

# CMV DNA QUANTITATION (QT)

Real-Time PCR per la quantificazione del genoma di CMV - 2nd Generation

4BShopLab

## CMV DNA

### A. USO PREVISTO

Il kit di PCR real-time **CMV DNA Quantitation (QT) 2<sup>nd</sup> Generation**, codificato **CMVDNAQT.2G.CE**, è finalizzato alla quantificazione del DNA di Cytomegalovirus in campioni biologici umani (sangue, plasma, liquido amniotico). La presenza di un controllo interno (IC) di estrazione e/o amplificazione permette di monitorare l'intero processo.

Il saggio CMVDNAQT.2G.CE è stato standardizzato verso il primo WHO Standard Internazionale per HCMV (Codice NIBSC 09/162) al fine di esprimere la concentrazione dei campioni anche in Unità Internazionali (UI/ml).

L'utilizzo del kit è compatibile con strumenti real-time ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS versione 1.3.1, Applied Biosystems™\*), MX3000P (Software MxPro versione 4.01, Stratagene™\*\*\*), CFX96 (Software CFX manager versione 1.7, Biorad™\*\*) e Rotor-Gene Q Series, Qiagen, (software versione 2.1.0 Qiagen™\*\*\*\*).

\* Applied Biosystems è un marchio registrato e ABI PRISM® è un marchio di proprietà di Applied Biosystems o delle sue consociate negli USA e/o altri paesi.

\*\* Biorad è un marchio registrato.

\*\*\*Stratagene è un marchio registrato.

\*\*\*\*Qiagen è un marchio registrato.

### B. INTRODUZIONE

Il cytomegalovirus umano (HCMV) è un membro ubiquitario della famiglia di virus dell'herpes umano.

Dati clinici indicano che l'HCMV infetta vari tipi di tessuti e cellule e quindi è responsabile di una miriade di complicanze cliniche. A seconda del tipo di tessuto e dello stato immunitario dell'ospite, l'HCMV attiva tre diverse modalità d'infezione: infezioni acute con crescita esplosiva, infezioni persistenti con livelli ridotti di replicazione e infezioni latenti in cui non viene prodotta alcuna progenie virale. Il meccanismo di riattivazione è tuttora sconosciuto, tuttavia sembra essere fortemente correlato a un controllo deficitario del virus da parte del sistema immunitario dell'ospite. Per questa ragione, il CMV è uno degli agenti patogeni opportunistici più comuni che complicano il trattamento dei soggetti trapiantati; potenzialmente, rappresenta una delle cause principali di morbilità e mortalità.

Con un DNA genomico lineare a doppio filamento >230 kb, l'HCMV è il principale membro della famiglia di virus dell'herpes umano.

In questa famiglia, l'HCMV è il prototipo del sottogruppo di virus del beta herpes, che comprende i virus dell'herpes 6 e 7.

Il trattamento della malattia da CMV con farmaci antivirali specifici, come ganciclovir e foscarnet, diminuisce la gravità della patologia e la mortalità dei pazienti. Sono state messe a punto strategie antivirali di profilassi e prevenzione che si prefiggono di evitare il trattamento aggressivo della malattia accertata a carico dell'organo trapiantato.

La determinazione quantitativa del carico virale del DNA del CMV definisce specificamente la progressione della malattia. I test basati sulla PCR real-time sono in grado di quantificare con accuratezza il DNA virale e senza la manipolazione dei campioni nella fase post-PCR, fornendo risultati rapidi e un rischio realmente ridotto di contaminazione crociata per il campione in esame.

### C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit CMVDNAQT.2G.CE si basa su una chimica real-time che utilizza primers e probes specifici.

Il **DNA del CMV**, purificato dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene amplificato utilizzando il sistema di amplificazione real-time. Il prodotto amplificato viene determinato e quantificato mediante probe marcato con sostanze fluorescenti (reporter dye), specifico per una sequenza genomica unica del CMV.

Il controllo interno (IC) eterologo funge da controllo di estrazione e/o di amplificazione per ogni singolo campione, con l'obiettivo di identificare eventuali inibitori della reazione.

Viene fornita una curva standard per permettere la determinazione del carico virale.

### D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato come CMVDNAQT.2G.CE contiene reagenti per 50 test.

Componente	Contenuto	CMVDNAQT.CE 50 reazioni
<b>A</b> CODIFICATO: ALL/MM-4 CODICE COLORE: TRASPARENTE	Master mix	N° 1 provette/0.825 ml
<b>B</b> CODIFICATO: CMV/CB CODICE COLORE: GIALLO	Primer/probe liofilizzati	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>C</b> CODIFICATO: ALL/C CODICE COLORE: ROSSO	Acqua MG	N° 4 provette/1.5 ml
<b>NTC</b> CODIFICATO: ALL/NTC CODICE COLORE: BIANCO	Controllo negativo	N° 1 provette/1.5 ml
<b>STD</b> Standard di quantificazione (6x10 <sup>4</sup> copie/μl) CODIFICATO: CMV/STD CODICE COLORE: ROSSO	Standard quantitativo liofilizzato	N° 4 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>I.C.</b> Controllo interno CODIFICATO: ALL/IC CODICE COLORE: VERDE	Controllo interno liofilizzato	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
Foglietto illustrativo	Istruzioni per l'uso	1

**Nota importante:** su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100, 150 test, come riportato nella tabella sottostante:

1. Componente A	n°1 provette/0.4 ml	n°2 provette/0.825 ml	n° 3 provette/0.825 ml
2. Componente B	n°1 provette	n°4 provette	n°6 provette
3. Componente C	n°2 provette/1.5 ml	n°5 provette/1.5 ml	n°7 provette/1.5 ml
4. NTC	n°1 provette/1.5 ml	n°1 provette/1.5 ml	n°1 provette/1.5 ml
6. IC	n°1 provette	n°4 provette	n°6 provette
7. STD	n°2 provette	n°4 provette	n°6 provette
8. Foglietto illustrativo	n°1	n°1	n°1
Numero di test	25	100	150
Codice	CMVDNAQT.2G.CE.25	CMVDNAQT.2G.CE.100	CMVDNAQT.2G.CE.150

## E. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il kit codificato CMVDNAQT.2G.CE deve essere conservato a +2...8 °C.

Una volta risospeso il **Componente B** (codice CMV/CB) e il **Componente IC** (codice ALL/IC) sono stabili 1 mese a -20°C. Una volta risospeso il **Componente STD** (codice CMV/STD) è stabile 2 settimane a -20°C. Se i componenti risospesi devono essere usati più volte si raccomanda di preparare aliquote, ripetuti congelamenti e scongelamenti devono essere evitati. Solo uno scongelamento è ammesso.

## F. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette **calibrate** (0,5 µl < volume <1000 µl)
2. Kit di estrazione del DNA
3. MG EtOH
4. Blocco termico
5. Microcentrifuga
6. Portaprovette
7. Puntali sterili con filtro con barriera aerosol
8. Microprovette prive di nucleasi
9. Microprovette da 0,2 ml o micropiastre per PCR raccomandate dai produttori di strumenti per PCR real-time
10. Guanti monouso non talcati
11. Termociclatore per PCR real-time (\*)
12. Fazzoletti di carta assorbente
13. Vortex o miscelatori similari

(\*) **Attenzione:** deve essere effettuata regolarmente una calibrazione valida di pure dyes (Pure Spectra Component File) e background (Background Component File).

## G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico esperto ed adeguatamente addestrato, dietro supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere specificamente addestrato all'uso dei termociclatori real-time, nonché alla manipolazione dei reagenti per biologia molecolare e deve avere familiarità con i protocolli di amplificazione per PCR real-time.
3. Per effettuare questo tipo di analisi, il kit deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale di settore (Ministero della Salute o ente similare).
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti non talcati ed occhiali. Evitare di utilizzare oggetti appuntiti (aghi) e taglienti (lame). Tutto il personale interessato deve essere addestrato alle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA, e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale impiegato nel trattamento dei campioni deve essere vaccinato contro HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente di laboratorio deve essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici a trasmissione per via aerea.
7. I componenti A e B sono fotosensibili. Occorre quindi proteggerli dall'esposizione a luce intensa.
8. Evitare vibrazioni sulla superficie del banco dove viene eseguita l'analisi.
9. Al ricevimento, riporre il kit in un frigorifero a temperatura controllata o in una camera fredda a una temperatura di +2/+8°C.
10. Non mischiare i componenti dei kit di diversi lotti. Inoltre, non mischiare i componenti di kit diversi, nemmeno se provengono dallo stesso lotto.
11. Assicurarsi che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. In caso contrario, informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie alla sostituzione del kit.
12. Evitare la contaminazione crociata tra campioni, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione.

13. Evitare la contaminazione crociata tra reagenti del kit, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni uso.

14. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta del confezionamento esterno.

15. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di sangue/plasma/liquido amniotico umano devono essere trattati al livello 2 delle norme di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA e nel rispetto delle norme riportate nella pubblicazione degli Institutes of Health's: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

16. Conservare ed estrarre i campioni separatamente da altri reagenti e usare una stanza separata per la loro manipolazione.

17. Dissolvere i reagenti liofilizzati con la quantità corretta, (riportata sulle etichette) del componente C (codificato: ALL/C) in dotazione nel kit.

18. Effettuare tutte le necessarie operazioni nel minor tempo possibile, conservando i componenti su ghiaccio o in un blocco refrigerante.

19. Il flusso di lavoro del laboratorio deve procedere in maniera unidirezionale, partendo dall'area di estrazione e spostandosi verso le aree di amplificazione e di analisi dati. Non riportare campioni, attrezzatura e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti.

20. Si raccomanda l'uso di materiale monouso in plastica per la preparazione dei componenti liquidi o per il trasferimento dei componenti nelle stazioni di lavoro automatiche, per evitare la contaminazione crociata.

21. I materiali di rifiuto prodotti utilizzando il kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalle procedure di estrazione dei campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e inattivati prima dello smaltimento. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.

22. Spargimenti accidentali da campioni o da operazioni in corso devono essere eliminati con carta assorbente imbevuta di candeggina per uso domestico e poi con acqua. La carta assorbente utilizzata deve essere gettata negli appositi contenitori per rifiuti di laboratorio od ospedalieri.

23. Gli altri materiali di rifiuto generati (ad esempio: puntali usati per campioni) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti in conformità alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

## H. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue deve essere prelevato da una vena in asepsi, mentre il plasma deve essere preparato utilizzando le procedure standard per le analisi cliniche di laboratorio.

2. La raccolta di liquido amniotico deve essere effettuata dopo 16 settimane dall'inizio della gestazione dietro controllo ecografico continuo, seguendo le linee guida cliniche definite e approvate.

3. Non è stata osservata alcuna influenza nella preparazione del campione in presenza di citrato o EDTA.

Attenzione: l'eparina ( $\geq 10$  UI/ml) condiziona le reazioni di PCR. Non usare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. Inoltre, non usare campioni di pazienti eparinizzati.

4. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni.

5. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati.

6. I campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattescenti) devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati. I campioni contenenti residui di fibrina, particelle pesanti o filamenti e corpuscoli microbici devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati.

7. Se non utilizzati immediatamente, plasma e liquido amniotico devono essere conservati a -20/-80°C dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati congelati a -80°C per diversi mesi. Qualsiasi campione congelato non deve essere congelato/scongelato più di una volta, perché questo potrebbe inficiare il risultato del test.

8. I campioni di plasma per estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA secondo le comuni procedure di laboratorio, trasportati e conservati a +2/+8 °C per un periodo massimo di 4 ore. I campioni di plasma possono essere conservati congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70 °C per periodi più lunghi.

9. I campioni di liquido amniotico devono essere centrifugati prima dell'estrazione del DNA e dissolti in PBS secondo le comuni procedure di laboratorio. I campioni di liquido amniotico devono essere trasportati e conservati a +2/-8°C per un periodo massimo di 4 ore. I campioni di liquido amniotico possono essere conservati congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi.

10. Per una conservazione ottimale dei campioni, si raccomanda di suddividerli in più aliquote (volume minimo 300 µl) e di conservarli congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi. Evitare cicli di congelamento/scongelo ripetuti.

11. Se si utilizzano campioni congelati, scongelarli appena prima dell'estrazione per evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

12. I campioni di sangue periferico intero per estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA in conformità ai regolamenti del laboratorio, trasportati e conservati a +2°C/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni. Non congelare i campioni di sangue periferico intero per evitare lisi cellulare e perdita del titolo virale.

## I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

### Master mix:

Componente A. Pronto all'uso. Miscelare bene nel vortex prima dell'uso e centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.

**ATTENZIONE:** il componente A è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

### Primer/probe:

#### Componente B.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente il componente B liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

**ATTENZIONE:** il componente B è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione a luce intensa.

### Acqua MG:

Componente C. Pronto all'uso.

### Controllo negativo:

NTC. Pronto all'uso.

### Curva Standard:

#### STD.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'STD liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.

- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente
- Preparare le provette prive di nucleasi per la preparazione della curva standard.
- Fare diluizioni seriali 1:10 dell' STD nel componente C (codice: ALL/C) per ottenere i punti della curva standard, come descritto nella tabella sottostante:

Preparazione della curva standard		
<b>STD</b>	<b>Calibratore 60000 copie/µl</b>	Aggiungere il volume del componente C (codice: ALL/C) come indicato sull'etichetta del provette
<b>STD 1</b>	<b>6000 copie/ µl</b>	10 µl (STD) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
<b>STD 2</b>	<b>600 copie/µl</b>	10 µl (STD 1) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
<b>STD 3</b>	<b>60 copie/µl</b>	10 µl (STD 2) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)
<b>STD 4</b>	<b>6 copie/ µl</b>	10 µl (STD 3) + 90 µl di componente C (codice: ALL/C)

**NOTA IMPORTANTE:** per la quantificazione dei campioni espressa in IU/ml fare riferimento alla sezione R

### Controllo interno:

#### I.C.

- Centrifugare la provetta per 1 minuto a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta, evitando dispersioni di polvere.
- Dissolvere omogeneamente l'IC liofilizzato con il volume di componente C (codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Tenerlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <temp. amb.<25°C).
- Vortexare brevemente

## L. STRUMENTI E ACCESSORI USATI IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le **micropipette** devono essere calibrate e sottoposte a regolare decontaminazione (alcool ad uso domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti ad uso ospedaliero) nelle parti che possono accidentalmente venire in contatto con il campione. Devono inoltre essere regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% e un'esattezza di +/-5%.
2. **Dispositivo di estrazione:** il kit CMVDNAQT.2G.CE è destinato all'uso solo insieme a QIAamp DNA Minikit Codice.51306 (QIAGEN) , Nucleospin Blood kit Codice: 740951(Macherey Nagel) , allo strumento di estrazione automatica DIA.FASTEX con NA Body Fluid Codice Kit: D-2021 (Chemagen distribuito da Dia.Pro) e allo strumento di estrazione automatica nucliSENS easyMAG (Biomerieux). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

3. **Termociclatori real-time e versione software:** Il kit CMVDNAQT.2G.CE è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con i termociclatori real-time ABI 7500 versione software SDS 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, versione software MxPro 4.01 (Stratagene), CFX96, software CFX manager version 1.7 (Biorad) e Rotor-Gene Q Series Real-Time PCR, software versione 2.1.0 (Qiagen).

Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

#### M. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza stampata sull'etichetta esterna della scatola contenente il kit. Non utilizzare il kit se è scaduto.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili ad occhio nudo o aggregati. Controllare che sul fondo delle provette contenenti i componenti liofilizzati sia presente un aggregato ben formato. Accertarsi che il prodotto non si sia danneggiato durante il trasporto e che non sia presente alcuna fuoriuscita di liquidi all'interno della scatola.
3. Dissolvere i componenti liofilizzati con la quantità appropriata di componente C (codice: ALL/C) come descritto nel relativo paragrafo (I).
4. Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il profilo termico corretto.
5. Per l'impostazione corretta dei termociclatori real-time, seguire rigorosamente il manuale dello strumento fornito dai produttori.
6. Verificare che le micropipette siano impostate ai volumi corretti.
7. Controllare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
8. In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

#### N. PROCEDURA D'ANALISI

Il test deve essere eseguito secondo le istruzioni qui di seguito riportate.

##### N.1 Estrazione del DNA

La fase estrattiva del DNA genomico del CMV deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

##### Estrazione manuale

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Plasma/Sangue / Liquido amniotico	Nucleospin Blood	740951	MN™
Plasma/Sangue / Liquido amniotico	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™

##### Estrazione Automatica

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore	Strumento
Plasma/Sangue/ Liquido amniotico	NA Body Fluid Kit	D-2021	Chemagen distributed by Dia.Pro	DIA.FASTEX

**N.B.:** prima dell'isolamento del DNA, centrifugare i campioni di liquido amniotico (10.000 g, 5 min.), eliminare il surnatante e dissolvere il pellet in 200 µl di PBS sterile).

Campione	Protocollo	Soluzioni del kit	Codice	Produttore	Strumento
Blood	General Protocol	NucliSENS Lysis Buffer	200292	Biomérieux	NucliSENS easyMAG
		NucliSENS easyMAG Lysis Buffer	280134		
		NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 1	280130		
		NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 2	280131		
		NucliSENS easyMAG Extraction Buffer 3	280132		
		NucliSENS easyMAG Magnetic Silica	280133		

L'isolamento del DNA deve essere eseguito esclusivamente in conformità al manuale d'istruzioni fornito dal produttore (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro, Biomérieux).

**ATTENZIONE:** Utilizzare esclusivamente i seguenti volumi nelle procedure di estrazione:

Description	Sample volume (µl)	Elution volume (µl)
Nucleospin Blood	200	100
QIAamp DNA mini kit®	200	100
NA Body Fluid Kit	200	100
NucliSENS easyMAG System (General Protocol)	100	55

Il DNA estratto dai campioni, non utilizzato nella sessione di analisi, deve essere adeguatamente conservato a temperatura controllata (da -20°C a -80°C).

**Nota importante:** l' IC del kit CMVDNAQT.2G.CE Kit può essere inserito nella procedura d'isolamento del DNA come controllo di estrazione.

Il valore Ct del controllo interno viene usato per stabilire se la procedura di estrazione del DNA è stata eseguita correttamente (vedere il paragrafo Q).

**Per questa applicazione:**

- Nucleospin Blood e QIAamp DNA mini kit: **aggiungere 5 µl di IC alla miscela del tampone di lisi e campione e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione.**

- NA Body Fluid Kit: **aggiungere 5 µl di IC al sangue (protocollo per il sangue) o alla miscela del tampone di lisi e campione (protocollo per il plasma) e procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione.**

- NucliSENS easyMAG System: **aggiungere 5 µl di I.C. dopo il passaggio di lisi e prima di aggiungere la silice o in alternativa aggiungere 55 µl di I.C. direttamente nella provetta della silice (550µl silice+550µl H2O) e dispensare 100 µl della**

**miscela nel campione. Procedere in base al manuale d'istruzioni per l'estrazione fornito dal produttore.**

## **N.2 Impostazione della reazione**

Il kit **CMVDNAQT.2G.CE** è destinato all'uso esclusivamente in combinazione con ABI 7500 software SDS, versione 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P software MxPro, versione 4.01 (Stratagene), CFX96 software CFX manager versione 1.7 (Biorad) e Rotor-Gene Q Series Real-Time PCR (Qiagen).

### **N.2.1 Preparazione della PCR**

**Importante:** nel paragrafo O è riportato un esempio di schema di dispensazione, che occorre consultare prima di iniziare le operazioni descritte di seguito.

- Preparare i componenti come descritto nel paragrafo I.
- Preparare il numero richiesto di provette di reazione oppure una piastra di reazione a 96 pozzetti per i campioni in esame e per la curva standard (preparati come descritto nel paragrafo I).

**Nota importante:** usare solo provette ottiche o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori real-time.

- Prendere in considerazione il fatto che i campioni dovrebbero essere possibilmente analizzati in duplicato.
- Includere almeno 1 provetta per il controllo negativo (NTC).
- Preparare la **miscela di amplificazione** per **campioni, NTC e curva standard** come da tabella seguente:

#### **Preparazione della miscela di amplificazione** **(I.C. come controllo di amplificazione)**

Numero di reazioni		x1	x12
<b>A</b>	Master mix	15 µl	180 µl
<b>B</b>	Primer/probe	2 µl	24 µl
<b>I.C.</b>	Controllo interno	0,5 µl	6 µl
<b>C</b>	MG Water	2,5 µl	30 µl
<b>Volume totale</b>		<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

**Nota importante:** se il controllo interno è stato aggiunto durante la procedura d'isolamento del DNA, preparare la **miscela di amplificazione** per **campioni, NTC e curva standard** come indicato nella tabella seguente:

#### **Preparazione della miscela di amplificazione** **(I.C. come controllo di estrazione/amplificazione)**

Numero di reazioni		x1	x12
<b>A</b>	Master mix	15 µl	180 µl
<b>B</b>	Primer/probe	2 µl	24 µl
<b>C</b>	Acqua MG	3 µl	36 µl
<b>Volume totale</b>		<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

## **N.2.2 Procedura di amplificazione**

- Dispensare 20 µl di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastra.
- Aggiungere 10 µl di **campioni, NTC e curva standard** alle provette di reazione.
- Chiudere bene le provette di reazione.
- Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 rpm.
- Non lasciare le provette di reazione a temperatura ambiente per più di 30 minuti ed esposte alla luce (coprire le provette).
- Caricare le provette nel termoblocco dello strumento real-time.  
Dopo aver impostato lo strumento real-time come descritto nel paragrafo N3 (Programmazione dello strumento), procedere con la sessione di analisi.

**Nota importante:** Dopo risospensione nel componente C (Codice: ALL/C), i componenti liofilizzati sono stabili per non più di 3 ore, se conservati in ghiaccio oppure a una temperatura di 2°-8°C. Alla fine della sessione di lavoro, smaltire in modo appropriato il materiale rimasto dei punti di diluizione dello STD. Il volume non utilizzato di componente B, STD e I.C. può essere congelato a -20°C ed utilizzato come descritto nella Sezione E.

## **N.3 Programmazione dello strumento**

Per la programmazione dello strumento, fare riferimento al manuale d'istruzioni della strumentazione fornito dai produttori.

**Nota importante:** per Mx3000P impostare "Filter set gain settings": ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

### **N.3.1 Profilo termico**

Il **profilo termico** è riportato nella seguente tabella:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	50°C	2 min
2	1	95°C	10 min
3	50	95°C	15 sec
		60°C (*)	1 min

**\*NOTA IMPORTANTE:** (\*) fase per la raccolta dei dati in tempo reale

ATTENZIONE: programmare il profilo termico corretto sullo strumento real-time seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

### **N.3.2 Scelta dei fluorofori**

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali dei termociclatori real-time (ABI 7500, BioRad CFX96 e MX3000P Stratagene), scegliere i fluorofori indicati nella tabella riportata qui sotto:

Determinazione	Reporter	Quencher
CMV	FAM	Non fluorescente
Controllo interno (IC)	JOE/VIC	Non fluorescente
Passive Reference	ROX	Non presente

Seguendo le istruzioni contenute nel manuale del termociclatore real-time Rotor-Gene Q Qiagen, scegliere i canali di lettura come indicato nella tabella riportata qui sotto:

Determinazione	Canale di lettura
CMV	VERDE
Internal Control (I.C.)	GIALLO

ATTENZIONE: prestare attenzione durante la programmazione e l'impostazione dello strumento real-time seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

#### O. SCHEMA DEL TEST

Di seguito è riportato un esempio di schema di dispensazione per l'analisi quantitativa:

##### Micropiastrea o provette

	1	2	3
A	STD 1	Campione 4	
B	STD 2	Campione 5	
C	STD 3	Campione 6	
D	STD 4	Campione 7	
E	NTC	Campione 8	
F	Campione 1	Campione 9	
G	Campione 2	Campione 10	
H	Campione 3	Campione 11	

Legenda: NTC = controllo negativo STD 1,2,3,4 = curva standard del DNA del CMV, Campione 1,2,3 = campioni in esame.

#### P. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

##### P.1 Impostazione preanalisi

Prima di cominciare l'interpretazione dei dati:

Per i termociclatori Real-Time **ABI7500** Applied Biosystems, **CFX96** BioRad e **Mx3000P** Stratagene,

- impostare il "baseline" (livello di fluorescenza di base) come indicato nella tabella seguente:

"Baseline"	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Auto Baseline
STRATAGENE™ MX3000P®	Adaptive Baseline ( <i>non usare</i> Mx4000 v1.00 to v3.00 algorithm)
BIORAD™ CFX96®	Auto calculated Baseline

Per il termociclatore Real-Time **ROTOR-GENE Q SERIES**

Qiagen:

- Selezionare "Analysis" dalla barra degli strumenti;
- Dalla finestra di analisi selezionare "Quantitation";
- Selezionare entrambi i canali di lettura, verde e giallo, quindi premere il tasto "show";
- Selezionare le voci "Dynamic Tube" e "Slope Correct" nell'analisi di quantificazione

Sugli strumenti Real-Time validati impostare manualmente la

"Threshold" di fluorescenza FAM/JOE/VIC/VERDE/GIALLO.

"Threshold" FAM/VERDE	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.15
STRATAGENE™ MX3000P®	0.15
BIORAD™ CFX96®	600
Rotor-Gene Q series	0.04

"Threshold" JOE/VIC/GIALLO	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.1
STRATAGENE™ MX3000P®	0.02
BIORAD™ CFX96®	200
Rotor-Gene Q series	0.03

##### P.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sui calibratori STD ogni volta che il kit viene usato per verificare se i loro valori Ct sono quelli previsti e riportati nella tabella seguente.

ABI™PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P® - QIAGEN™ ROTOR-GENE Q	
Controllo FAM	Requisiti
STD 1	22,0 < Ct (Threshold Cycle) < 24,5
STD 2	25,5 < Ct (Threshold Cycle) < 28,5
STD 3	29,0 < Ct (Threshold Cycle) < 32,0
STD 4	32,0 < Ct (Threshold Cycle) < 35,5

BIORAD™ CFX96®	
Check FAM	Requirements
STD 1	23,0 < Ct (Threshold Cycle) < 25,5
STD 2	26,5 < Ct (Threshold Cycle) < 29,5
STD 3	30,0 < Ct (Threshold Cycle) < 33,0
STD 4	33,0 < Ct (Threshold Cycle) < 36,5

Inoltre, vengono controllati i valori di slope e R<sup>2</sup> per verificare la qualità della sessione di analisi. Devono essere soddisfatti i requisiti seguenti.

Controllo FAM	Requisiti
Slope	-3,1 < slope < -3,9

Controllo FAM	Requisiti
Efficienza	R <sup>2</sup> > 0,98

#### Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione, si parte dal presupposto che la fluorescenza FAM (valore Ct positivo/negativo) e la fluorescenza JOE/VIC del controllo interno convalidino la determinazione del CMV come descritto nella tabella seguente:

<b>FAM CMV</b>	<b>JOE/VIC controllo interno</b>	<b>Risultato del test</b>
CAMPIONE POSITIVO	20 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**
CAMPIONE NEGATIVO	20 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o indeterminato	NON VALIDO**

**IMPORTANTE:** Una concentrazione iniziale elevata del DNA del CMV (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale di fluorescenza RIDOTTO del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.

\*\* Potrebbero essersi verificati problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficiente o assente) o durante la fase di estrazione (presenza di inibitori o campione iniziale contenente un numero di cellule insufficiente) con un risultato conseguentemente errato. La procedura di analisi deve essere ripetuta partendo dalla fase di estrazione con un nuovo campione proveniente dallo stesso paziente.

Per ogni campione positivo determinato mediante il kit codificato CMVDNAQT.2G.CE è possibile effettuare una quantificazione corretta della carica virale come indicato nelle seguente tabella:

<b>DATI ANALITICI</b>	<b>DATI DIAGNOSTICI</b>
<b>Dati campione della sessione di analisi per il CMV (copies/μl)</b>	<b>Carico virale del CMV (copies/ml)</b>
Quantità > 2.0E+05	Carico virale CMV > 1.0E+08
1.0E+00 ≤ Qtà ≤ 2.0E+05	<b>QUANTIFICAZIONE</b>
Quantità < 1.0E+00	Carico virale CMV < 5.0E+02

**NOTA IMPORTANTE:** per la quantificazione dei campioni, consultare il paragrafo R.

I risultati ottenuti con il kit CMVDNAQT.2G.CE Kit devono essere interpretati dal responsabile di laboratorio, tenendo in considerazione i sintomi clinici dei pazienti e gli altri marker d'infezione analizzati.

Sono possibili i seguenti risultati:

**Tabella di risoluzione dei problemi**

	<b>FAM</b>	<b>JOE/VIC</b>	<b>Risultato</b>	<b>CONTROLLO</b>
CAMPIONE sconosciuto	+	+	RISULTATO CORRETTO <u>Positivo</u>	<b>IMPORTANTE:</b> una concentrazione iniziale elevata del DNA del CMV (segnale FAM positivo) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.
CAMPIONE sconosciuto	+/-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: inibizione, errore nella procedura o mancato funzionamento degli strumenti	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori di determinazione scelti siano FAM per la determinazione del CMV e JOE/VIC per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente; 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta; 7. la procedura di estrazione sia stata eseguita correttamente.
CAMPIONE sconosciuto	-	+	RISULTATO CORRETTO <u>Negativo</u>	

STD	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	Un segnale JOE/VIC negativo è corretto solo se il controllo interno IC è usato come controllo di estrazione
STD	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano FAM per la determinazione del CMV e JOE/VIC per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente; 6. nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta.
STD	-	+	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: errore nel pipettaggio oppure nella procedura	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. i fluorofori scelti siano FAM per la determinazione del CMV e JOE/VIC per la determinazione dell'I.C.; 4. l'analisi sia stata condotta con l'impostazione degli strumenti corretta; 5. il kit sia stato conservato correttamente.
NTC	-	+/-	RISULTATO CORRETTO	Un segnale JOE/VIC negativo è corretto solo se il controllo interno IC è usato come controllo di estrazione
NTC	+	+/-	ATTENZIONE! POSSIBILITÀ DI: contaminazione	1. i componenti siano stati preparati correttamente; 2. non siano stati commessi errori nella preparazione del test; 3. lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a regolari intervalli; 4. il kit sia stato conservato correttamente.

**Note importanti:**

1. *l'interpretazione dei risultati deve essere condotta dietro supervisione del responsabile di laboratorio, al fine di ridurre il rischio di errori di giudizio o di interpretazioni errate.*
2. *Al momento della trasmissione dei risultati del test dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione a evitare trasferimenti di dati erronei.*

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti del RISULTATO DEL TEST CORRETTO indicati sopra, passare al paragrafo successivo.

Se si presentano uno o più problemi tra quelli precedentemente descritti, dopo il controllo informate il supervisore di qualsiasi problema residuo per l'eventuale adozione di ulteriori misure.

**R. QUANTIFICAZIONE**

I calibratori STD vengono trattati come campioni e durante la fase di amplificazione se ne utilizza lo stesso volume, 10μl. La concentrazione dei calibratori STD viene espressa in copie/μl. La **concentrazione del genoma virale per ml** del campione di ogni paziente si calcola applicando la formula seguente:

$$\text{Risultati (copies/ml)} \equiv \frac{\text{copies/}\mu\text{l (dati sessione di analisi)} \times \text{volume eluizione campione } (\mu\text{l})}{\text{Volume di estrazione dei campioni (ml)}}$$

### Esempio:

Risultati (copie/ml)  $\equiv \frac{1500 \times 100}{0.2}$

Risultati (copie/ml)  $\equiv 7.5 \text{ E}+05$

Per convertire la carica virale dei campioni da copie/ml a IU/ml utilizzare il fattore di conversione appropriato secondo quanto riportato nella tabella sottostante:

Strumento Real-Time	Fattore di Conversione	Risultato (IU/ml) (*)
ABI™ PRISM® 7500 SDS	1.00	copie/ml x 1.00
STRATAGENE™ MX3000P®	1.00	copie/ml x 1.00
BIORAD™ CFX96®	1.00	copie/ml x 1.00
ROTOR-GENE Q	0.92	copie/ml x 0.92

\*calibrato sul 1° WHO Standard Internazionale (NIBSC code 09/162)

### Esempio:

Per ABI7500/Mx3000P/CFX96 Risultato (copie/ml) = 7.5 E+05  
Risultato (IU/ml) = 7.5 E+05

Per Rotor-Gene Q Risultato (copie/ml) = 7.5 E+05  
Risultato (IU/ml) = 6.9 E+05

## S. PERFORMANCE

La valutazione delle performance è stata eseguita in conformità a quanto indicato nelle specifiche tecniche interne o ITS.

La valutazione delle performance è stata condotta presso i laboratori di DiaPro su materiali forniti dai laboratori medici di riferimento.

### S.1 SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica può essere espressa come **limite di determinazione** e come **limite di quantificazione**.

**Limite di determinazione (Limit of detection-LOD):** è la quantità minima del target che può essere determinata da un sistema con una probabilità dichiarata.

Per i test NAT, viene espresso come concentrazione minima dell'analita che, dopo ripetizioni multiple del test, fornisce un risultato positivo.

Il **limite di determinazione (LOD)** si stabilisce analizzando diluizioni seriali contenenti concentrazioni note dell'analita.

Il **LOD** è la concentrazione minima di analita che può essere determinata con probabilità  $\geq 95\%$  nei campioni in esame.

Per il kit CMVDNAQT.2G.CE Kit, il **LOD** è stato determinato analizzando diluizioni seriali 1:5 e 1:2 (8 replicati per tre sessioni di analisi diverse) di un plasmide recante la sequenza virale target.

I risultati sono stati analizzati mediante un'analisi **Probit** per stabilire il limite di determinazione al 95%.

I risultati dell'analisi **PROBIT** sono i seguenti:

Limite di determinazione LOD (p=0,05)	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.57 copie/ µl
STRATAGENE™ MX3000P®	0.62 copie/ µl
BIORAD™ CFX96®	0.85 copie/ µl
ROTOR-GENE Q	0.57 copie/ µl

#### S.1.1 Limite di quantificazione

Il **limite di quantificazione** è stato stabilito misurando la **linearità**, il **range dinamico** e la **riproducibilità**.

La **linearità** è la misura del grado al quale una curva si avvicina ad una linea retta. Viene espressa con il valore **SLOPE**.

Il **range dinamico** è l'intervallo delle concentrazioni di analita per le quali il valore di output finale (ciclo di soglia Ct) del sistema è

direttamente proporzionale alla concentrazione di analita, con esattezza e precisione accettabili.

I limiti del range dinamico sono i limiti di quantificazione inferiore e superiore (**Limite di quantificazione**).

Per il kit CMVDNAQT.2G.CE è stata preparata una curva di diluizione di un campione CMV positivo a concentrazione nota (copies/ul). I punti di diluizione sono stati analizzati nel loro insieme ed è stato determinato il loro Ct (ciclo di soglia).

Per il kit CMVDNAQT.2G.CE eseguito su ABI 7500, Mx3000P, e BioRad CFX96 il **limite superiore di quantificazione** è  $5.30 \log_{10}$  ( $2.0 \text{E}+05$  copies/ul) e il **limite inferiore di quantificazione** è  $0.00 \log_{10}$  ( $1.0 \text{E}+00$  copies/ul).

Il range dinamico è stato inoltre determinato con diluizioni seriali del 1° WHO Standard Internazionale per HCMV (NIBSC codice 09/162). Per il kit CMVDNAQT.2G.CE eseguito su ABI 7500, Mx3000P, BioRad CFX96 e Qiagen Rotor-Gene Q il **limite superiore di quantificazione** è  $6.70 \log_{10}$  ( $5.0 \text{E}+06$  IU/ml) e il **limite inferiore di quantificazione**  $2.70 \log_{10}$  ( $5.0 \text{E}+02$  IU/ml).

### S.2 SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica è la capacità del metodo di determinare solo la sequenza del DNA target.

La specificità dell'analisi del DNA del CMV è stata studiata come segue:

- il set di primer/probe è stato scelto analizzando la sequenza target del genoma con un software appropriato (LionSoft v.1.0 fornito da Biotools e Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
- il set primer/probe e la sequenza target del genoma sono stati controllati con il software "BLAST", per verificare se una qualsiasi delle sequenze di nucleotidi depositati nelle banche dei genomi in tutto il mondo presentino qualunque omologia con il CMV, nonché con il software "ClustalX" per confrontare le sequenze target del genoma dei diversi genotipi del CMV.
- La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
- Sono stati analizzati campioni di pazienti con infezioni dovute a organismi potenzialmente interferenti, ottenuti da un centro medico di riferimento.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Organismo	Risultato
VZV	negativo
EBV	negativo
HHV6	negativo
HHV8	negativo
HSV1	negativo
HSV2	negativo

### S.3 SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ

#### S.3.1 Specificità diagnostica:

La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato negativo in assenza di un marker target. In questo modo, il risultato **vero negativo** è un campione sicuramente negativo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Questo parametro è stato studiato esaminando 19 campioni di plasma e 83 campioni di sangue negativi per il DNA del CMV:

Campioni negativi per il DNA del CMV	
VERI NEGATIVI	102
FALSI POSITIVI	0
CAMPIONI TOTALI	102
SPECIFICITÀ %	100

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una **specificità diagnostica del 100%**

### S.3.2 Sensibilità diagnostica

La **sensibilità diagnostica** è la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato positivo in presenza del marker bersaglio. In questo modo, il risultato **vero positivo** è un campione sicuramente positivo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Per il kit codice CMVDNAQT.2G.CE, il parametro è stato studiato esaminando 14 campioni di plasma e 28 campioni di sangue positivi per il DNA di CMV:

VERI POSITIVI	42
FALSI NEGATIVI	0
CAMPIONI TOTALI	42
<b>SENSIBILITÀ %</b>	<b>100</b>

Inoltre, è stato testato il pannello Cytomegalovirus QCMD 2005 e QCMD 2006. Il pannello QCMD 2005 contiene 10 campioni CMV positivi di plasma e 2 campioni di plasma CMV negativi, il pannello QCMD 2006 contiene 8 campioni di plasma CMV positivi e 2 campioni di plasma CMV negativi

**Sulla base dei risultati ottenuti, la sensibilità diagnostica del sistema è stata calcolata come 100%.**

<b>Sensibilità diagnostica</b>	100 %
<b>Specificità diagnostica</b>	100 %

### S.4 PRECISIONE

La precisione mostra il grado di attendibilità del sistema. Ogni procedura di misurazione ha una variazione casuale intrinseca chiamata "errore casuale". L'errore casuale non ha un valore numerico, ma è determinato dalla dispersione della misurazione espressa come deviazione standard (DevST) e coefficiente di variazione (CV%). Normalmente, la precisione di un test si riferisce alla concordanza tra le misurazioni ripetute dello stesso materiale.

Per il kit CMVDNAQT.2G.CE la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. 4 punti di diluizione in 8 replicati sono stati analizzati nella stessa sessione (intra-assay) e in tre sessioni diverse (inter-assay).

Le variabilità intra-assay e inter-assay sono state calcolate sulla base dei risultati ottenuti.

In assenza di parametri internazionali stabiliti, abbiamo identificato il valore di accettabilità seguente per il kit CMVDNAQT.2G.CE:

**coefficiente di variazione intra-assay (CV%)  $\leq$  10%;**

**coefficiente di variazione inter-assay (CV%)  $\leq$  10%.**

### T. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utilizzatore finale di questo kit di leggere attentamente e comprendere l'inserito allegato alla confezione. È necessaria la massima osservanza del protocollo per ottenere risultati attendibili. In particolare, il pipettaggio di campioni e reagenti, l'applicazione di un flusso di lavoro corretto, insieme all'attenta programmazione del termociclatore sono fondamentali per una determinazione e una quantificazione accurate e riproducibili del DNA del CMV.

La determinazione del DNA del CMV nel campione di un paziente ha vaste implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche. Si raccomanda quindi che riservatezza, supporto appropriato e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

### U. BIBLIOGRAFIA

1. Diagnosis Herpesvirus Infections by Real-Time Amplification and Rapid Culture. Van Doornum G.J.J., Guldemeester J., Osterhaus A.D.M.E., Niesters H.G.M. J. Clin. Microbiol., 2003; 41:576-580.
2. Validation of clinical application of Cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. Kalpoe J.S., Kroes A.C.M., de Jong M.D., Schinkel J., de Brouwer C.S., Beersma M.F.C., Claas E.C.J. J. Clin. Microbiol., 2004; 42: 1498-1504.
3. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. Dunn W., Chou C., Li H., Hai R., Patterson D., Stolc V., Zhu H., Liu F. PNAS, 2003;100:14223-14228.
4. Detection of citomegalovirus (CMV) DNA in EDTA whole-blood samples: evaluation of the quantitative *artus* CMV LightCycler PCR kit in conjunction with automated sample preparation. Michelin B.D.A., Hadzisejdic I., Bozic M., Grahovac M., Hess M., Grahovac B., Marth E., Kessler H.H. J. Clin. Microbiol., 2008; 46:1241-1245.
5. DNA microarrays of the Complex Human Cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. Chambers J., Angulo A., Amaratunga D., Guo H., Jiang Y., Wan J.S., Bittner A., Frueh K., Jackson M.R., Peterson P., Erlander M.G., Ghazal P. J. Virol., 1999; 73:5757-5766.
6. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR. Visconti M.R., Pennington J., Garner S.F., Allain JP., Williamson L.M. Blood, 2004; 103:1137-1139.
7. Comparative analysis of human cytomegalovirus a-sequence in multiple clinical isolates by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assays. Zaia J.A., Gallez-Hawkins G., Churchill M.A., Morton-Blackshere A., Pande H., Adler S.P., Schmidt G.M., Forman S.J. J. Clin. Microbiol., 1990; 28:2602-2607.
8. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine Laboratory testing. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. III, Smith T.F. Clin. Microbiol. Rev.2006; 19:165-256.

## Simboli

LEGENDA			
	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto		Produttore
	Data di scadenza		Numero di test
	Marchio di conformità CE		Data di produzione

Tutti i Prodotti IVD sono fabbricati dall'Azienda nell'ambito e sotto il controllo di un Sistema di Qualità certificato e approvato da un Organismo Notificato Europeo. Ogni lotto è sottoposto ad una procedura di Controllo di Qualità e rilasciato alle vendite solo se conforme alle specifiche tecniche comuni Europee e ai criteri di accettabilità definiti.

  
0318



## CONTATTI DISTRIBUTORE

### 4BShop Lab Srls

-  [info@4BShopLab.com](mailto:info@4BShopLab.com)
-  [www.4BShopLab.com](http://www.4BShopLab.com)
-  +39.0371.18.56.643

## FABBRICANTE

**Dia.Pro -Diagnostic Bioprobes Srl**



 **100% MADE IN ITALY**

**EN ISO 13485:2013 Certified**

