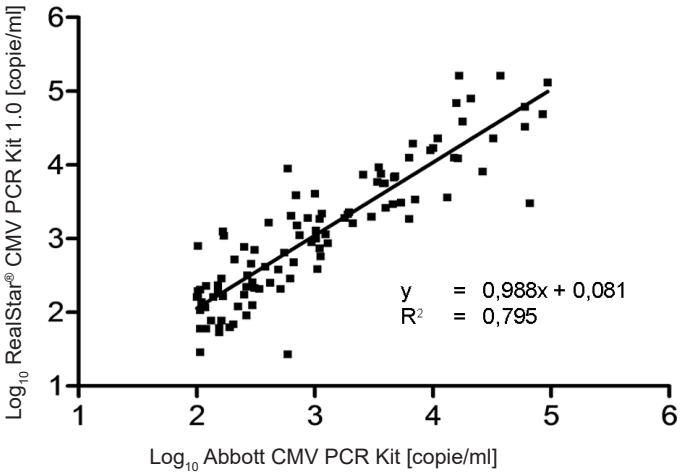


Figura 4: Correlazione dei risultati di quantificazione tra il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e il test Abbott RealTime CMV (n=102).

C'è stata una buona correlazione tra i risultati quantitativi del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e dell'Abbott RealTime CMV kit. Non sono state identificate differenze sistematiche o proporzionali tra i due metodi.

11.5.2 Tipo di campione: sangue intero ETDA

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è stato valutato in uno studio comparativo con il Q - CMV Real Time Complete Kit di ELITech Molecular Diagnostics marcato CE.

90 campioni di sangue intero EDTA risultati positivi al CMV nel corso di un monitoraggio di routine del CMV sono stati analizzati in parallelo utilizzando il sistema di estrazione degli acidi nucleici NucliSENS® easyMAG® (Biomerieux) con il Q - CMV Real Time Complete Kit marcato CE su ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) e utilizzando il kPCR Molecular System (Siemens) con il RealStar® CMV PCR Kit 1.0. Per la correlazione quantitativa tutti i campioni sono risultati negativi a uno o a entrambi i test e due valori anomali sono stati eliminati dall'analisi. I risultati dei rimanenti 71 campioni sono stati utilizzati per un'ulteriore analisi. La correlazione quantitativa dei risultati è stata determinata dall'analisi della regressione di Passing-Bablok.

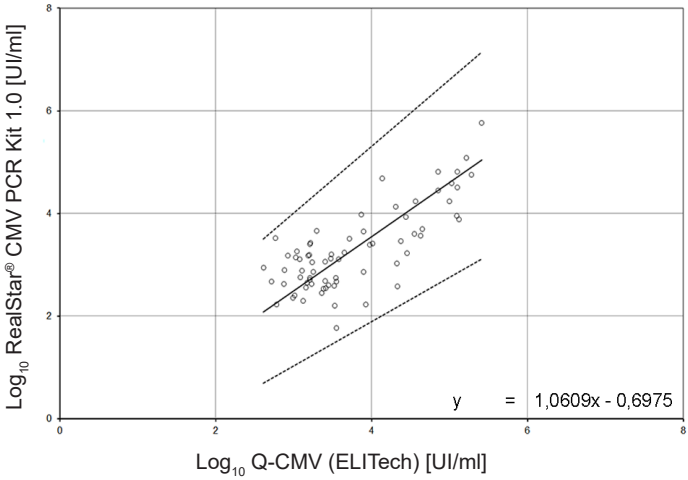


Figura 5: Correlazione dei risultati di quantificazione tra il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e il Q-CMV Real Time Complete Kit di ELITech Molecular Diagnostics

C'è stata una buona correlazione tra i risultati quantitativi del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 e del Q - CMV Real Time Complete Kit. Non sono state identificate differenze sistematiche o proporzionali tra i due metodi.

12. Limitazioni

- Per risultati ottimali è richiesta la rigorosa osservanza delle istruzioni per l'uso.
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.
- La buona pratica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. È necessario prestare la massima attenzione per preservare la purezza dei componenti del kit e le impostazioni di reazione. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie adeguate procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni.

- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.
- La presenza di inibitori della PCR (ad es. eparina) può causare risultati insufficienti, risultati falsi negativi o non validi.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma CMV coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare una sottoquantificazione e/o il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 devono essere interpretati in considerazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.

13. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di altona Diagnostics GmbH, ogni lotto di RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

14. Assistenza tecnica

Per l'assistenza ai clienti, si prega di contattare il nostro supporto tecnico:

e-mail: **support@altona-diagnostics.com**
telefono: **+49-(0)40-5480676-0**

15. Letteratura

[1] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the Collaborative Study Group. 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)- Based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138.

[2] Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia. 2013:1803-1822.

[3] Mocarski, Jr ES, Shenk T, Griffiths PD, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields Virology, 6th ed., Lippincott Williams & Willkins, Philadelphia. 2013:1961-2014.

[4] Hodinka RL. Human Cytomegalovirus. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., American Society for Microbiology, Washington. 2011:1558-1574.

[5] Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM., Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated EDTA whole blood and plasma samples., J Clin Virol. 2011 November ; 52(3): 222–224.

16. Marchi e brevetti

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Mx 3005P™ (Stratagene); Rotor-Gene®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare).

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

Il RealStar® CMV PCR Kit 1.0 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.

Prodotto non concesso in licenza con Health Canada e non approvato o autorizzato dalla FDA.

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

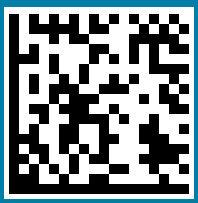
17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
IVD	Dispositivo diagnostico *in vitro*
LOT	Lotto
CAP	Colore del tappo
REF	Numero di catalogo
CONT	Indice
NUM	Numero
COMP	Componente
GTIN	Global Trade Identification Number
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione
	Note
	Versione

Note:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com