

Novembre 2018

Manuale dell'*artus*[®] CMV TM PCR Kit



24 (n. di catalogo 4503163)

96 (n. di catalogo 4503165)

Diagnostica quantitativa in vitro

Per l'uso con i sistemi di rilevamento delle sequenze *ABI PRISM*[®] 7000, 7700 e 7900HT

Novembre 2018 – Versione 1



4503163, 4503165



1115297IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R4

MAT

1115297IT

Sommario

1.	Sommario.....	4
2.	Conservazione.....	5
3.	Materiali e dispositivi supplementari richiesti	5
4.	Precauzioni generali	6
5.	Informazioni sull'agente patogeno.....	6
6.	Principio della real-time PCR.....	7
7.	Descrizione del prodotto	7
8.	Protocollo	8
8.1	Fasi preliminari dell'analisi: Prelievo, conservazione e trasporto dei campioni	8
8.2	Estrazione del DNA	10
8.3	Controllo interno.....	10
8.4	Quantificazione.....	12
8.5	Preparazione della PCR.....	13
8.6	Programmazione di <i>ABI PRISM SDS</i>	19
9.	Analisi dei dati.....	37
10.	Risoluzione dei problemi	42
11.	Specifiche	45
11.1	Sensibilità analitica.....	45
11.2	Specificità.....	47
11.3	Precisione	49
11.4	Robustezza	51
11.5	Riproducibilità	51

11.6	Valutazione diagnostica	51
12.	Limiti per l'uso del prodotto.....	53
13.	Informazioni sulla sicurezza.....	53
14.	Controllo di qualità.....	54
15.	Bibliografia	54
16.	Spiegazione dei simboli.....	55
17.	Informazioni per gli ordini.....	56

artus CMV TM PCR Kit

Kit da utilizzare con i sistemi di rilevamento delle sequenze *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT* per la rilevazione quantitativa del DNA di CMV da plasma trattato con EDTA.

Attenzione: l'*artus* CMV TM PCR Kit non può essere utilizzato né in combinazione con il *GeneAmp® 5700 SDS* né con il formato a 384 piastre del sistema *ABI PRISM 7900HT SDS*.

1. Sommario

Etichettatura e sommario		N. art. 4503163	N. art. 4503165
		24 reazioni	96 reazioni
Blu	<i>CMV TM Master</i>	2 x 12 reazioni	8 x 12 reazioni
Giallo	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol^a</i>	1 x 600 µl	1 x 600 µl
Rosso	<i>CMV LC/RG/TM QS 1^a</i> <i>1 x 10⁴ copie/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	<i>CMV LC/RG/TM QS 2^a</i> <i>1 x 10³ copie/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	<i>CMV LC/RG/TM QS 3^a</i> <i>1 x 10² copie/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rosso	<i>CMV LC/RG/TM QS 4^a</i> <i>1 x 10¹ copie/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Verde	<i>CMV TM IC^a</i>	1 x 1000 µl	2 x 1000 µl
Bianco	<i>Acqua (grado PCR)</i>	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

QS = Standard di quantificazione

IC = Controllo interno

Mg-Sol = Soluzione di magnesio

2. Conservazione

I componenti dell'*artus* CMV TM PCR KIT devono essere conservati ad una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare di scongelarli e congelarli più di due volte, poiché ciò potrebbe ridurre la sensibilità del test. Se si prevede un uso intermittente dei reagenti, congelarli in aliquote. La conservazione a 4 °C non deve superare un periodo di cinque ore.

3. Materiali e dispositivi supplementari richiesti

- Guanti monouso non talcati
- Kit di estrazione del DNA (vedi 8.2 Estrazione del DNA)
- Pipette (regolabili)
- Puntali per pipette sterili e dotati di filtro
- Agitatore vortex
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per micropiastre (facoltativa)
- Piastre di reazione a 96 pozzetti/provette di reazione per misurazione ottica con corrispondenti materiali di chiusura ottica* (vedi 8.5 Preparazione della PCR)
- Rack di supporto costituito da due parti a 96 pozzetti per l'uso con le provette di reazione ottiche (*96-Well Tray/Retainer Set*, n. cat. 403 081, Applied Biosystems), vedi 8.5 Preparazione della PCR
- Compression pad per l'uso con le pellicole adesive ottiche (*Optical Cover Compression Pads*, n. cat. 4 312 639, Applied Biosystems), vedi 8.5 Preparazione della PCR.

* L'uso delle provette di reazione per analisi ottiche con tappi bombati è ammesso esclusivamente con il sistema *ABI PRISM 7700 SDS* e richiede un adattamento del tempo di esposizione (vedi 8.6.2 Programmazione di *ABI PRISM 7700 SDS*, 8.6.2.5 Altre impostazioni importanti).

- Applicatore per la sigillatura delle piastre di reazione tramite pellicole adesive ottiche (*Adhesive Seal Applicator Kit*, n. cat. 4 333 183, Applied Biosystems)
- *ABI PRISM 7000* (versione software 1.0.1), *7700* (versione software 1.9.1) o *7900HT SDS* (versione software 2.1)

Attenzione: in fase di messa in funzione degli strumenti è assolutamente necessario eseguire una calibrazione valida dei coloranti [*Pure Spectra Component File* (File componenti spettrali puri)] e del fondo [*Background Component File* (File componenti fondo)].

4. Precauzioni generali

L'utente deve prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni:

- Utilizzare puntali per pipette sterili con filtri.
- Conservare ed estrarre i materiali positivi (campioni, controlli e ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerli alla miscela di reazione in un ambiente fisicamente separato.
- **Prima dell'inizio del test scongelare accuratamente tutti i componenti a temperatura ambiente.**
- Una volta scongelati, miscelare i componenti e sottoporli a breve centrifugazione.
- Operare rapidamente su ghiaccio o nel blocco di raffreddamento.

5. Informazioni sull'agente patogeno

Il citomegalovirus umano (CMV) è presente nel sangue, nei tessuti e in quasi tutte le secrezioni di soggetti infetti. La trasmissione può avvenire per via orale, sessuale, intrauterina o perinatale, **tramite trasfusione di sangue o trapianto d'organo**. L'infezione da CMV produce spesso uno stato asintomatico, accompagnato da una persistenza del virus nell'organismo per tutta la vita.

In caso di manifestazione dei sintomi, sia nei ragazzi sia negli adulti, è evidente una somiglianza con la mononucleosi, con febbre, lieve epatite e malessere generale. Sono stati osservati decorsi gravi dell'infezione da CMV, soprattutto nei soggetti infettati per via intrauterina e nei pazienti immunodeficienti.

6. Principio della real-time PCR

Per la diagnosi tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono amplificate specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Nella PCR in tempo reale la rilevazione del prodotto di amplificazione richiede l'impiego di coloranti fluorescenti, di solito legati a sonde oligonucleotidiche, che si legano in modo specifico al prodotto di amplificazione. La rilevazione dell'intensità di fluorescenza durante la real-time PCR consente di identificare e quantificare il prodotto interessato senza dover riaprire le provette di reazione al termine della PCR (Mackay, 2004).

7. Descrizione del prodotto

L'*artus* CMV TM PCR Kit è un sistema pronto all'uso per la rilevazione del DNA di CMV tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) nei sistemi di rilevamento delle sequenze *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT*. Il *CMV TM Master* contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di una regione di 105 bp del genoma del CMV. L'amplicone viene rilevato misurando la fluorescenza FAM™ nel sistema *ABI PRISM SDS*. L'*artus* CMV TM PCR Kit contiene anche un secondo sistema di amplificazione eterologa per verificare una possibile inibizione della PCR. Questa viene rilevata come *Controllo interno (IC)* misurando la fluorescenza VIC®/JOE™. In questo modo non viene ridotto il limite di rilevabilità analitica della PCR di CMV (vedi 11.1 Sensibilità analitica). Il kit comprende controlli positivi esterni (*CMV LC/RG/TM QS 1 – 4*) che consentono di determinare la carica dell'agente patogeno. A tale proposito, consultare il paragrafo 8.4 Quantificazione.

Attenzione: il profilo della temperatura per la rilevazione del citomegalovirus con l'*artus* CMV TM PCR Kit **corrisponde ai profili dell'*artus* EBV TM PCR Kit e dell'*artus* HSV-1/2 TM PCR Kit.** Le analisi PCR di questi sistemi *artus* possono essere quindi eseguite e interpretate in una singola sessione. Si prega di attenersi alle raccomandazioni per l'**esecuzione della PCR riportate nei capitoli 8.4** Quantificazione e 9. Analisi dei dati.

8. Protocollo

8.1 Fasi preliminari dell'analisi: Prelievo, conservazione e trasporto dei campioni

Precauzione: tutti i campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi.

Attenzione: secondo alcuni studi attualmente in corso, il plasma trattato con EDTA o con citrato viene considerato il materiale campione più adatto alla rilevazione di CMV. Per questo motivo raccomandiamo l'impiego di questo tipo di campioni con l'*artus* CMV TM PCR Kit.

La **convalida dell'*artus* CMV TM PCR Kit** è stata eseguita con plasma umano trattato con EDTA. **Non sono stati convalidati altri materiali come campioni. Usare solo i kit di estrazione dell'acido nucleico raccomandati (vedi 8.2** Estrazione del DNA) per la preparazione dei campioni.

Utilizzando come campioni certi materiali, si dovranno osservare scrupolosamente alcune istruzioni particolari per il prelievo, il trasporto e la conservazione.

8.1.1 Prelievo dei campioni

Ogni prelievo di sangue causa una lesione dei vasi sanguigni (arterie, vene, capillari). Per questo devono essere utilizzati solo materiali integri e sterili. Per il prelievo di sangue esistono i relativi articoli monouso. Per la punzione delle vene non devono essere utilizzate cannule troppo sottili. Il prelievo venoso dovrebbe avvenire nelle parti appropriate della **piega del gomito, dell'avambraccio o del dorso della mano.** Il sangue va prelevato con provette di prelievo standard (tappo rosso, Sarstedt o provette simili di altri produttori). Dovrebbero essere prelevati 5-10 ml di sangue trattato con EDTA. Miscelare le provette capovolgendole più volte subito dopo la raccolta del campione (8 x, senza agitare).

Attenzione: non usare campioni di soggetti eparinizzati (vedi 8.1.4 Sostanze interferenti).

8.1.2 Conservazione dei campioni

Entro sei ore il sangue intero dovrebbe essere separato in plasma e componenti cellulari tramite centrifugazione a 800-1600 x g per 20 minuti. Il plasma separato deve essere trasferito in provette in propilene sterili. La riuscita del test può essere compromessa da un congelamento ripetuto o da una conservazione prolungata dei campioni.

8.1.3 Trasporto dei campioni

In linea di principio, i campioni devono essere trasportati in un contenitore idoneo **infrangibile**. Si evita così il pericolo potenziale d'infezione dovuto a perdite. I campioni devono essere spediti nel rispetto delle disposizioni locali e statali vigenti per il trasporto di materiali potenzialmente patogeni.*

Il trasporto non deve superare le sei ore. Non si consiglia la conservazione nello stesso luogo del prelievo. È possibile una spedizione tramite posta. Devono però essere osservate le disposizioni legali. Noi raccomandiamo di effettuare il trasporto per corriere. I campioni di sangue vanno spediti refrigerati (2 °C-8 °C) e il plasma separato va surgelato (-20 °C).

8.1.4 Sostanze interferenti

Valori elevati di bilirubina ($\leq 4,5$ mg/dl) e di lipidi (≤ 1.100 mg/dl) e campioni emolitici non influenzano il sistema di analisi del CMV. L'eparina influisce sulla PCR. Per questo non devono essere utilizzati campioni conservati in provette che contengono eparina come anticoagulante. Non si devono utilizzare neppure i campioni di pazienti eparinizzati.

* International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41a edizione, 2000.704.

8.2 Estrazione del DNA

Si raccomanda l'utilizzo del seguente kit di estrazione per isolare il DNA di CMV:

Campione	Kit di estrazione dell'acido nucleico	Numero di catalogo	Produttore	Carrier RNA
Plasma trattato con EDTA	QIAamp® DSP Virus Kit (50)	60704	QIAGEN	incluso

- L'uso di carrier RNA è di fondamentale importanza per l'efficacia dell'estrazione e, quindi, per la resa del DNA/RNA. Per aumentare la stabilità del carrier RNA in dotazione con il QIAamp DSP Virus Kit si consiglia di seguire le istruzioni per la manipolazione e conservazione del carrier RNA (vedi "Preparazione dei reagenti e dei tamponi" nel manuale del QIAamp DSP Virus Kit).
- Il kit di estrazione include tamponi di lavaggio contenenti etanolo. Accertarsi di eseguire una fase di centrifugazione aggiuntiva (3 minuti, 13.000 giri/min) prima dell'eluizione per rimuovere eventuali residui di etanolo. Ciò impedisce eventuali inibizioni della PCR.

Importante: il *Controllo interno dell'artus CMV TM PCR Kit* può essere impiegato direttamente nella procedura di estrazione. Accertarsi di **aggiungere durante l'estrazione un campione negativo di plasma**. Il corrispondente segnale del *Controllo interno* costituisce la **base per valutare l'estrazione** (vedi 8.3 Controllo interno).

8.3 Controllo interno

Il kit include un *Controllo interno (CMV TM IC)*, che permette all'utilizzatore sia di controllare la procedura di estrazione del DNA sia di verificare una possibile inibizione della PCR (vedi Fig. 1). Per tale applicazione aggiungere durante l'estrazione il *Controllo interno* in un rapporto di 0,1 µl per 1 µl del volume di eluizione. Per esempio, se si utilizza il QIAamp DSP Virus Kit, il DNA viene eluito in 60 µl di tampone AE. Si devono aggiungere quindi 6 µl

del *Controllo interno*. La quantità di *Controllo interno* impiegato dipende solo dal volume di eluizione.

Il *Controllo interno* e il carrier RNA (vedi 8.2 Estrazione del DNA) possono essere aggiunti solo:

- alla miscela di tampone di lisi e di campione; oppure
- direttamente al tampone di lisi.

Il *Controllo interno* non deve essere aggiunto direttamente al campione. Se aggiunta al tampone di lisi, la miscela di *Controllo interno* e di tampone di lisi/carrier RNA va usata immediatamente dopo la sua preparazione (la conservazione della miscela a temperatura ambiente o in frigo può portare già dopo poche ore ad un'anomalia del *Controllo interno* e quindi ad una minore efficacia della procedura di estrazione). Non aggiungere il *Controllo interno* e il carrier RNA direttamente al campione.

Si considera riuscita un'estrazione del DNA se il valore Ct del *Controllo interno* di un campione di plasma negativo sottoposto ad estrazione (QIAamp DSP Virus Kit) sui sistemi ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS rientra fra 25,3 e 31,3 (soglia ABI PRISM 7000: 0,2; ABI PRISM 7700 e 7900HT SDS: 0,2). La dispersione indicata è dovuta allo strumento e all'estrazione. Uno scarto maggiore indica problemi nell'estrazione. In questo caso il metodo di estrazione deve essere verificato ed eventualmente convalidato di nuovo. In caso di dubbi o problemi contattare il nostro servizio di assistenza tecnica.

In via opzionale, il *Controllo interno* può essere utilizzato esclusivamente per verificare una possibile inibizione della PCR (vedi Fig. 2). A tale scopo aggiungere per ogni reazione 2 µl di *Controllo interno* e 5 µl *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* direttamente a 25 µl di *CMV TM Master*.

Per ogni reazione di PCR utilizzare 30 µl di miscela master* preparata come descritto sopra, quindi aggiungere 20 µl di campione purificato. Se si prepara una sessione PCR per diversi campioni, aumentare il volume del *CMV TM Master*, della *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* e del *Controllo interno* in base al numero di campioni (vedi 8.5 Preparazione della PCR).

8.4 Quantificazione

Gli *Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4)* in dotazione vengono trattati come campioni già purificati e se ne utilizza lo stesso volume (20 µl). Per generare una curva standard su un sistema di rilevamento delle sequenze *ABI PRISM* occorre utilizzare tutti e quattro gli *Standard di quantificazione* e definirli come standard con indicazione delle corrispondenti concentrazioni (vedi 8.6 Programmazione di *ABI PRISM SDS*). Con il software dei sistemi *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT SDS* non è possibile importare le curve standard da processi precedenti.

In caso di integrazione di più sistemi *artus* per gli herpesvirus nella PCR, analizzare questi diversi sistemi separatamente con i corrispondenti *Standard di quantificazione*.

Attenzione: per garantire una precisa quantificazione, si raccomanda vivamente di integrare la miscela master utilizzata per gli *Standard di quantificazione* con la corrispondente quantità di *Controllo interno*. A tale scopo aggiungere per ciascuno *Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – CMV LC/RG/TM QS 4)* 2 µl di *Controllo interno* e 5 µl di *CMV LC/RG/TM Mg-Sol* direttamente a 25 µl di *CMV TM Master* per una panoramica schematica vedi Fig. 2. Questo schema di pipettamento vale in linea generale per gli *Standard di quantificazione CMV* ed è indipendente dal numero di *Standard di quantificazione* utilizzati.

Gli *Standard di quantificazione* sono definiti come copie/µl. Per convertire in copie/ml di campione i valori determinati mediante la curva standard, applicare la seguente equazione:

* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è irrilevante. Non viene compromessa la sensibilità del sistema di rilevazione.

$$\text{Risultato (copie/ml)} = \frac{\text{Risultato (copie/}\mu\text{l)} \times \text{volume di eluizione (}\mu\text{l)}}{\text{Volume campione (ml)}}$$

In linea di principio, nella formula di cui sopra occorre utilizzare il volume iniziale del campione. Questo è da tenere presente soprattutto quando il volume campione è stato modificato prima dell'estrazione degli acidi nucleici (per esempio per riduzione dovuta a centrifugazione o per aumento dovuto ad aggiunta di volume per raggiungere la quantità richiesta per l'estrazione).

Importante: una linea guida per l'analisi quantitativa dei sistemi *artus* sull'*ABI PRISM 7000 SDS* è disponibile su www.qiagen.com.

8.5 Preparazione della PCR

Preparare il numero di provette di reazione necessarie o una piastra di reazione a 96 pozzetti per le reazioni programmate. La tabella riportata di seguito fornisce un elenco dei materiali raccomandati:

Articolo	Descrizione	Numero di catalogo	Produttore	Rack di supporto	Compression pad
Piastra di reazione ottica a 96 pozzetti	96 Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	no	–
Pellicole adesive ottiche	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	–	sì
Provette di reazione ottiche	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	sì	–
Provette di reazione ottiche	MicroAmp® Optical Tubes	N8010933	Applied Biosystems	sì	–
Articolo	Descrizione	Numero di catalogo	Produttore	Rack di supporto	Compression pad
Piastra di reazione ottica a 96 pozzetti	96 Well Optical Reaction Plate	4 306 737	Applied Biosystems	no	–
Pellicole adesive ottiche	Optical Adhesive Covers	4 311 971	Applied Biosystems	–	sì
Provette di reazione ottiche	ABI PRISM Optical Tubes, 8 Tubes/Strip	4 316 567	Applied Biosystems	sì	–

Attenzione: l'uso delle provette di reazione per analisi ottiche con tappi bombati è ammesso esclusivamente con il sistema *ABI PRISM 7700 SDS* e richiede un adattamento del tempo di esposizione (vedi 8.6.2 Programmazione di *ABI PRISM 7700 SDS*, 8.6.2.5 Altre impostazioni importanti).

Nella preparazione della reazione PCR assicurarsi che per ciascuna PCR vengano inseriti parallelamente almeno uno *Standard di quantificazione* e un controllo negativo (*acqua, grado PCR*). Per generare una curva standard, utilizzare per ogni PCR tutti gli *Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4)* in dotazione.

Attenzione: per generare una curva standard, si raccomanda vivamente di integrare la miscela master utilizzata per gli *Standard di quantificazione* con la corrispondente quantità di *Controllo interno* (vedi 8.4 Quantificazione). Prima di ogni utilizzo, tutti i reagenti devono essere scongelati completamente, miscelati (aspirandoli e rilasciandoli più volte con la pipetta o agitandoli rapidamente su vortex) e centrifugati brevemente.

È possibile usare il *Controllo interno per monitorare l'estrazione del DNA e verificare una possibile inibizione della PCR*, perché questo è già stato aggiunto all'estrazione (vedi 8.3 Controllo interno). In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (per una panoramica schematica vedi Fig. 1):

		Numero dei campioni	1	12
1. Preparazione della miscela master	<i>CMV TM Master</i>		25 µl	300 µl
	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol</i>		5 µl	60 µl
	<i>CMV TM IC</i>		0 µl	0 µl
	Volume totale		30 µl	360 µl
2. Preparazione della PCR	Miscela master		30 µl	30 µl ciascuno
	Campione		20 µl	20 µl ciascuno
	Volume totale		50 µl	50 µl ciascuno

Se si desidera utilizzare il *Controllo interno esclusivamente per la verifica di un'inibizione* della PCR, è necessario aggiungerlo direttamente al *CMV TM Master*. In tal caso attenersi al seguente schema di pipettamento (per una panoramica schematica vedi Fig. 2):

		Numero dei campioni	1	12
1. Preparazione della miscela master	<i>CMV TM Master</i>		25 µl	300 µl
	<i>CMV LC/RG/TM Mg-Sol</i>		5 µl	60 µl
	<i>CMV TM IC</i>		2 µl	24 µl
	Volume totale		32 µl*	384 µl
2. Preparazione della PCR	Miscela master		30 µl	30 µl ciascuno
	Campione/ <i>CMV LC/RG/TM QS 1 - 4</i>		20 µl	20 µl ciascuno
	Volume totale		50 µl	50 µl ciascuno

* L'aumento di volume determinato dall'aggiunta del *Controllo interno* durante la preparazione della PCR è irrilevante. Non viene compromessa la sensibilità del sistema di rilevazione.

Pipettare 30 µl della miscela master in ciascuna provetta di reazione necessaria o in ciascun pozzetto della piastra di reazione a 96 pozzetti. Quindi aggiungere 20 µl di eluito dal DNA estratto. Accertarsi che le due soluzioni vengano ben miscelate pipettandole ripetutamente. Chiudere le provette di reazione con i tappi corrispondenti oppure, se si utilizza la piastra a 96 pozzetti, chiudere con le pellicole ottiche adesive (*Optical Adhesive*). Centrifugare le provette di reazione (in un rack di conservazione specifico per provette per PCR) oppure la piastra a 96 pozzetti in una centrifuga con un rotore per piastre di microtitolazione per 30 secondi a 1780 x g (4.000 giri/min) per raccogliere il volume di reazione preparato sul fondo della provetta o del pozzetto. Se non è disponibile una centrifuga di questo genere, accertarsi di pipettare sul fondo delle provette di reazione o dei pozzetti sia la miscela master sia il volume del campione. Conservare le reazioni preparate a +4 °C fino alla programmazione dello strumento *ABI PRISM SDS* (vedi 8.6 *Programmazione di ABI PRISM SDS*), quindi trasferirle nello strumento.

Attenzione: quando si utilizzano provette di reazione ottiche in combinazione con tappi ottici, inserire sempre un rack di supporto (*96-Well Tray/Retainer Set*) nello strumento (*ABI PRISM 7000, 7700 e 7900HT SDS*). Se si utilizza il rack di supporto costituito da due parti, è necessario aprire le provette di reazione durante l'inserimento e la rimozione delle stesse dal rack. Per evitare contaminazioni conseguenti, utilizzare solo la parte inferiore del rack di supporto.

L'uso delle piastre di reazione a 96 pozzetti in combinazione con le pellicole adesive ottiche richiede la copertura con un compression pad (*Optical Cover Compression Pads*).

Aggiunta del *Controllo interno* alla procedura di estrazione

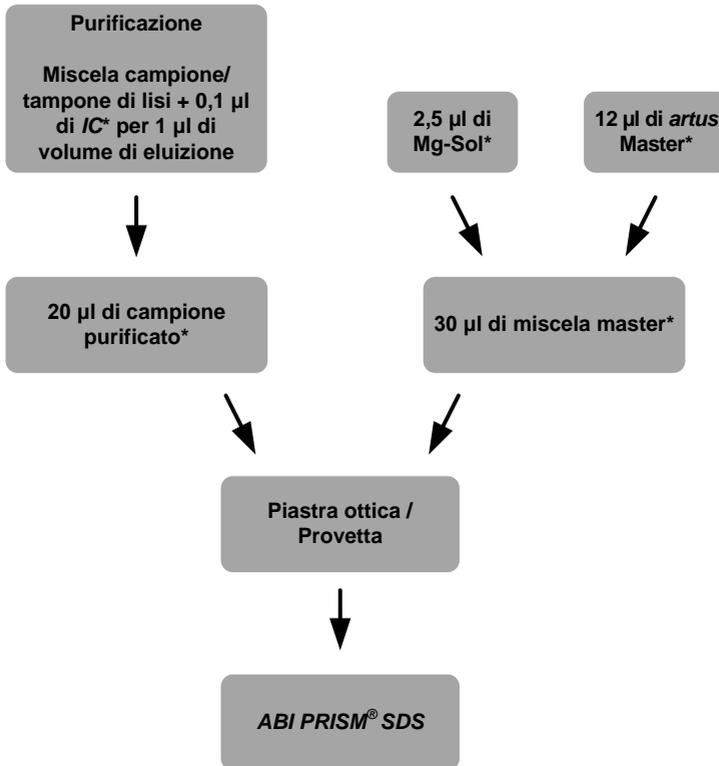


Fig. 1: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'estrazione del DNA e dell'inibizione della PCR.

*Accertarsi che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

Aggiunta del *Controllo interno* al master *artus*

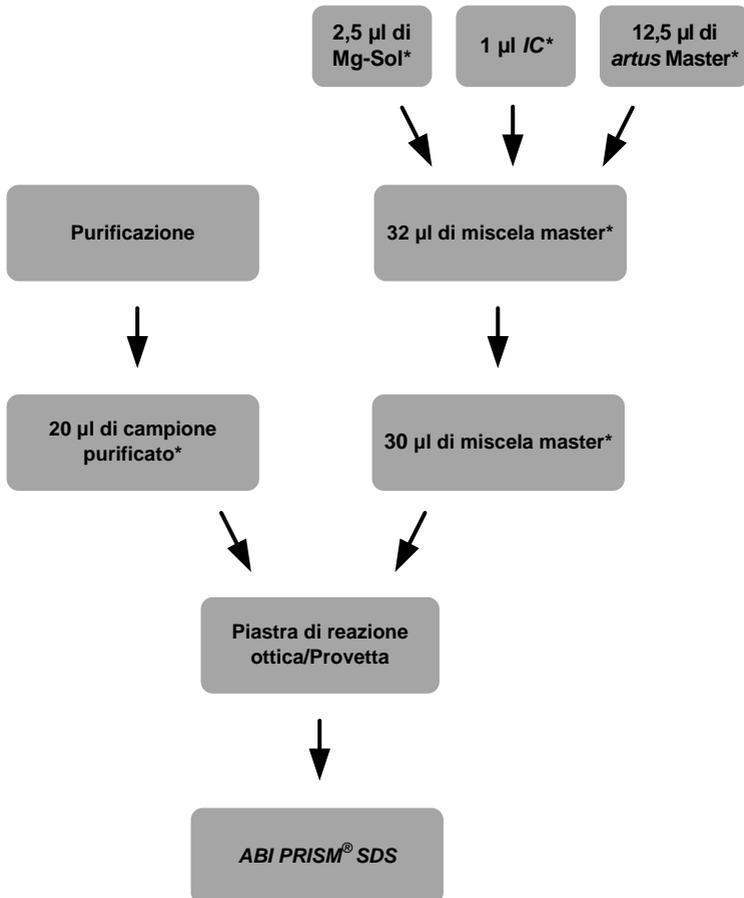


Fig. 2: Schema del ciclo di lavoro per il controllo dell'inibizione della PCR.

*Accertarsi che le soluzioni da utilizzare vengano completamente scongelate, ben miscelate e sottoposte a breve centrifugazione.

8.6 Programmazione di *ABI PRISM SDS*

Prima di avviare la PCR, il software dei sistemi di rilevamento delle sequenze *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT* (*Sequence Detection Systems, SDS*) necessita di alcune informazioni aggiuntive. La metodica applicata nella programmazione cambia enormemente da uno strumento all'altro; pertanto segue una trattazione in capitoli separati.

8.6.1 Programmazione di *ABI PRISM 7000 SDS*

Per rilevare il DNA di CMV creare un profilo nel proprio sistema *ABI PRISM 7000 SDS* seguendo le sei fasi operative riportate di seguito (vedi 8.6.1.1 – 8.6.1.6). Tutte le indicazioni fanno riferimento al software del sistema *ABI PRISM 7000 SDS* versione 1.0.1. Per i dettagli riguardanti la programmazione del sistema *ABI PRISM 7000 SDS* consultare il Manuale utente del sistema *ABI PRISM 7000 SDS*. Per una panoramica migliore le impostazioni da effettuare sono evidenziate nelle figure da riquadri neri.

8.6.1.1 Pre-impostazioni per la creazione di una nuova PCR

Selezionare in *ABI PRISM 7000 SDS* la voce di menu *New* (Nuovo) sotto *File* ed inserire le seguenti impostazioni di base per il nuovo documento (vedi Fig. 3). Uno modello di backup (*SDS Template (Modello SDS) [* .sdt]*) è a disposizione nell'elenco *Template* (Modelli) oppure selezionandolo con la funzione *Browse* (Sfoglia) (vedi 8.6.1.5 Come salvare la PCR). Confermare le pre-impostazioni (*OK*).

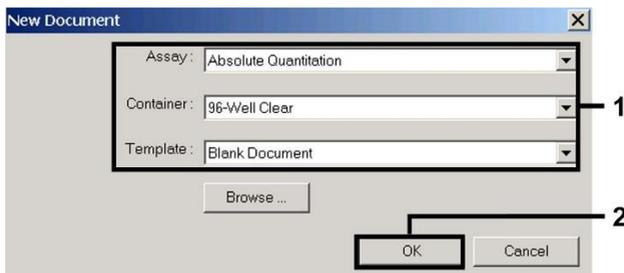


Fig. 3: Pre-impostazioni per la creazione di una nuova PCR (New Document) (Nuovo documento).

8.6.1.2 Creazione/selezione dei rilevatori

Utilizzando il sottomenu *Detector Manager* (Gestione rilevatori) nel menu *Tools* (Strumenti), assegnare al file i corrispondenti coloranti di rilevazione. Per la rilevazione del DNA di CMV e del *Controllo interno* mediante l'*artus* CMV TM PCR Kit devono essere definiti i coloranti reporter/quencher elencati nella seguente tabella:

Rilevazione	Reporter	Quencher
DNA di CMV	FAM	none (nessuno)
<i>Controllo interno (CMV TM IC)</i>	VIC	none (nessuno)

Per creare questi rilevatori selezionare l'opzione *File* [in basso a sinistra nella finestra *Detector Manager* (Gestione rilevatori)] e poi l'opzione *New* (Nuovo).

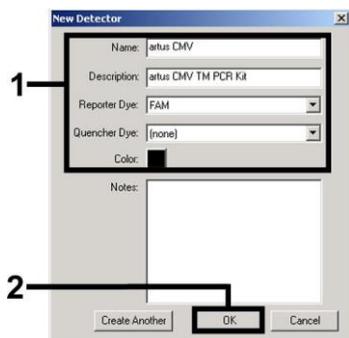


Fig. 4: Creazione del rilevatore specifico per CMV (Detector Manager) (Gestione rilevatori).

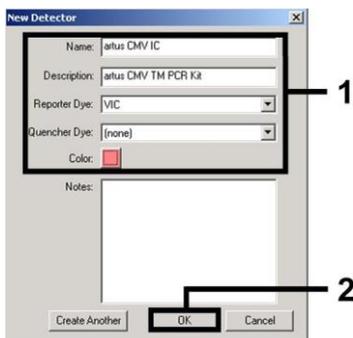


Fig. 5: Creazione del rilevatore specifico per IC (Detector Manager) (Gestione rilevatori).

Per la rilevazione del DNA di CMV definire la combinazione di coloranti reporter/quencher FAM/none (FAM/nessuno) nella nuova finestra. Per la rilevazione del *Controllo interno*, selezionare la combinazione VIC/none (VIC/nessuno) (come illustrato nella Fig. 4 e nella Fig. 5). Con la conferma dei dati inseriti (OK) si torna al *Detector Manager* (Gestione rilevatori). Evidenziare i rilevatori appena creati e trasferire ogni selezione al *Well Inspector* (Ispezione pozzetti), facendo clic sull'opzione *Add to Plate Document* (Aggiungi al documento piastra) (vedi Fig. 6). Chiudere la finestra (*Done*) (Fatto).

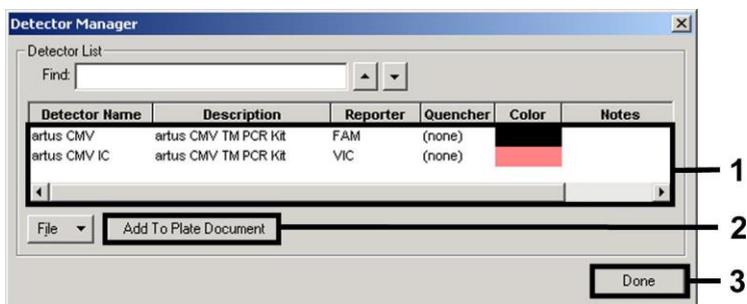


Fig. 6: Selezione dei rilevatori (Detector Manager) (Gestione rilevatori).

8.6.1.3 Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra

Aprire l'opzione *Well Inspector* (Ispezione pozzetti) nel menu *View* (Visualizza) per ritrovare i rilevatori selezionati al punto 8.6.1.2 (vedi Fig. 7).

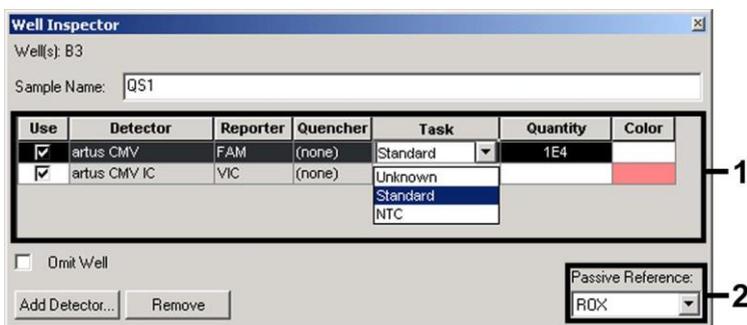


Fig. 7: Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra (Well Inspector) (Ispezione pozzetti).

Selezionare le posizioni della piastra destinate alla rilevazione del DNA di CMV. Assegnare a queste posizioni i rilevatori selezionati spuntando l'opzione *Use* (Utilizza) dei due rilevatori. Per la denominazione delle singole miscele di reazione selezionare la posizione corrispondente sulla piastra e registrare il nome in *Sample Name* (Nome campione). È importante ricordare che le preparazioni con il medesimo *Sample Name* (Nome campione) e la medesima assegnazione di

rivelatori vengono identificate dal software come replicati e ne viene calcolata la media rispetto alla carica patogena quantificata. Selezionare poi per ogni tipo di campione la rispettiva funzione [Task (Attività)] in base alla tabella riportata di seguito:

Tipo di campione	Funzione [Task (Attività)]	Concentrazione [Quantity (Quantità)]	Reporter	Quencher
Campione	Unknown (Sconosciuto)	–	FAM	none (nessuno)
Controllo senza templatato	NTC	–	FAM	none (nessuno)
Standard	Standard	vedi 1. Sommario	FAM	none (nessuno)

Per generare una curva standard utilizzare tutti gli *Standard di quantificazione* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) per ogni PCR e inserire le concentrazioni corrispondenti (vedi 1. Sommario) per ogni standard [Quantity (Quantità)]. **Si noti che per una PCR con l'artus CMV TM PCR Kit deve essere impostato ROX™ come riferimento passivo [Passive Reference (Riferimento passivo)].** La distribuzione uniforme del colorante ROX in tutte le preparazioni della PCR di un lotto mediante miscelazione del *CMV TM Master* garantisce il riconoscimento e il calcolo della variabilità inter-provetta (differenze di fluorescenza fra diverse preparazioni della PCR) mediante il *Software di rilevamento delle sequenze* (normalizzazione).

8.6.1.4 Creazione del profilo della temperatura

Per creare un profilo della temperatura, passare dal livello *Setup* (Configurazione) al livello *Instrument* (Strumento) del software. Inserire il profilo della temperatura valido per rilevare il DNA di CMV conformemente alla Fig. 8. Per eliminare la fase da 50 °C memorizzata nelle pre-impostazioni, evidenziarla con il tasto sinistro del mouse tenendo premuto contemporaneamente il tasto Shift, quindi cancellarla con il tasto Backspace. Controllare che il volume di reazione sia impostato su 50 µl. **Deve essere attivata l'opzione 9600 Emulation** (Emulazione 9600) e le pre-impostazioni della voce *Auto Increment* (Auto-incremento) devono rimanere invariate [*Auto Increment* (Auto-incremento): 0,0°C, 0,0 secondi].

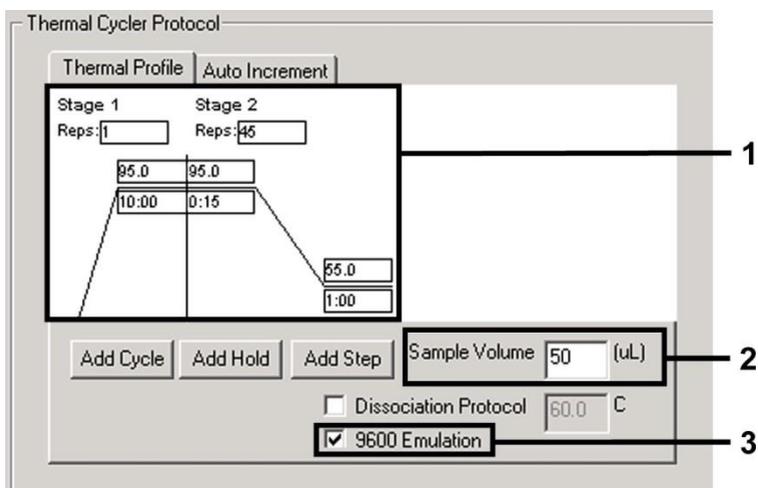


Fig. 8: Creazione del profilo della temperatura.

8.6.1.5 Come salvare la PCR

A questo punto le impostazioni inserite [*Setup* (Configurazione)] possono essere salvate come modello per essere utilizzate per applicazioni successive in forma invariata o modificata. Salvando le impostazioni sotto forma di *SDS Template* (Modello SDS) (*.sd) in *Template Directory* (Directory modelli) (disco locale [C:] \Program Files \ABI PRISM 7000 \Templates, creata da Applied Biosystems), questo file può essere selezionato direttamente nella finestra *New Document* (Nuovo documento) dal menu a tendina *Template* (Modelli). I modelli salvati in altre cartelle devono essere aperti mediante *Browse* (Sfoggia). Prima di avviare la PCR, salvarla di nuovo come *SDS Document* (Documento SDS) (*.sds). Ciò garantisce che i dati acquisiti nel corso della PCR vengano salvati.

8.6.1.6 Avvio della PCR

Avviare la PCR selezionando l'opzione *Start* (Avvia) dalla voce di menu *Instrument* (Strumento) oppure il campo *Start* (Avvia) nel livello *Instrument* (Strumento).

8.6.2 Programmazione di *ABI PRISM 7700 SDS*

Per rilevare il DNA di CMV creare un profilo nel proprio sistema *ABI PRISM 7700 SDS* seguendo le sette fasi operative riportate di seguito (8.6.2.1 - 8.6.2.7). Tutte le indicazioni fanno riferimento al software del sistema *ABI PRISM 7700 SDS* versione 1.9.1. Per i dettagli riguardanti la programmazione del sistema *ABI PRISM 7700 SDS* consultare il Manuale utente del sistema *ABI PRISM 7700 SDS*. Per una panoramica migliore le impostazioni da effettuare sono evidenziate nelle figure da riquadri neri.

8.6.2.1 Pre-impostazioni per la creazione di una nuova PCR

Selezionare in *ABI PRISM 7700 SDS* la voce di menu *New Plate* (Nuova piastra) sotto *File* ed inserire le seguenti impostazioni di base per il nuovo documento (vedi Fig. 9). Confermare le pre-impostazioni (*OK*).

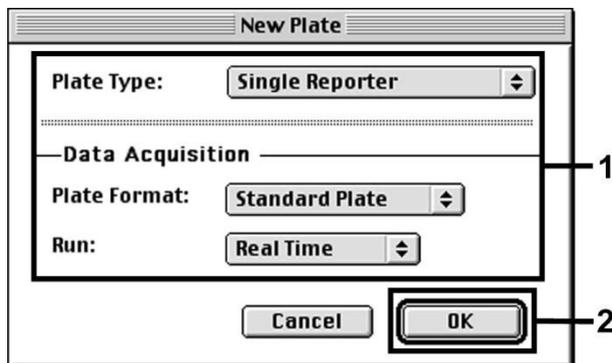


Fig. 9: Pre-impostazioni per la creazione di una nuova PCR (New Plate) (Nuova piastra).

8.6.2.2 Selezione dei coloranti di fluorescenza ed assegnazione del tipo di campione

Utilizzando *Sample Type Setup* (Preparazione tipo di campione) [(livello *Setup* (Configurazione): *Sample Type* (Tipo di campione)/*Sample Type Setup* (Preparazione tipo di campione)] assegnare al file i rispettivi coloranti di rilevazione e il rispettivo tipo di campione. Per la rilevazione del DNA di CMV e del *Controllo interno* mediante l'*artus* CMV TM PCR Kit devono essere definiti i coloranti reporter/quencher elencati nella seguente tabella:

Rilevazione	Reporter	Quencher
DNA di CMV	FAM	none (nessuno)
<i>Controllo interno (CMV TM IC)</i>	JOE	none (nessuno)

Per l'analisi del DNA di CMV con l'*artus* CMV TM PCR Kit, selezionare il colorante reporter FAM analogamente a quanto indicato nella tabella. Ciò riguarda gli standard (STND) e i campioni (UNKN), come pure i controlli senza template (UNKN). Per l'analisi del Controllo interno (IPC+), definire JOE come colorante reporter. Come colorante quencher impostare none (nessuno). L'assegnazione dei coloranti e dei tipi di campioni nella finestra *Sample Type Setup* (Preparazione tipo di campione) è illustrata nella Fig. 10.

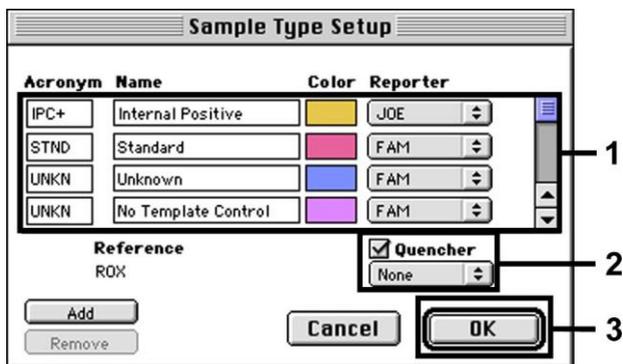


Fig. 10: Selezione dei coloranti di fluorescenza ed assegnazione del tipo di campione (*Sample Type Setup*) (Preparazione tipo di campione).

L'assegnazione del tipo di campione ad una rispettiva funzione (*Acronym*) (Acronimo) avviene in base alla tabella riportata di seguito:

Tipo di campione	Funzione (<i>Acronym</i>) (Acronimo)	Concentrazione (<i>Quantity</i>) (Quantità)	Reporter	Quencher
Campione	UNKN	–	FAM	none (nessuno)
Controllo senza template	UNKN	–	FAM	none (nessuno)
Standard	STND	Vedi 1. Sommario	FAM	none (nessuno)

8.6.2.3 Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra

Per l'assegnazione dei rilevatori e dei tipi di campioni alle singole posizioni della piastra selezionare i rispettivi campi. Nel livello *Setup* (Configurazione) aprire la finestra di dialogo *Dye Layer* (Strato colorante) ed assegnare il rispettivo colorante reporter. Attivando il menu pop-up *Sample Type* (Tipo di campione), appare un elenco con i tipi di campioni assegnati al colorante reporter nella finestra *Sample Type Setup* (Preparazione tipo di campione) (vedi Fig. 11). Selezionare il tipo di campione adeguato (vedi tabella al punto 8.6.2.2) e servendosi dei menu *Dye Layers* (Strati colorante) e *Sample Type* (Tipo di campione) assegnare le restanti posizioni della piastra. Nel campo *Sample Name* (Nome campione) è possibile assegnare un nome a ciascun campione. Per i campi definiti come *Replicate* (Replicato) [inserimento del nome del campione di riferimento nella colonna *Replicate* (Replicato)] il software calcola la media dei rispettivi valori della carica patogena quantificata e ne calcola anche la rispettiva deviazione standard.

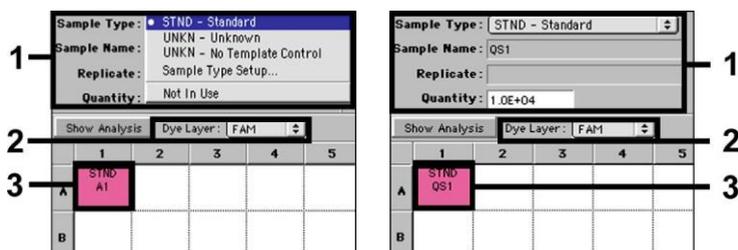


Fig. 11/12: Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra.

Per generare una curva standard utilizzare tutti gli *Standard di quantificazione* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) per ogni PCR e inserire le concentrazioni corrispondenti (vedi 1. Sommario) per ogni standard nel campo *Quantity* (Quantità) (vedi Fig. 12). Tuttavia, ciò è possibile solo se le posizioni occupate con gli standard sono state definite precedentemente come tali con il menu *Sample Type* (Tipo di campione).

8.6.2.4 Creazione del profilo della temperatura

Per creare un profilo della temperatura, entrare nel menu *Thermal Cycler Conditions* (Condizioni termociclatore) nel livello *Setup* (Configurazione). Inserire il profilo della temperatura valido per rilevare il DNA di CMV conformemente alla Fig. 13. Controllare che il volume di reazione sia impostato su 50 µl. Le pre-impostazioni del tempo *Ramp* (Rampa) e dell'*Auto Increment* (Auto-incremento) rimangono invariate [*Ramp Time* (Tempo di rampa): 0:00, *Auto Increment* (Auto-incremento): 0,0°C, 0,0 secondi)].

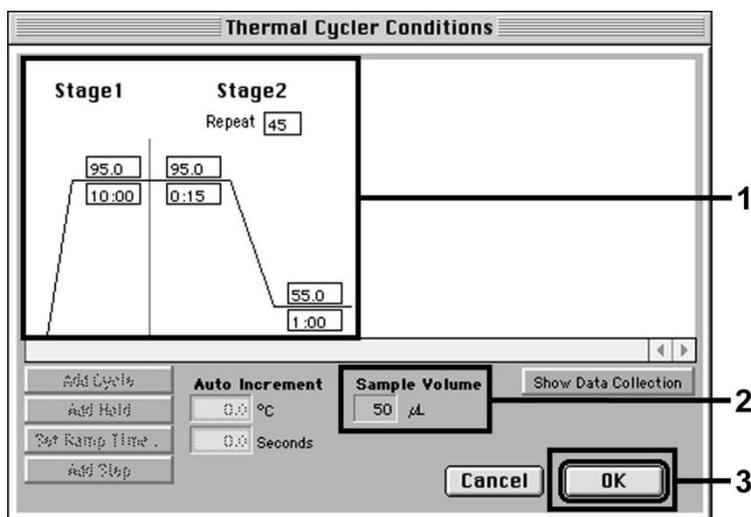


Fig. 13: Creazione del profilo della temperatura.

Nel menu *Thermal Cycler Conditions* (Condizioni termociclatore) è disponibile anche l'opzione *Show Data Collection* (Mostra acquisizione dati). Selezionando questa opzione si passa alla

finestra illustrata in Fig. Fig. 14. Ogni singola temperatura di rampa e di plateau è provvista di un'icona *Data Collection* (Acquisizione dati), che illustra l'acquisizione dei dati in quella precisa fase del processo. Rimuovere tutti i simboli, ad eccezione di quello per la fase di *Annealing* (Appaiamento) [Stage2/Step2 (Stadio2/Fase2)] per escludere le misurazioni superflue della fluorescenza. La durata totale del processo e la quantità di dati vengono quindi ridotte al minimo.

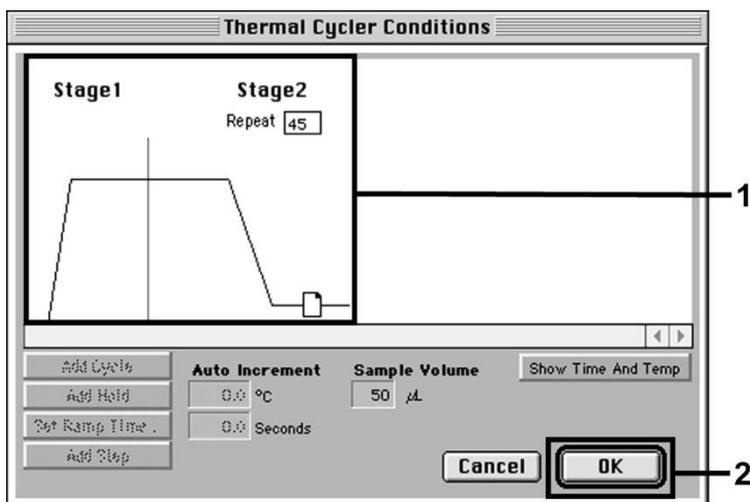


Fig. 14: Acquisizione dati.

8.6.2.5 Altre impostazioni importanti

Per impostare il tempo di esposizione (eccitazione dei coloranti di fluorescenza) e selezionare i file Pure Spectra/Background (File componenti spettrali puri/fondo), passare dal livello Setup (Configurazione) al livello Analysis (Analisi). Selezionare la sotto-voce attivata *Advanced Options* (Opzioni avanzate) nel menu *Instrument* (Strumento) sotto *Diagnostics* (Diagnostica). Adattare le impostazioni in base alla Fig. Fig. 15. Disattivando la funzione facoltativa *Spectra Components* (Componenti spettrali) ((Analysis) Analisi), i file di calibrazione già presenti nel file *Spectra Components* al momento della generazione dei

dati vengono automaticamente utilizzati per la rivalutazione dei processi già analizzati. Per effettuare un'analisi di processi precedenti utilizzando i nuovi file Spectra Components (Componenti spettrali), attivare tutti e due i campi. Si noti che per una PCR con l'artus CMV TM PCR Kit deve essere impostato ROX come riferimento passivo [Reference (Riferimento)]. La distribuzione uniforme del colorante ROX in tutte le preparazioni della PCR di un lotto mediante miscelazione del CMV TM Master garantisce il riconoscimento e il calcolo della variabilità inter-provetta (differenze di fluorescenza fra diverse preparazioni della PCR) mediante il *Software di rilevamento delle sequenze* (normalizzazione).

Attenzione: se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti per misurazioni ottiche in combinazione con pellicole adesive ottiche o provette di reazione ottiche con tappi piatti, il tempo di esposizione è di dieci millisecondi. In caso di utilizzo di provette di reazione ottiche con tappi a cupola, commutare il tempo di esposizione su 25 millisecondi.

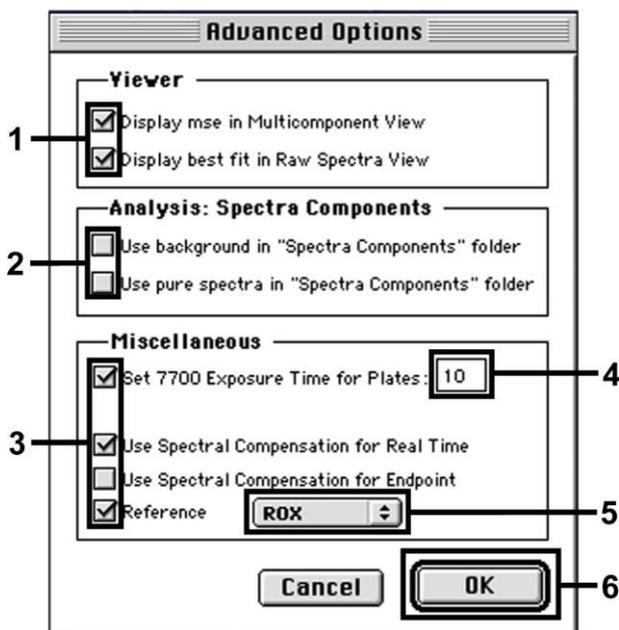


Fig. 15: Altre impostazioni importanti (Advanced Options) (Impostazioni avanzate).

8.6.2.6 Come salvare la PCR

A questo punto le impostazioni inserite [*Setup* (Configurazione)] possono essere salvate come modello per essere utilizzate per applicazioni successive in forma invariata o modificata. A tale scopo salvare questo file in *Stationary File Format* (Formato file stazionario). Prima di avviare la PCR appena programmata salvarla di nuovo in *Normal File Format* (Formato file normale). Ciò garantisce che i dati acquisiti nel corso della PCR vengano salvati.

8.6.2.7 Avvio della PCR

Avviare la PCR selezionando l'opzione *Run* (Esegui) dal menu *Instrument* (Strumento) o il campo *Run* (Esegui) nel livello *Analysis* (Analisi).

8.6.3 Programmazione di *ABI PRISM 7900HT SDS*

Per rilevare il DNA di CMV, creare un profilo nel proprio *ABI PRISM 7900HT SDS* seguendo le sei fasi operative riportate di seguito (8.6.3.1 – 8.6.3.6). Tutte le indicazioni fanno riferimento al software del sistema *ABI PRISM 7900HT SDS* versione 2.1. Per dettagli sulla programmazione di *ABI PRISM 7900HT SDS*, consultare il Manuale utente del sistema *ABI PRISM 7900HT SDS*. Per una panoramica migliore le impostazioni da effettuare sono evidenziate nelle figure da riquadri neri.

8.6.3.1 Pre-impostazioni per la creazione di una nuova PCR

Selezionare in *ABI PRISM 7900HT SDS* la voce di menu *New* (Nuovo) sotto *File* ed inserire le seguenti impostazioni di base per il nuovo documento (vedi Fig. 16). Un modello di backup (*ABI PRISM SDS Template Document* (Documento modello *ABI PRISM SDS*) [**.sdf*]) è a disposizione nell'elenco *Template* (Modelli) oppure selezionandolo con la funzione *Browse* (Sfogliata) (vedi 8.6.3.5 Come salvare la PCR). Confermare le pre-impostazioni (OK).

Attenzione: *l'artus CMV TM PCR Kit* non può essere utilizzato in combinazione con il formato a 384 piastre del sistema *ABI PRISM 7900HT SDS*.

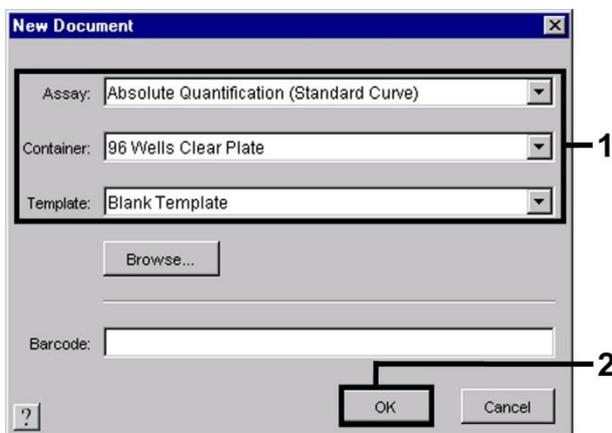


Fig. 16: Pre-impostazioni per la creazione di una nuova PCR (New Document) (Nuovo documento).

8.6.3.2 Creazione/selezione dei rilevatori

Utilizzando il sottomenu *Detector Manager* (Gestione rilevatori) nel menu *Tools* (Strumenti) [in alternativa: livello *Setup* (Configurazione)/funzione di selezione *Add Detector* (Aggiungi rilevatore)], assegnare al file i corrispondenti coloranti di rilevazione. Per la rilevazione del DNA di CMV e del *Controllo interno mediante l'artus CMV TM PCR Kit* devono essere definiti i coloranti reporter/quencher elencati nella seguente tabella:

Rilevazione	Reporter	Quencher
DNA di CMV	FAM	Non Fluorescent (Non fluorescente)
<i>Controllo interno (CMV TM IC)</i>	VIC	Non Fluorescent (Non fluorescente)

Per creare questi rilevatori, selezionare l'opzione *New* (Nuovo) [in basso a sinistra nella finestra *Detector Manager* (Gestione rilevatori)].

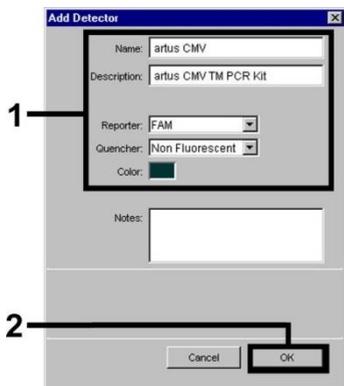


Fig. 17: Creazione del rilevatore specifico per CMV (Detector Manager) (Gestione rilevatori).

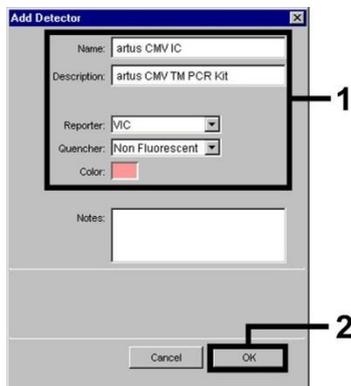


Fig. 18: Creazione del rilevatore specifico per IC (Detector Manager) (Gestione rilevatori).

Per la rilevazione del DNA di CMV definire la combinazione di coloranti reporter/quencher FAM/Non Fluorescent (FAM/Non fluorescente) nella nuova finestra. Per la rilevazione del *Controllo interno* selezionare invece la combinazione VIC/Non Fluorescent (VIC/Non fluorescente) (come illustrato in Fig. 17 e Fig. 18). Con la conferma dei dati inseriti (OK) si torna al *Detector Manager* (Gestione rilevatori). Evidenziare i rilevatori appena creati e trasferire ogni selezione facendo clic sull'opzione *Copy to Plate Document* (Copia nel documento piastra) nel livello *Setup* (Configurazione) (vedi Fig. 19). Chiudere la finestra (*Done*) (Fatto).

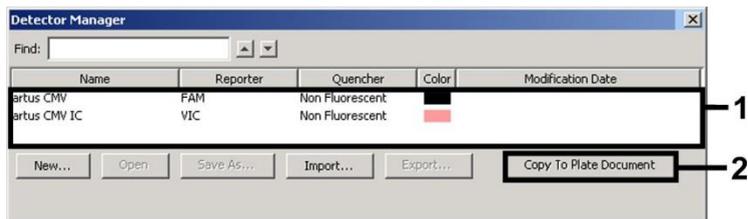


Fig. 19: Selezione dei rilevatori (Detector Manager) (Gestione rilevatori).

8.6.3.3 Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra

Dopo aver chiuso la finestra [Detector Manager (Gestione rilevatori)(Done) (Fatto)] i rilevatori selezionati al punto 8.6.3.2 compaiono elencati sotto forma di tabella nel livello Setup (Configurazione) (vedi Fig. 20).

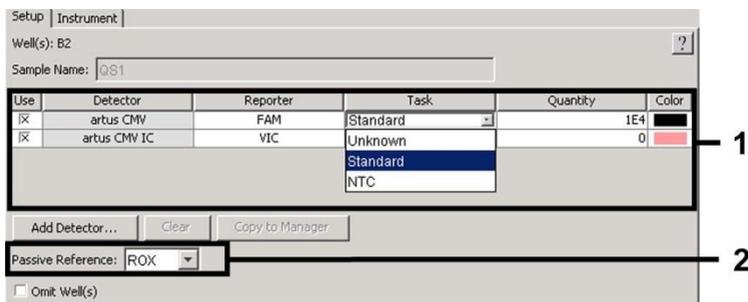


Fig. 20: Assegnazione delle informazioni necessarie per le posizioni della piastra.

Selezionare le posizioni della piastra destinate alla rilevazione del DNA di CMV. Assegnare a queste posizioni i rilevatori selezionati spuntando l'opzione Use (Usa) dei due rilevatori. Per la denominazione delle singole miscele di reazione selezionare la posizione corrispondente sulla piastra e registrare il nome in *Sample Name* (Nome campione). È importante ricordare che le preparazioni con il medesimo *Sample Name* (Nome campione) e la medesima assegnazione di rilevatori vengono identificate dal software come replicati e ne viene calcolata la media rispetto alla carica patogena quantificata. Selezionare poi per ogni tipo di campione la rispettiva funzione [Task (Attività)] in base alla tabella riportata di seguito:

Tipo di campione	Funzione [Task (Attività)]	Concentrazione [Quantity (Quantità)]	Reporter	Quencher
Campione	Unknown (Sconosciuto)	–	FAM	Non Fluorescent (Non fluorescente)
Controllo senza template	NTC	–	FAM	Non Fluorescent (Non fluorescente)
Standard	Standard	vedi 1. Sommario	FAM	Non Fluorescent (Non fluorescente)

Per generare una curva standard utilizzare tutti gli *Standard di quantificazione* (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) per ogni PCR e inserire le concentrazioni corrispondenti (vedi 1 Sommario) per ogni standard [*Quantity* (Quantità)]. Si noti che per una PCR con l'*artus* CMV TM PCR Kit deve essere impostato ROX come riferimento passivo [*Passive Reference* (Riferimento passivo)]. La distribuzione uniforme del colorante ROX in tutte le preparazioni della PCR di un lotto mediante miscelazione del *CMV TM Master* garantisce il riconoscimento e il calcolo della variabilità inter-provetta (differenze di fluorescenza fra diverse preparazioni della PCR) mediante il *Software di rilevamento delle sequenze* (normalizzazione).

8.6.3.4 Creazione del profilo della temperatura

Per creare un profilo della temperatura, passare dal livello *Setup* (Configurazione) al livello *Instrument* (Strumento) del software. Inserire il profilo della temperatura valido per rilevare il DNA di CMV conformemente alla Fig. 21. Controllare che il volume di reazione sia impostato su 50 µl. L'*opzione 9600 Emulation* (Emulazione 9600) dev'essere attivata, le pre-impostazioni del *Ramp Time* (Tempo di rampa) e di *Auto Increment* (Auto-incremento) devono rimanere invariate [*Ramp Time* (Tempo di rampa): 0:00, *Auto Increment* (Auto-incremento): 0,0°C, 0,0 secondi)].

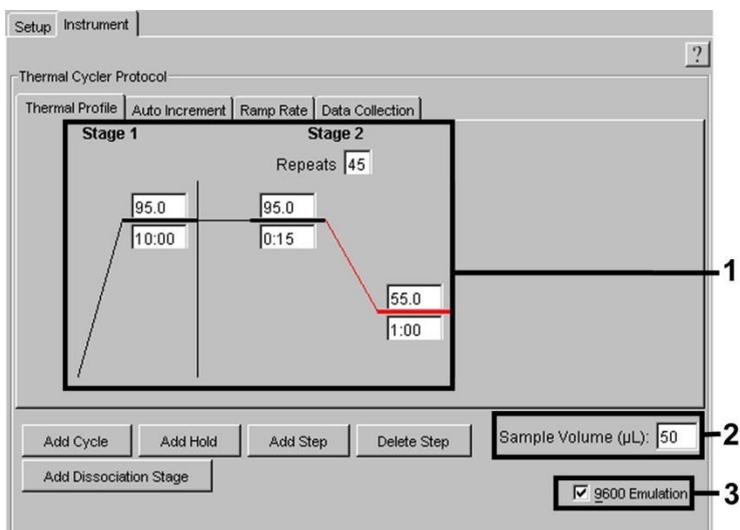


Fig. 21: Creazione del profilo della temperatura.

Inoltre, al livello *Instrument* (Strumento) è disponibile anche l'opzione *Data Collection* (Acquisizione dati). Selezionando questa opzione si passa alla finestra illustrata in Fig. Fig. 22. Ogni singola temperatura di rampa e di plateau è provvista di un'icona *Data Collection* (Acquisizione dati), che illustra l'acquisizione dei dati in quella precisa fase del processo. Rimuovere tutti i simboli cliccandovi sopra, ad eccezione di quello per la fase di *Annealing* (Appaiamento) [Stage2/Step2 (Stadio2/Fase2)] per escludere le misurazioni superflue della fluorescenza. La durata totale del processo e la quantità di dati vengono quindi ridotte al minimo.

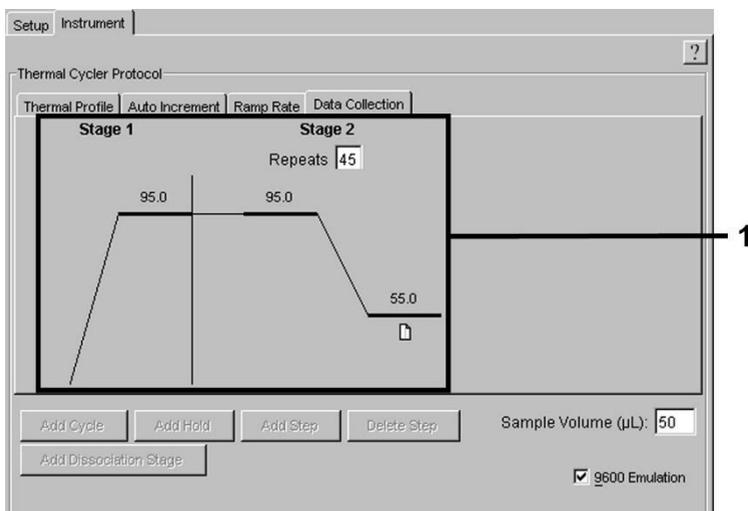


Fig. 22: Acquisizione dati.

8.6.3.5 Come salvare la PCR

A questo punto le impostazioni inserite [*Setup* (Configurazione)] possono essere salvate come modello per essere utilizzate per applicazioni successive in forma invariata o modificata. Salvando le impostazioni sotto forma di *ABI PRISM SDS Template Document* (Documento modello ABI PRISM SDS) (*.sdt) in *Template Directory* (Directory modelli) ([D:]*Program Files\Applied Biosystems\SDS 2.1\Templates*, creata da Applied Biosystems), questo file può essere selezionato direttamente nella finestra *New Document* (Nuovo documento) dall'*elenco Template* (Modelli). I modelli salvati in altre cartelle devono essere aperti mediante *Browse* (Sfoggia). Prima di avviare la PCR accertarsi di salvarla di nuovo come *ABI PRISM SDS Document* (Documento ABI PRISM SDS) (*.sds). Ciò garantisce il salvataggio dei dati acquisiti nel corso della PCR.

8.6.3.6 Avvio della PCR

Avviare la PCR selezionando l'opzione *Start* (Avvia) dalla voce di menu *Instrument* (Strumento).

9. Analisi dei dati

Al momento dell'avvio degli strumenti è indispensabile eseguire una taratura valida dei coloranti [*Pure Spectra Component File* (File componenti spettrali puri)] e del fondo [*Background Component File* (File componenti fondo)]. Questi file di taratura servono per effettuare un calcolo esatto dei risultati come di seguito indicato.

Tutti i segnali di disturbo generati dallo strumento, che influenzano la misurazione, vengono eliminati dal *Software di rilevamento delle sequenze* dei sistemi di rilevamento delle sequenze *ABI PRISM* mediante il *Background Component File* (File componenti fondo).

Inoltre, durante le analisi multicolore compaiono interferenze tra gli spettri d'emissione dei singoli coloranti di fluorescenza. Il software del sistema *ABI PRISM SDS* compensa tali interferenze calcolando i dati dello spettro dei singoli coloranti, salvati nel *Pure Spectra Component File* (File componenti spettrali puri). Il software utilizza lo stesso file per assegnare ai rilevatori programmati i dati di fluorescenza raccolti sull'intero spettro misurabile nel corso della PCR. I dati di fluorescenza dei singoli coloranti vengono poi divisi per il valore ottenuto per il segnale del riferimento passivo (ROX) per spiegare la variabilità inter-provetta (differenze di fluorescenza fra diverse preparazioni della PCR). I segnali normalizzati in questo modo possono essere analizzati con l'aiuto dell'*Amplification Plot* (Grafico di amplificazione).

I file di calibrazione utilizzati per la valutazione di una PCR vengono salvati automaticamente con il processo. In caso di mancata installazione dei file di calibrazione, creare i file attenendosi alle istruzioni fornite dal Manuale utente del sistema *ABI PRISM SDS*.

In caso di avvenuta integrazione di più sistemi *artus*™ PCR nella PCR (osservare il profilo della temperatura), eseguire analisi singole per i singoli sistemi. I campioni con la medesima denominazione [*Sample Name* (Nome campione)] e la medesima assegnazione di rilevatori vengono identificati automaticamente dal software del sistema *ABI PRISM 7000* e *7900HT SDS* come replicati e ne viene calcolata la media rispetto alla carica virale quantificata.

Per l'analisi dei processi quantitativi seguire le istruzioni fornite nel paragrafo 8.4 Quantificazione e nella Nota tecnica per la quantificazione sullo strumento *ABI PRISM 7000 SDS* all'indirizzo www.qiagen.com.

In caso di integrazione di più sistemi *artus* per gli herpesvirus nella PCR, analizzare questi diversi sistemi separatamente con i corrispondenti *Standard di quantificazione*. Selezionare opportunamente le posizioni dei campioni per l'analisi.

Si possono ottenere i seguenti risultati:

1. Viene rilevato un segnale di fluorescenza FAM.

Il risultato dell'analisi è positivo: il campione contiene DNA di CMV.

In questo caso, la rilevazione di un segnale di fluorescenza VIC/JOE (*Controllo interno*) è superflua, perché elevate concentrazioni iniziali di DNA di CMV (segnale positivo di fluorescenza FAM) possono dare origine ad un segnale di fluorescenza ridotto o assente del *Controllo interno* (fenomeno competizione).

2. Non è stato rilevato alcun segnale di fluorescenza FAM. Contemporaneamente, appare un segnale di fluorescenza VIC/JOE dal *Controllo interno*.

Nel campione non è possibile rilevare alcun DNA di CMV. Il risultato dell'analisi può essere quindi considerato negativo.

In caso di PCR negativa per CMV, il segnale rilevato del *Controllo interno* esclude la possibilità d'inibizione della PCR.

3. Non viene rilevato alcun segnale di fluorescenza FAM né alcun segnale di fluorescenza VIC/JOE.

Non è possibile formulare una diagnosi.

Per informazioni riguardanti le cause degli errori e le possibili soluzioni, consultare 10 Risoluzione dei problemi.

Le Fig. 23/24 (per ABI PRISM 7000 SDS), 25/26 (per ABI PRISM 7700 SDS) e 27/28 (per ABI PRISM 7900HT SDS) illustrano esempi di reazioni PCR positive e negative.

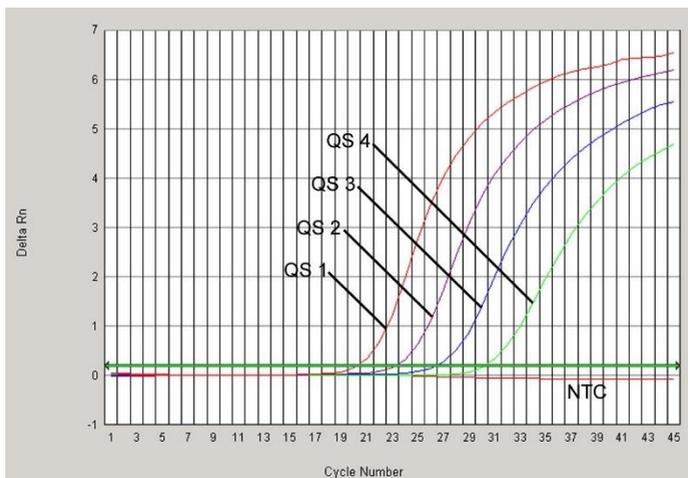


Fig. 23: Rilevazione degli Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) mediante misurazione del segnale di fluorescenza FAM (ABI PRISM 7000 SDS). NTC: controllo senza template (controllo negativo).

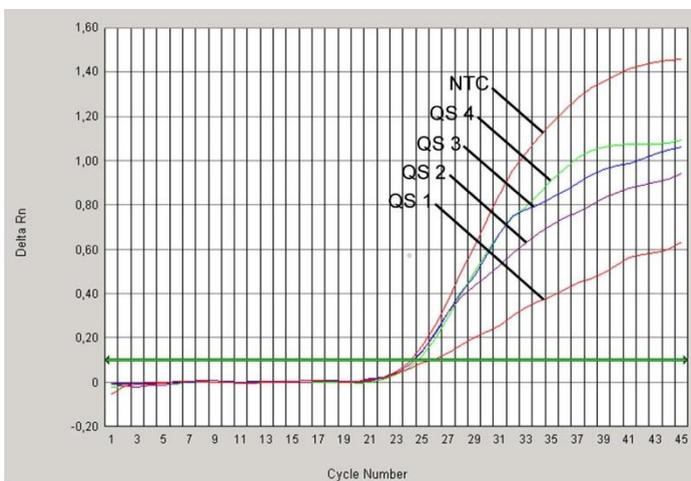


Fig. 24: Rilevazione del Controllo interno (IC) mediante misurazione del segnale di fluorescenza VIC (ABI PRISM 7000 SDS) con simultanea amplificazione degli Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: controllo senza template (controllo negativo).

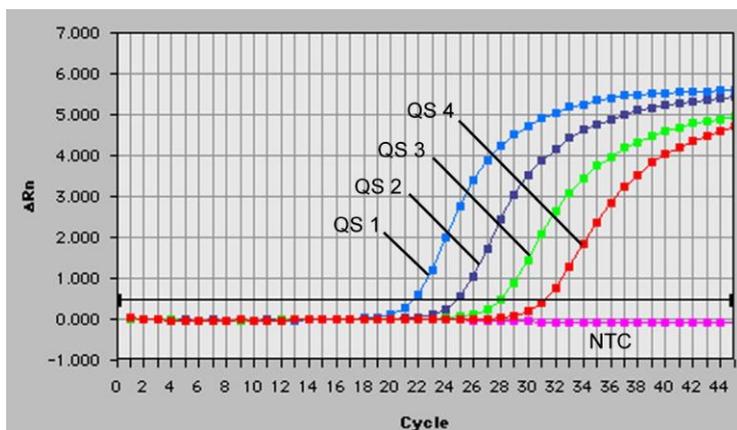


Fig. 25: Rilevazione degli Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) mediante misurazione del segnale di fluorescenza FAM (ABI PRISM 7700 SDS). NTC: controllo senza template (controllo negativo).

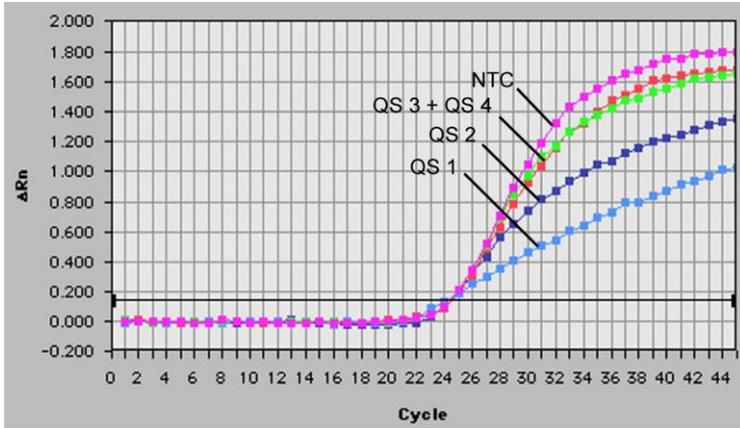


Fig. 26: Rilevazione del Controllo interno (IC) mediante misurazione del segnale di fluorescenza JOE (ABI PRISM 7700 SDS) con simultanea amplificazione degli Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: controllo senza template (controllo negativo).

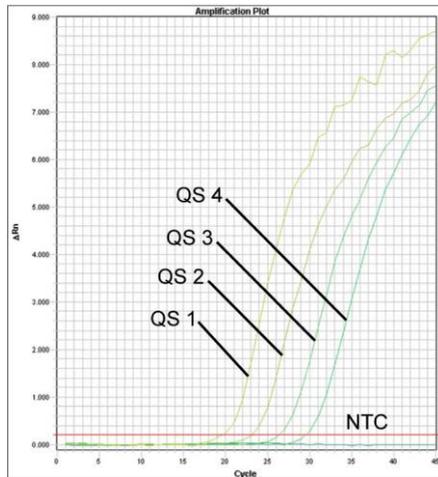


Fig. 27: Rilevazione degli Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4) mediante misurazione del segnale di fluorescenza FAM (ABI PRISM 7900HT SDS). NTC: controllo senza template (controllo negativo).

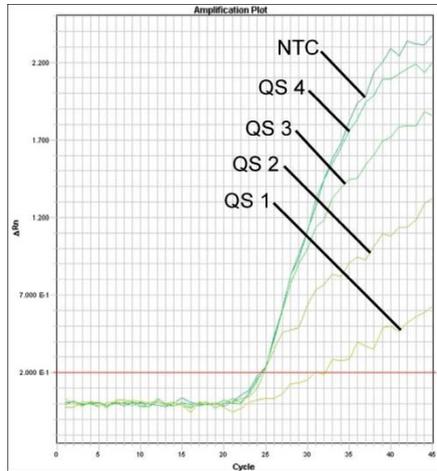


Fig. 28: Rilevazione del Controllo interno (IC) mediante misurazione del segnale di fluorescenza VIC (ABI PRISM 7900HT SDS) con simultanea amplificazione degli Standard di quantificazione (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4). NTC: controllo senza template (controllo negativo).

10. Risoluzione dei problemi

Nessun segnale di fluorescenza FAM con i controlli positivi (CMV LC/RG/TM QS 1 – 4):

- La selezione del colorante di rilevazione durante l'analisi dei dati della PCR non corrisponde a quanto indicato nel protocollo.
- ➔ Per l'analisi dei dati selezionare il colorante di rilevazione FAM per la PCR analitica di CMV e il colorante di rilevazione VIC/JOE per la PCR del *Controllo interno*.
- Le impostazioni utilizzate per l'analisi dei dati sotto *Options (Extension Phase Data Extraction)* [Opzioni (Estrazione dati fase di estensione)] non corrispondono alle impostazioni di *Data Collection (Acquisizione dati)* (per ABI PRISM 7700 SDS vedi 8.6.2.4 Creazione del profilo della temperatura, per ABI PRISM 7900HT SDS vedi 8.6.3.4 Creazione del profilo della temperatura).

-
- Analizzare la PCR con le impostazioni corrette e ripetere l'analisi [*Analysis (Analisi)*].
 - Errata programmazione del profilo della temperatura del *sistema di rilevamento delle frequenze ABI PRISM*.
 - Confrontare il profilo della temperatura con il protocollo (vedi 8.6 *Programmazione di ABI PRISM SDS*).
 - Errata configurazione della reazione PCR.
 - Controllare le fasi operative eseguite con lo schema di pipettamento (vedi 8.5 *Preparazione della PCR*) e ripetere la PCR se necessario.
 - Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in 2. Conservazione o l'*artus CMV TM PCR Kit* è scaduto.
 - Verificare sia le condizioni di conservazione sia la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnale debole o mancante del *Controllo interno* di uno dei campioni di plasma negativi sottoposti ad estrazione (QIAamp DSP Virus Kit) (segnale di fluorescenza VIC/JOE, **deviazione maggiore dell'intervallo Ct 25,3-31,3** (soglia *ABI PRISM 7000*: 0,2; *ABI PRISM 7700* e *7900HT SDS*: 0,2) con contemporanea assenza di un segnale di fluorescenza FAM della PCR specifica per CMV:

- Le condizioni della PCR non corrispondono a quanto indicato nel protocollo.
 - Verificare le condizioni della PCR (vedi sopra) e eventualmente ripetere la PCR con le impostazioni corrette.
- La PCR è stata inibita.
 - Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi 8.2 *Estrazione del DNA*) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.

-
- Accertarsi che durante l'estrazione del DNA e prima dell'eluizione sia stata eseguita l'ulteriore fase di centrifugazione consigliata per eliminare eventuali residui di etanolo (vedi 8.2 Estrazione del DNA).
 - Ci sono state perdite di DNA durante l'estrazione.
 - Se è stato aggiunto il *Controllo interno* alla procedura di estrazione, il mancato segnale del *Controllo interno* può indicare una perdita di DNA durante l'estrazione. Assicurarsi di utilizzare una delle procedure di estrazione raccomandate (vedi 8.2 Estrazione del DNA) e attenersi scrupolosamente alle indicazioni del produttore.
 - Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in 2. Conservazione o l'*artus CMV TM PCR Kit* è scaduto.
 - Verificare sia le condizioni di conservazione sia la data di scadenza (vedi etichetta del kit) dei reagenti e utilizzare eventualmente un nuovo kit.

Segnale di fluorescenza FAM della PCR analitica con i controlli negativi:

- Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR.
 - Ripetere la PCR in replicati con reagenti non ancora utilizzati.
 - Se possibile, chiudere le provette per PCR subito dopo l'aggiunta del campione da testare.
 - Pipettare i controlli positivi rigorosamente per ultimi.
 - Assicurarsi che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
- Si è verificata una contaminazione durante l'estrazione.
 - Ripetere l'estrazione e la PCR dei campioni da analizzare con reagenti non ancora utilizzati.
 - Assicurarsi che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

In caso di dubbi o problemi contattare il nostro servizio di assistenza tecnica.

11. Specifiche

11.1 Sensibilità analitica

Per la convalida dell'*artus* CMV TM PCR Kit sono stati determinati sia il limite di rilevabilità analitico, sia quello analitico considerando l'estrazione (limiti di sensibilità). Il limite di rilevabilità analitico considerando l'estrazione è stato determinato sulla base di campioni clinici CMV-positivi e tenendo conto della procedura di estrazione utilizzata. Il limite di rilevabilità analitico invece è stato determinato senza campioni clinici e indipendentemente dalla procedura di estrazione, utilizzando una concentrazione nota di DNA di CMV.

Per determinare la sensibilità analitica dell'*artus* CMV TM PCR Kit, sono state effettuate serie di diluizioni del DNA genomico di CMV da 10 al valore nominale di 0,00316 copie/ μ l di CMV e poi analizzate con i sistemi di rilevamento delle sequenze *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT* in combinazione con l'*artus* CMV TM PCR Kit. Le analisi sono state eseguite per ogni strumento in tre diversi giorni su otto replicati. I risultati sono stati determinati grazie a un'analisi probit.

Limite di rilevabilità ($p = 0,05$)	
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	0,20 copie/ μ l
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	0,20 copie/ μ l
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	0,17 copie/ μ l

Ciò significa che la probabilità di rilevare 0,20 copie/ μ l (*ABI PRISM 7000 SDS*), 0,20 copie/ μ l (*ABI PRISM 7700 SDS*) e 0,17 copie/ μ l (*ABI PRISM 7900HT SDS*) è pari al 95%.

La **sensibilità analitica tenendo conto dell'estrazione** (QIAamp DSP Virus Kit) dell'*artus* CMV TM PCR Kit è stata determinata utilizzando una serie di diluizioni del virus CMV da 1000 al valore nominale di 0,316 copie/ml di CMV, aggiunte a campioni clinici di plasma. Questi sono stati sottoposti ad estrazione del DNA utilizzando il QIAamp DSP Virus Kit (volume di estrazione: 0,5 ml, volume di eluizione: 70 µl). Ciascuno degli otto livelli di diluizione è stato analizzato in tre diversi giorni in otto replicati **utilizzando l'*artus* CMV TM PCR Kit** con i sistemi *ABI PRISM 7000*, *7700* e *7900HT SDS*. I risultati sono stati determinati mediante un'analisi probit e sono riportati nella tabella seguente.

Limite di rilevabilità (p = 0,05) tenendo conto dell'estrazione		
<i>ABI PRISM 7000 SDS</i>	64,2	copie/ml
<i>ABI PRISM 7700 SDS</i>	100,5	copie/ml
<i>ABI PRISM 7900HT SDS</i>	53,5	copie/ml

La Fig. 29 illustra graficamente l'analisi probit sullo strumento *ABI PRISM 7000 SDS*. Il limite di rilevabilità analitico dell'*artus* CMV TM PCR Kit tenendo conto dell'estrazione è di 64,2 copie/ml (p = 0,05). Ciò significa che esiste una probabilità del 95 % che vengano rilevate 64,2 copie/ml.

Analisi probit: citomegalovirus (ABI PRISM 7000 SDS)

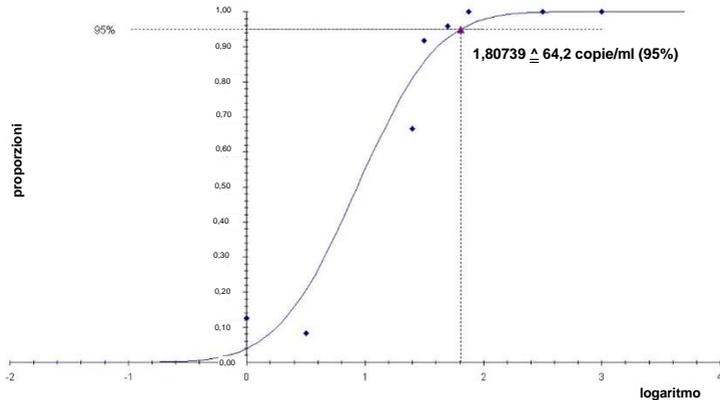


Fig. 29: Sensibilità analitica dell'artus CMV TM PCR Kit (ABI PRISM 7000 SDS) tenendo conto dell'estrazione (QIAamp DSP Virus Kit).

11.2 Specificità

La **specificità dell'artus CMV TM PCR Kit** viene garantita in primo luogo dalla scelta dei primer e delle sonde, nonché dalle condizioni stringenti di reazione. I primer e le sonde sono stati controllati per accertare eventuali omologie con tutte le sequenze pubblicate nelle banche genetiche mediante analisi comparativa delle sequenze. È stata quindi garantita la rivelabilità di tutti i ceppi rilevanti.

Inoltre, la specificità è stata convalidata con 100 diversi campioni di plasma CMV-negativi. Questi campioni non hanno generato segnali con i primer e le sonde specifici per CMV inclusi nel *CMV TM Master*.

Per determinare la specificità dell'artus CMV TM PCR Kit è stato testato il gruppo di controllo indicato nella seguente tabella (vedi Tabella 1) per rilevare una potenziale reattività crociata. Nessuno degli agenti patogeni testati è risultato reattivo. Non sono state riscontrate reattività crociate con infezioni miste.

Tabella 1: Test della specificità del kit con patogeni potenzialmente cross-reattivi.

Gruppo di controllo	CMV (FAM)	Controllo interno (VIC)
Herpesvirus umano 1 (Virus herpes simplex 1)	-	+
Herpesvirus umano 2 (Virus herpes simplex 2)	-	+
Herpesvirus umano 3 (Virus varicella-zoster)	-	+
Herpesvirus umano 4 (Virus di Epstein-Barr)	-	+
Herpesvirus umano 6A	-	+
Herpesvirus umano 6B	-	+
Herpesvirus umano 7	-	+
Herpesvirus umano 8 (Virus dell'herpes associato al sarcoma di Kaposi)	-	+
Virus dell'epatite A	-	+
Virus dell'epatite B	-	+
Virus dell'epatite C	-	+
Virus dell'immunodeficienza umana 1	-	+
Virus umano di tipo 1 della leucemia dei linfociti T	-	+
Virus umano di tipo 2 della leucemia dei linfociti T	-	+
Virus del Nilo occidentale	-	+
Enterovirus	-	+
Parvovirus B19	-	+

11.3 Precisione

I dati sulla precisione dell'*artus* CMV TM PCR Kit sono stati raccolti mediante lo strumento *ABI PRISM 7000 SDS* e consentono di determinare la varianza totale del test. La varianza totale è costituita dalla variabilità intra-test (variabilità di risultati multipli di campioni con la stessa concentrazione all'interno di uno stesso esperimento), dalla variabilità inter-test (variabilità di risultati multipli del test ottenuti su diversi strumenti dello stesso tipo da diversi operatori all'interno dello stesso laboratorio) e dalla variabilità inter-lotto (variabilità di risultati multipli del test utilizzando diversi lotti). I dati ottenuti sono stati utilizzati per determinare la deviazione standard, la varianza ed il coefficiente di variazione sia per la PCR specifica dell'agente patogeno sia per quella del *Controllo interno*.

Questi dati sono stati ottenuti per l'*artus* CMV TM PCR Kit sulla base dello *Standard di quantificazione* alla minore concentrazione (QS 4; 10 copie/ μ l). Le analisi sono state eseguite con una serie di otto replicati. I dati di precisione sono stati calcolati sulla base dei valori Ct delle curve di estrazione (Ct: *ciclo soglia*, vedi Tabella 2). Inoltre, i dati sulla precisione per i risultati quantitativi in copie/ μ l sono stati stabiliti utilizzando i corrispondenti valori Ct (vedi Tabella 3). Pertanto la dispersione statistica totale di un campione qualsiasi alla concentrazione sopra indicata è pari a 1,06% (Ct) o 12,93% (conc.), mentre per la rilevazione del *Controllo interno* è pari a 1,14% (Ct). Questi valori si basano sulla totalità di tutti i singoli valori della variabilità calcolata.

Tabella 2: Dati sulla precisione basati sui valori Ct

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-test:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,10	0,01	0,33
Variabilità intra-test:			
<i>Controllo interno</i>	0,12	0,01	0,50
Variabilità inter-test:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,21	0,04	0,67
Variabilità inter-test:			
<i>Controllo interno</i>	0,30	0,09	1,23
Variabilità inter-lotto:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,32	0,10	1,01
Variabilità inter-lotto:			
<i>Controllo interno</i>	0,26	0,07	1,05
Varianza totale:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,33	0,11	1,06
Varianza totale:			
<i>Controllo interno</i>	0,28	0,08	1,14

Tabella 3: Dati sulla precisione basati sui risultati quantitativi (in copie/ μ l).

	Deviazione standard	Varianza	Coefficiente di variazione [%]
Variabilità intra-test:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	0,72	0,52	7,20
Variabilità inter-test:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,25	1,57	12,45
Variabilità inter-lotto:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,53	2,33	15,10
Varianza totale:			
<i>CMV LC/RG/TM QS 4</i>	1,30	1,70	12,93

11.4 Robustezza

Il controllo della robustezza serve per determinare la percentuale totale di errore dell'*artus* CMV TM PCR Kit. Sono state aggiunte a 100 campioni di plasma CMV-negativi 170 copie/ml di DNA di CMV (concentrazione corrispondente all'incirca a tre volte la concentrazione del limite di sensibilità analitica). Dopo estrazione con il QIAamp DSP Virus Kit (vedi 8.2 Estrazione del DNA), questi campioni sono stati analizzati con l'*artus* CMV TM PCR Kit. Sul totale dei campioni la percentuale di errore per CMV era pari allo 0%. Inoltre, la robustezza del *Controllo interno* è stata ulteriormente verificata mediante estrazione ed analisi di 100 campioni di plasma CMV-negativi. Pertanto la robustezza dell'*artus* CMV TM PCR Kit è risultata pari al $\geq 99\%$.

11.5 Riproducibilità

I dati di riproducibilità vengono rilevati per effettuare una valutazione continua delle prestazioni dell'*artus* CMV TM PCR Kit e anche per un confronto con altri prodotti. Questi dati sono ottenuti dalla partecipazione a programmi di valutazione consolidati.

11.6 Valutazione diagnostica

L'*artus* CMV TM PCR Kit è stato valutato nell'ambito di uno studio. L'*artus* CMV TM PCR Kit è stato confrontato con il COBAS® AMPLICOR® CMV MONITOR® Test nell'analisi di 154 campioni clinici di plasma trattato con EDTA condotta in modo retrospettivo e prospettico. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi preliminare con il COBAS AMPLICOR CMV MONITOR per la diagnosi di routine e sono risultati positivi o negativi.

I campioni da sottoporre all'*artus* CMV TM PCR Kit sono stati estratti aggiungendo il *Controllo interno* dell'*artus* CMV TM PCR Kit e utilizzando il QIAamp DSP Virus Kit e poi analizzati sullo strumento ABI PRISM 7000 SDS. I campioni da sottoporre al COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test sono stati estratti e analizzati secondo le istruzioni del produttore riportate nel corrispondente foglietto illustrativo.

Tutti gli 11 campioni risultati positivi con il COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test sono risultati positivi anche con l'*artus* CMV TM PCR Kit. Tutti gli 125 campioni risultati negativi con il COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test sono risultati negativi anche con l'*artus* CMV TM PCR Kit. Sono stati ottenuti 18 risultati discordanti. I risultati sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4: Risultati dello studio di convalida comparativo.

		COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test		
		+	-	Totale
<i>artus</i> CMV TM PCR Kit	+	11	18	29
	-	0	125	125

Assumendo come riferimento i risultati del COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test, la sensibilità diagnostica di tutti i campioni dell'*artus* CMV TM PCR Kit è pari al 100% e la specificità diagnostica è pari all'87,4%.

L'ulteriore analisi dei 18 campioni discordanti ha confermato i risultati degli *artus* PCR Kit. Si può quindi ipotizzare che la discrepanza sia dovuta ad una maggiore sensibilità dell'*artus* CMV TM PCR Kit.

12. Limiti per l'uso del prodotto

- L'uso di tutti i reagenti è riservato esclusivamente alla diagnostica in vitro.
- L'utilizzo è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure della diagnostica in vitro.
- Per ottenere risultati ottimali della PCR è necessario attenersi rigorosamente al manuale utente.
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti.
- Sebbene accada raramente, eventuali mutazioni nelle regioni altamente conservate del genoma virale coperte dai primer e/o dalla sonda del kit possono essere causa di una sotto-quantificazione o perfino della mancata individuazione del virus. La validità e le prestazioni del kit vengono revisionate ad intervalli regolari.

13. Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e i relativi componenti.

Smaltire i campioni e i materiali di scarto secondo le disposizioni locali in materia di sicurezza.

14. Controllo di qualità

In conformità con il sistema globale di gestione per la qualità di QIAGEN ogni lotto dell'*artus* CMV TM PCR Kit è stato testato in base a specifiche prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

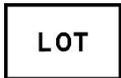
15. Bibliografia

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

16. Spiegazione dei simboli



Data di scadenza



Codice del lotto



Produttore



Numero di catalogo



Numero di materiale



Global Trade Item Number



Contenuto sufficiente per <N> test



Limite di temperatura

QS

Standard di quantificazione

IC

Controllo interno

17. Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
<i>artus</i> [®] CMV TM PCR Kit (24)	Per 24 reazioni : 2 master, 4 standard di quantificazione, controllo interno, acqua (grado PCR)	4503163
<i>artus</i> [®] CMV TM PCR Kit (96)	Per 96 reazioni: 8 master, 4 standard di quantificazione, 2 controlli interni, acqua (grado PCR)	4503165
QIAamp [®] DSP Virus Kit (50)	Per 50 preparazioni: colonnine QIAamp MinElute [®] Spin Columns, tamponi, reagenti, provette, tubi di estensione e VacConnectors	60704

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Note

Note

Note

Cronologia delle revisioni del documento

R4 11/2018	Aggiornate specifiche di rilascio QC per il Controllo interno. Aggiunta sezione Informazioni per gli ordini. Aggiornamento schemi.
---------------	--

Contratto di licenza limitata per il manuale dell'artus CMV TM PCR Kit

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce alcuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, artus® (Gruppo QIAGEN); ABI PRISM® (Applied Biosystems); AMPLICOR®, COBAS®, MONITOR® (Roche Diagnostics GmbH); FAM™, GeneAmp®, JOETM, MicroAmp®, ROXTM, VIC® (Life Technologies).

I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

11/2018 HB0069-006 1115297IT © 2018 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com