

BIO **GENE**

CMV PCR

Instrução de uso
Instrucciones de uso
Instructions for use

REF K168

Revisão: Agosto/2023

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais.....	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	4
Amostras	5
Procedimento	6
A. Extração do DNA	6
B . Preparo dos Reagentes	6
C . Diluição do Padrão Quantitativo	7
D . Preparo da PCR	7
E . Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real	8
F . Validação do Resultado	9
G . Interpretação do Resultado	10
Limitações do Processo	11
Desempenho do Produto / Controle de Qualidade	12
Comparação de Métodos e Especificidade Metodológica	12
Repetibilidade	12
Reprodutibilidade	12
Sensibilidade Clínica	13
Sensibilidade Analítica	13
Linearidade	13
Significado Diagnóstico	13
Referências Bibliográficas	14
Atendimento ao Consumidor	14
Simbologia Universal	15

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do DNA do Citomegalovírus humano (CMV) através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene CMV PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA do CMV através da PCR em tempo real.

O método de PCR em Tempo Real é usado para amplificar o DNA do patógeno.

Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração do DNA do CMV, expressa em cópias/ μ L, utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

Reagente	Apresentação
	100 Testes
R1	1 x 110 μ L*
R2	1 x 1,1 mL*
R3	1 x 1,5 mL
R4	1 x 110 μ L*
R5	1 x 500 μ L
R6	1 x 100 μ L
R7	1 x 500 μ L
R8	1 x 1,5 mL
R9	1 x 1,5 mL

*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B. (Preparo dos Reagentes).

REAGENTES

R1. Solução PCR: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R2. Mix Taq: Polimerases, dNTPs, $MgCl_2$, estabilizantes.

R3. Tampão Mix: TRIS-HCl.

R4. Solução PCR Cl: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R5. Controle Interno: Plasmídeo, TRIS-HCl.

R6. Controle Negativo: TRIS-HCl.

R7. Padrão A (2×10^5 cópias/ μL): Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

R8. Diluente: TRIS-HCl, EDTA.

R9. Água: Água livre de DNase/RNase.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS**Materiais contidos no kit:**

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador de PCR em Tempo Real).
- 2- Capela de fluxo laminar.
- 3- Tubos de centrífuga de 1,5 mL.
- 4- Tubos ou placas para reação de PCR.
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar.
- 6- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtex.
- 8- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 9- Kit para extração de ácidos nucleicos.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento.

O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C por 7 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.

3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir

agentes infecciosos. Evitar contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.

4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.

5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações de amplificação e para a amplificação/detecção de produtos amplificados. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.

6- Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.

7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.

8- Armazenar as amostras de DNA a -20°C , caso não forem utilizadas imediatamente.

9- Não usar o kit após a data de validade.

10- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

11- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

13- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Este kit deve ser utilizado com amostras de DNA extraídas de sangue total e soro.

As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas conforme descrito abaixo¹:

Soro: -20°C por 3 dias.

Sangue total: entre 2 e 8°C por 3 dias.

Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas

Para longo tempo de armazenamento, recomenda-se congelar as amostras a -70°C. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R5)** deve ser adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

- 1- Adicionar 4µL do **Controle Interno (R5)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspensas em tampão de extração / lise.
- 2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

OBS: Nunca adicionar o Controle Interno diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

B. Preparo dos Reagentes

OBS.: Os reagentes **R5** e **R7** contém molde de RNA/DNA. Eles devem ser manipulados (ressuspensos) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

- 1- Centrifugar (pulso *spin*) os reagentes: **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** antes da abertura dos microtubos.

- 2- Ressuspender o reagente **Mix Taq (R2)*** com 1,1 mL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

*O **Mix Taq (R2)** não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).

- 3- Ressuspender os reagentes, **Solução PCR (R1)** e **Solução PCR CI (R4)** com o reagente **Água (R9)** de acordo com a tabela abaixo:

Reagentes	Apresentação
	100 Testes
Solução PCR (R1)	110 µL
Solução PCR CI (R4)	110 µL

C. Diluição do Padrão Quantitativo

- 1- Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R7)**.
- 2- Pipetar 90µL do **Diluyente (R8)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
- 3- Em seguida, pipetar 10µL do **Padrão A (R7)** no microtubo B e homogeneizar.
- 4- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
- 5- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.
- 6- No final da diluição temos padrão A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A - 2×10^5 cópias/µL

Padrão B - 2×10^4 cópias/µL

Padrão C - 2×10^3 cópias/µL

Padrão D - 2×10^2 cópias/µL

D. Preparo da PCR

- 1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, Controles e Padrões Quantitativos a serem analisados.
- 2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solução PCR CI (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Para o preparo de número de reação diferente deve-se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

3- Pipetar 15µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4- Adicionar 5µL do DNA extraído das amostras ou 5µL dos Padrões Quantitativos ou 5µL do **Controle Negativo (R6)** nos tubos previamente determinados.

5- Homogeneizar bem.

6- Observar que o volume total da reação é de 20µL, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo, Controle Interno e Padrões Quantitativos).

7- Transportar os tubos/placa para o termociclador e seguir o descrito na seção E (Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real).

E. Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo com Curva Padrão.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

Alvo	Detector	Quencher
CMV	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

Obs: O Controle Negativo e os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno, pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.

3- Defina os Padrões Quantitativos (Standards) como:

Padrão A – 2×10^5 cópias/ μ L

Padrão B – 2×10^4 cópias/ μ L

Padrão C – 2×10^3 cópias/ μ L

Padrão D – 2×10^2 cópias/ μ L

4- Defina as condições dos ciclos:

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

F. Validação do Resultado**1- Curva Padrão**

Curva Padrão	Faixa Permitida	Amplificação / Detecção
Coefficiente de correlação (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Se o valor de R^2 não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

2- Controle Negativo

CT Controle Negativo		Resultado	Amplificação/ Detecção
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Amostras

CMV		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Concentração determinada	$25 \leq CT \leq 35$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Positivo	Inválido*
Concentração indeterminada	$25 \leq CT \leq 35$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Negativo	Inválido*

*Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

Exemplo: Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

G. Interpretação do Resultado

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação.

O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

Exemplo: Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será 2.0×10^5 cópias/ μ L.

Resultado da Amostra em Cópias/ μ L (FAM)	Cópias por Reação
$\geq 1 \times 10^6$	$> 1.000.000$
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

A não detecção do DNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

1- Cálculo de conversão para cópias/mL

$$\text{Resultado em Cópias/mL} = \frac{\text{Cópias}/\mu\text{L} \times \text{Volume de eluição } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Volume de amostra extraída (mL)}^{**}}$$

*Resultado da quantificação da amostra fornecido pelo equipamento em cópias/ μ L.

**De acordo com protocolo do kit de extração utilizado.

Exemplo: Volume de Eluição: 30 μ L

Volume de Amostra: 200 μ L (0,2 mL)

Quantificação da amostra: 5000 cópias/ μ L

$$\text{Resultado em cópias/mL} = \frac{(5000 \text{ cópias}/\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0,2\text{mL}}$$

$$\text{Resultado em cópias/mL} = 750.000 \text{ cópias/mL}$$

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

Não é recomendado o uso de heparina na coleta de amostras para testes moleculares, devido à inibição da PCR, podendo gerar resultados falso negativos.

Amostras com presença de inibidores de PCR devem ser diluídas para reduzir o seu efeito na reação.

DESEMPENHO DO PRODUTO

EXATIDÃO

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O kit **Bio Gene CMV PCR** foi comparado com outro kit para a quantificação do DNA do CMV. Foram realizadas 50 análises e os resultados foram avaliados. Os resultados obtidos, entre os kits avaliados, apresentaram variações inferiores a 0,5 Log. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

PRECISÃO

Repetibilidade

Foram realizadas 10 dosagens sucessivas de 2 amostras positivas com concentrações distintas, os resultados estão mostrados na tabela abaixo:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração Média (Log)	5,114	4,319
Desvio Padrão (Log)	0,070	0,094
Coeficiente de Variação (%)	1,374	2,198

Reprodutibilidade

Foram realizadas 10 dosagens durante 3 dias consecutivos com 1 amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração Média (Log)	4,319	4,307	4,395
Desvio Padrão (Log)	0,094	0,059	0,061
Coeficiente de Variação (%)	2,198	1,373	1,403

SENSIBILIDADE CLÍNICA

O kit **Bio Gene CMV PCR** apresentou sensibilidade clínica de 99,9% e especificidade clínica de 99,9%.

Método		Dados Clínicos		Total
Bio Gene CMV PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		25	25	50

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A sensibilidade analítica encontrada nos estudos de performance foi 2,40 cópias/ μ L (0,38 log), ou seja, a técnica foi capaz de detectar aproximadamente 12 moléculas alvos em 5 μ L do produto de extração do DNA adicionado a reação de amplificação.

LINEARIDADE

A linearidade encontrada nos estudos de performance foi de $2,03 \times 10^5$ cópias/ μ L (5,307 log).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Citomegalovírus Humano (CMV) pertence a família Herpesviridae e ao gênero Cytomegalovirus e atualmente é denominado Human betaherpesvirus 5 (HHV5). O CMV é um patógeno humano transmitido através da saliva, contato sexual, perinatal, transplantação de órgão ou transfusão de sangue. Na maioria dos casos, a infecção permanece assintomática. No entanto, a infecção pelo CMV pode causar doenças graves em recém-nascidos e indivíduos imunodeprimidos, como pacientes com HIV, câncer ou de pacientes que receberam transplante de órgãos. Durante a terapia imunossupressora, frequentemente ocorre uma reativação do vírus latente ou infecção primária. As infecções por CMV podem ser adquiridas antes do nascimento, durante o parto e mais tarde na vida. Podendo causar graves anomalias congênitas, tais como microcefalia, deficiência motora e retardamento mental. Portanto, a determinação primária de infecção materna e sua distinção da infecção latente são importantes. Logo, a detecção quantitativa do CMV por PCR em tempo real tem grande importância pela precisão e agilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Baldanti, F.; Lilleri, D.; Gerna, G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. J Clin Virol 2008; 41:237–41.
3. De Vries. J. J; Van der Eijk. A. A; Wolthersc. K. C. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J Clin Virol 2011:2352.
4. Grosse, S. D; Ross, D. S; Dollard, SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. J Clin Virol 2008;41:57–62.

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do kit Bio Gene CMV PCR na ANVISA: 10269360245

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÂMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO

BIO GENE

CMV PCR

***Español** . Instrucciones de uso*

REF K168

Revisión: Agosto/2023

ÍNDICE

Finalidad	3
Principio de Acción	3
Presentación	3
Reactivos	4
Equipamientos e Insumos Operacionales	4
Condiciones de Almacenamiento y Transporte	4
Cuidados Especiales	5
Muestras	6
Procedimiento	6
A . Extracción de DNA	6
B . Preparo de los Reactivos	6
C . Dilución de lo Patrón Cuantitativo	7
D . Preparo de la PCR	8
E . Definciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real	8
F . Validación de lo Resultado	10
G. Interpretación de lo Resultado	11
Limitaciones de Proceso	12
Desempeño del Producto / Control de Calidad	12
Comparación de Métodos y Especificidad Metodológica	13
Repetibilidad	13
Reproductibilidad	13
Sensibilidad Clínica	13
Sensibilidad Analítica	14
Linealidad	14
Significado Diagnóstico	14
Referencias Bibliográficas	14
Asistencia al Consumidor	15
Simbología Universal	16

FINALIDAD

Test para detección cuantitativa del DNA del Citomegalovirus humano (CMV) através de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

El kit **Bio Gene CMV PCR** es un ensayo *in vitro* basado en la detección cuantitativa del DNA del CMV a través de la PCR en tiempo real.

El método de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar el DNA del patógeno.

Un termociclador de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar y detectar la sonda fluorescente. El software del aparato calcula la concentración del DNA del CMV, expresa en copias/ μ L, utilizando la curva patrón generada a partir de lo patrón cuantitativo contenido en el kit.

Reactivo	Presentación
	100 Pruebas
R1	1 x 110 μ L *
R2	1 x 1,1 mL *
R3	1 x 1,5 mL
R4	1 x 110 μ L *
R5	1 x 500 μ L
R6	1 x 100 μ L
R7	1 x 500 μ L
R8	1 x 1,5 mL
R9	1 x 1,5 mL

*Reactivos liofilizados. Los volúmenes arriba descritos corresponden el volumen final después de la resuspensión de los reactivos como se describe en el ítem PROCEDIMIENTO, subítem B (Preparación de los Reactivos).

REACTIVOS

R1. Solución PCR: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R2. Mix Taq: Polimerasas, dNTPs, $MgCl_2$, estabilizadores.

R3. Tampón Mix: TRIS-HCl.

R4. Solución PCR Cl: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R5. Control Interno: Plásmido, TRIS-HCl.

R6. Control Negativo: TRIS-HCl.

R7. Patrón A (2×10^5 copias/ μL): Plásmido, TRIS-HCl, EDTA.

R8. Diluyente: TRIS-HCl, EDTA.

R9. Agua: Agua libre de DNase/RNase.

EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERACIONALES**Materiales contenidos en el kit:**

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucción de uso (manual).

Materiales necesarios, pero no contenidos en el kit:

- 1- Sistema óptico programable de detección de fluorescencia (Termociclador de PCR en Tiempo Real).
- 2- Cámara del flujo laminar.
- 3- Tubos de microcentrífuga 1,5mL.
- 4- Tubos o placa para reacción de PCR.
- 5- Guantes de látex desechables libres de polvo o material similar.
- 6- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtice.
- 8- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 9- Kit para extracción de ácidos nucleicos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento es de -20°C (-10 a -30°C).

Después de resuspensión de los reactivos liofilizados, el producto es estable por 6 meses a partir de la fecha de resuspensión. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento.

El transporte puede realizarse a temperaturas entre 2 y 30°C por hasta 7 días. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad.

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro*.

2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.

3- Manipular y desechar todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para la realización del ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evitar contacto directo con las muestras biológicas y los reactivos. Evitar derrames o aerosol. Los residuos deben ser manipulados y desechados de acuerdo con las medidas de seguridad adecuadas.

4- Procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción inversa, amplificación y detección requieren personal calificado para evitar el riesgo de resultados errados, especialmente debido a la degradación de ácidos nucleicos contenidos en las muestras o contaminación de la muestra por productos de amplificación.

5- Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción/preparación de reacciones de amplificación y para la ampliación/detección de productos amplificados. Nunca introducir un producto de amplificación en el área destinada para la extracción o preparación de productos de amplificación.

6- Todas las muestras y reactivos deben ser manipulados debajo de una Cámara de flujo laminar. Las pipetas deben ser usadas con punteras con filtro. Las punteras empleados deben ser estériles, libres de DNases y RNases.

7- Evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de los reactivos.

8- Almacenar las muestras de DNA a -20°C, caso no fueran utilizadas inmediatamente.

9- No usar el kit después de la fecha de vencimiento.

10- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.

11- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

12- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.

13- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

Este kit puede ser utilizado con muestras de DNA extraídas de sangre total o suero.

Las muestras deben ser colectadas de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para las pruebas moleculares. Deben ser transportados y almacenados como se describe a continuación¹:

Suero: -20 ° C durante 3 días.

Sangre Total: entre 2 y 8 ° C durante 3 días.

DNA (extraído): Utilizar muestras de DNA adecuadas a la amplificación por PCR con pureza y concentración adecuadas.

Para un largo tiempo de almacenamiento, se recomienda congelar las muestras a -70°C. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento repetido.

PROCEDIMIENTO

A. Extracción de DNA

Los ácidos nucleicos (DNA) de las muestras deben ser extraídos siguiendo las instrucciones de uso del kit escogido. Para controlar el proceso de extracción, el **Control Interno (R5)** debe ser añadido a las muestras durante la extracción, como se describe a abajo:

1- Añadir 4µL del **Control Interno (R5)** a cada tubo conteniendo las muestras ya resuspendidas en tapón de extracción/lisis.

2- Completar el proceso de extracción de acuerdo con las instrucciones de uso del kit de extracción.

Obs: Nunca añadir el Control Interno directamente a la muestra biológica pura, pues puede resultar en degradación del mismo.

B. Preparación de los Reactivos

OBS.: Los reactivos **R5** y **R7** contienen molde de RNA/DNA. Ellos deben ser manipulados (resuspender) en área apropiada para evitar la contaminación de los demás reactivos.

1- Centrifugar (pulso *spin*) los reactivos: **Solución PCR (R1)**, **Solución PCR CI (R4)**, **Control Interno (R5)** y **Patrón A (R7)** antes de la abertura de los microtubos.

2- Resuspender lo reactivo **Mix Taq (R2)*** con 1,1 mL del reactivo **Tapón Mix (R3)**.

*El reactivo **Mix Taq (R2)** no contiene fluoróforo de referencia pasiva (ROX).

3- Resuspender los reactivos, **Solución PCR (R1)** y **Solución PCR CI (R4)** con el reactivo **Agua (R9)** de acuerdo con la tabla abajo:

Reactivos	Presentación
	100 Pruebas
Solución PCR (R1)	110 µL
Solución PCR CI (R4)	110 µL

C. Dilución de lo Patrón Cuantitativo

1- Separar 3 microtubos (no fornecido en el kit) adecuados para la dilución seriada del **Patrón A (R7)**.

2- Pipetear 90µL del **Diluyente (R8)** en cada microtubo y nombrarlos como B, C y D respectivamente.

3- En seguida, pipetear 10 µL del **Patrón A (R7)** en el microtubo B y homogenizar.

4- Cambiar la puntera y pipetear 10µL del microtubo B en el microtubo C y homogenizar.

5- Cambiar la puntera y pipetear 10µL del microtubo C en el microtubo D y homogenizar.

6- Al final de la dilución tenemos patrones A, B, C y D con las siguientes concentraciones:

Patrón A – 2×10^5 copias/µL

Patrón B – 2×10^4 copias/µL

Patrón C – 2×10^3 copias/µL

Patrón D – 2×10^2 copias/µL

D. Preparación de la PCR

- 1- Separar previamente los microtubos/pozos a ser utilizados, de acuerdo con el número de muestras, Controles y Patrones Cuantitativos a ser analizados.
- 2- Preparar el volumen de la solución de PCR final de acuerdo con el número de reacciones que se debe realizar.

Reactivos	1 Reacción	25 Reacciones	50 Reacciones	100 Reacciones
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solución PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solución PCR CI (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Agua (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Para la preparación de un número diferente de reacción se debe multiplicar el volumen de cada reactivo para una reacción por el número de reacciones requeridas.

- 3- Pipetear 15µL de la solución de PCR final en los microtubos/pozos a ser utilizados.
- 4- Añadir 5µL del DNA extraído de la muestra o 5µL de los Patrones Cuantitativos o 5µL de lo **Control Negativo (R6)** en los tubos predeterminados.
- 5- Homogenizar bien.

6- Observar que el volumen total de la reacción es de 20µL, y cada corrida de PCR debe incluir los controles relevantes (Control Negativo, Control Interno y Patrones Cuantitativos).

7- Transportar los tubos/placa para el termociclador y seguir lo descrito en la sección E (Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real).

E. Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real

Verificar el manual de operaciones del equipamiento de PCR en tiempo real para la programación de lo experimento.

1- Defina el tipo del experimento:

Pruebas Cuantitativas con Curva Patrón.

2- Defina los detectores (sondas) fluorescentes como:

Alvo	Detector	Quencher
CMV	FAM	NFQ-MGB
Control Interno	VIC	

Obs: El Control Negativo y los Patrones Cuantitativos no presentan el Control Interno, pues el mismo es utilizado para control de extracción y amplificación de las muestras.

3- Defina los Patrones Cuantitativos (Standards) como:

Patrón A – 2×10^5 copias/ μ L

Patrón B – 2×10^4 copias/ μ L

Patrón C – 2×10^3 copias/ μ L

Patrón D – 2×10^2 copias/ μ L

4- Defina las condiciones de los ciclos:

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina "Data Collection" como "stage 2, step 2 (60@0:60)".

F. Validación de lo Resultado

1- Curva Patrón

Curva Patrón	Rango Permitido	Amplificación / Detección
Coeficiente de correlación (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Si el valor de R^2 no queda entre los límites del rango permitido, el resultado es considerado inválido y la prueba debe ser repetida.

2- Control Negativo

CT Control Negativo		Resultado	Amplificación/ Detección
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Muestras

CMV		Resultado	Detección
FAM	VIC		
Concentración determinada	$25 \leq CT \leq 35$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Positivo	Inválido*
Concentración indeterminada	$25 \leq CT \leq 35$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Negativo	Inválido*

*El valor de CT del Control Interno varía con las condiciones del proceso, tales como la eficiencia de la extracción de DNA/RNA, la concentración de las muestras y los ajustes del termociclador. Por lo tanto, estas condiciones deben ser evaluadas cuando los valores de CT no son apropiados y los resultados relevantes se pueden validar.

Ejemplo: Las muestras con un alto número de copias de DNA/RNA pueden, en algunos casos, inhibir la amplificación del Control Interno resultante en el valor de CT fuera del rango óptimo, este resultado no invalida el test.

Si los requisitos mencionados no fueran cumplidos, el ensayo es considerado inválido y el test debe ser repetido.

G. Interpretación de lo Resultado

El kit es capaz de detectar 10 a 1.000.000 copias por reacción.

El software del aparato calcula automáticamente la concentración de las muestras.

Ejemplo: Si el programa muestra una concentración como 2.00E+005, entonces la concentración de la muestra será 2.0×10^5 copias/ μ L.

Resultado de la Muestra en Copias/μL (FAM)	Copias por Reacción
$\geq 1 \times 10^6$	$> 1.000.000$
$2 \leq \text{Cantidad} \leq 9 \times 10^5$	Cantidad obtenida
< 2	< 10

Si el DNA del patógeno no es detectado, esto no excluye la presencia de infección cuando el título del patógeno está por debajo de lo límite de detección de este kit.

Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

Los resultados deben ser evaluados teniendo en cuenta los datos clínicos y las pruebas de laboratorio del paciente.

1- Cálculo de conversión para copias/mL

$$\text{Resultado en Copias/mL} = \frac{\text{Copias/}\mu\text{L}^* \times \text{Volumen de elución (}\mu\text{L)}^{**}}{\text{Volumen de la muestra extraída (mL)}^{**}}$$

* Resultado de la cuantificación de la muestra proporcionados por lo equipamiento en copias/ μL .

** De acuerdo con protocolo del kit de extracción utilizado.

Ejemplo: Volumen de elución: 30 μL

Volumen de la muestra: 200 μL (0,2 mL)

Cuantificación de la muestra: 5000 copias/ μL

$$\text{Resultado en copias/mL} = \frac{(5000 \text{ copias/ } \mu\text{L} \times 30 \mu\text{L})}{0,2 \text{ mL}}$$

$$\text{Resultado en copias/mL} = 750.000 \text{ copias/mL}$$

LIMITACIONES DEL PROCESO

Contaminaciones cruzadas que ocurren durante la colecta de la muestra, procesamiento, transporte y almacenamiento podrán ocasionar resultados falsos.

No se recomienda el uso de heparina en la toma de muestras para pruebas moleculares, debido a la inhibición de la PCR, pudiendo generar resultados falsos negativos.

Las muestras con presencia de inhibidores de la PCR deben diluirse para reducir su efecto en la reacción.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

EXACTITUD

COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA

El kit **Bio Gene CMV PCR** fue comparado con otro protocolo para la cuantificación del DNA del CMV. Fueron realizadas 50 análisis y los resultados fueron evaluados. La diferencia entre los valores de las muestras, obtenidos en los dos productos fue $\leq 0,5$ log. Con estos resultados se puede concluir que el kit presenta buena especificidad metodológica.

PRECISIÓN

Repetibilidad

Fueron realizadas 10 dosificaciones sucesivas de 2 muestras positivas con concentraciones distintas, los resultados están mostrados en la tabla abajo:

	Muestra 1	Muestra 2
Concentración Promedio (Log)	5,114	4,319
Desvio Patrón (Log)	0,070	0,094
Coefficiente de Variación (%)	1,374	2,198

Reproductibilidad

Fueron realizadas 10 dosificaciones durante 3 días consecutivos con 1 muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

	Día 1	Día 2	Día 3
Concentración Promedio (Log)	4,319	4,307	4,395
Desvio Patrón (Log)	0,094	0,059	0,061
Coefficiente de Variación (%)	2,198	1,373	1,403

SENSIBILIDAD CLÍNICA

El kit **Bio Gene CMV PCR** presentó sensibilidad clínica de 99,9% y especificidad clínica de 99,9%.

Método		Datos Clínicos		Total
Bio Gene CMV PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		25	25	50

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica encontrada en los estudios de desempeño fue 2,40 copias/ μ L (0,38 log), o sea, la técnica fue capaz de detectar aproximadamente 12 moléculas alvos en 5 μ L del producto de extracción del DNA añadido a reacción de amplificación.

LINEALIDAD

La linealidad encontrada en los estudios de rendimiento fue de $2,03 \times 10^5$ copias/ μ L (5,307 log).

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Citomegalovirus Humano (CMV) pertenece a la familia Herpesviridae e ao género Cytomegalovirus y que ahora se llama Human betaherpesvirus 5 (HHV5). CMV es un patógeno humano transmitido através de la saliva, contacto sexual, perinatal, transplante de órgano o transfusión de sangre. En la mayoría de los casos, la infección permanece asintomática. Sin embargo, la infección por el CMV puede causar dolencias graves en recién nacidos e individuos inmunodeprimidos, como pacientes con HIV, cáncer o de pacientes que recibieron transplante de órganos. Durante la terapia inmunosupresora, frecuentemente ocurre una reactivación del virus latente o infección primaria. Las infecciones por CMV pueden ser adquiridas antes del nacimiento, durante el parto y más tarde en la vida. Pudiendo causar graves anomalías congénitas, tales como microcefalia, discapacidad motora y retardo mental. Por lo tanto, la determinación primaria de infección materna y su distinción de la infección latente son importantes. Luego, la detección cuantitativa del CMV por PCR en tiempo real tiene gran importancia por la precisión y agilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Baldanti, F.; Lilleri, D.; Gerna, G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. J Clin Virol 2008; 41:237–41.
3. De Vries, J. J; Van der Eijk, A. A; Wolthersc. K. C. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J Clin Virol 2011:2352.
4. Grosse, S. D; Ross, D. S; Dollard, SC. Congenital cytomegalovirus

(CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. J Clin Virol 2008;41:57–62.

ASISTENCIA AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro del kit Bio Gene CMV PCR en la ANVISA:
10269360245

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)		CONTROL NEGATIVO
	LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)		RIESGO BIOLOGICO
	EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA		INFLAMABLE
	VER INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

BIO GENE

CMV PCR

English . Instructions for use

REF K168

Review: August/2023

INDEX

Function	3
Principle of Action	3
Presentation	3
Reagents	4
Equipaments and Operational Inputs	4
Transportation and storage Conditions	4
Special Care	4
Samples	5
Process Description	6
A . DNAExtraction	6
B . Preparation of the reagents	6
C . Dilution of Quantitative Standard	7
D . PCR Preparation	7
E . Thermocycler settings for Real-Time PCR	8
F . Result Validation	10
G. Result Interpretation	11
Process Limitations	12
Product Performance / Quality Control	12
Comparison of Methods and Methodology Specificity	12
Repeatability	12
Reproducibility	13
Clinical Sensitivity	13
Analytical Sensitivity	14
Linearity	14
Diagnostic Significance	14
Bibliographic References	14
Customer Service	14
Universal Symbolology	15

FUNCTION

Quantitative detection of Human cytomegalovirus (CMV) DNA through reverse transcription followed by real-time polymerase chain reaction (PCR). For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

The **Bio Gene CMV PCR** test is a *in vitro* assay based on the quantitative detection of CMV DNA by real-time PCR.

The Real-Time PCR method is used to amplify the pathogen DNA.

A thermocycler for Real-Time PCR is used to amplify and detect the fluorescent probe. Software calculates the CMV DNA concentration, expressed in copies/ μ L, using the standard curve generated from the quantitative standard, contained in the kit.

Reagent	Presentation
	100 Tests
R1	1 x 110 μ L*
R2	1 x 1.1 mL*
R3	1 x 1.5 mL
R4	1 x 110 μ L*
R5	1 x 500 μ L
R6	1 x 100 μ L
R7	1 x 500 μ L
R8	1 x 1.5 mL
R9	1 x 1.5 mL

*Lyophilized reagents. The volumes described above refer to the final volume after the reagents resuspension, as described in the item PROCESS DESCRIPTION, subitem B (Preparation of the Reagents).

REAGENTS

R1. PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R2. Mix Taq: Polymerases, dNTPs, $MgCl_2$, stabilizers.

R3. Mix Buffer: TRIS-HCl.

R4. IC PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R5. Internal Control: Plasmid, TRIS-HCl.

R6. Negative Control: TRIS-HCl.

R7. Standard A (2×10^5 copies/ μL): Plasmid, TRIS-HCl, EDTA.

R8. Diluent: TRIS-HCl, EDTA.

R9. Water: DNase/RNase free water.

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS**Materials in the kit:**

- Reagents described in the previous item.
- Usage instructions (manual).

Materials needed but not contained in the kit:

- 1- Real-time PCR thermocycler.
- 2- Laminar flow hood.
- 3- 1.5 ml microcentrifuge tubes.
- 4- PCR reaction tubes or plate.
- 5- Powder free latex gloves or similar material.
- 6- Microcentrifuge (3,000 - 12,000 rpm).
- 7- Vortex.
- 8- Micropipettes and sterile filter pipette tips (0.5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 9- Nucleic acid extraction kit.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The required storage temperature is -20°C (-10 to -30°C). **After resuspension of lyophilized reagents, the product is stable for 6 months from the date of resuspension.** Avoid freezing and thawing.

The kit may be transported between 2 and 30°C for 7 days. Protect from light and avoid moisture.

SPECIAL CARE

- 1- For *in vitro* diagnostic use only.

- 2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.
- 3- Handle and dispose of all biological samples, reagents and materials as it contain infectious agents. Avoid direct contact with biological samples and reagents. Avoid spills and aerosol. Handle and dispose of wastes in accordance with appropriate security procedures.
- 4- It is require skilled personnel for the molecular biology procedures in order to minimize the risk of erroneous results, degradation of nucleic acids contained in the samples or even sample contamination by amplicons.
- 5- It is necessary to have separate areas for the extraction / preparation of amplification reactions and for the amplification / detection of amplified products. Never introduce an amplification product in the area intended for the extraction or preparation of amplification products.
- 6- All samples and reagents should be handled inside a laminar flow hood. It is necessary to use sterile and DNase/RNase free filter pipettes tips.
- 7- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents.
- 8- Store the DNA samples at -20°C in case they will not be used immediately.
- 9- Do not use reagents after expiration date.
- 10- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.
- 11- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.
- 12- Do not use the product in case of damaged packaging.
- 13- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

This kit should be used with DNA samples extracted from serum and whole blood. Samples should be collected according to laboratory recommendations for molecular testing. They must be transported and stored as described below¹:

Serum: at -20 °C for 3 days.

Whole Blood: between 2 and 8 ° C for 3 days.

DNA (extracted): Use DNA samples suitable for PCR amplification with adequate purity and concentration.

For long-term storage, it is recommended to freeze samples at -70°C. Avoid repeated freezing and thawing of the samples.

PROCESS DESCRIPTION

A. DNA Extraction

The nucleic acids (DNA) must be extracted in accord to the procedure of the chosen extraction kit.

For control of the extraction process, the **Internal Control (R5)** must be added to the samples during the extraction as described below:

- 1- Add 4µL of the **Internal Control (R5)** to each tube containing the resuspended samples in extraction/lysis buffer.
- 2- Complete the extraction procedure according to the usage instructions of the extraction kit.

Note: Never add the Internal Control directly to pure biological sample. This may result in degradation of the sample.

B. Preparation of the Reagents

Note: **R5** and **R7** reagents contain RNA/DNA template. They need to be handle (resuspended) in a separated area.

- 1- Before open, spin (*spin* pulse) each of the following reagents: **PCR Solution (R1)**, **IC PCR Solution (R4)**, **Internal Control (R5)** and **Standard A (R7)**.
- 2- Resuspend the **Mix Taq (R2)*** reagent with 1.1 mL of **Mix Buffer (R3)** reagent.

*The **Mix Taq (R2)** reagent does not contain passive reference Dye (ROX).

- 3- Resuspend the reagents, **PCR Solution (R1)** and **IC PCR Solution (R4)** with **Water (R9)** reagent, in according to the following table:

Reagent	Presentation
	100 Tests
PCR Solution (R1)	110 µL
IC PCR Solution (R4)	110 µL

C. Dilution of Quantitative Standard

- 1- Select 3 microtubes (not supplied in the kit) suitable for serial dilution of **Standard A (R7)**.
- 2- Pipette 90µL of the **Diluent (R8)** in each microtube and name them as B, C and D respectively.
- 3- Pipette 10µL of **Standard A (R7)** in microtube B and mix.
- 4- Replace the tip and pipette 10µL of microtube B in microtube C and mix.
- 5- Replace the tip and pipette 10µL of microtube C in microtube D and mix.
- 6- At the end of dilution procedure, it will be available 4 standards with the following concentrations:

Standard A - 2×10^5 copies/µL

Standard B - 2×10^4 copies/µL

Standard C - 2×10^3 copies/µL

Standard D - 2×10^2 copies/µL

D. PCR Preparation

- 1- Prior beginning the assay, select sufficient number of microtubes/wells to be used on the reaction, in accord to the number of samples, Controls and Quantitative Standards to be used.

2- Prepare the final PCR solution in accord with reactions number required.

Reagents	1 Reaction	25 Reactions	50 Reactions	100 Reactions
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
PCR Solution (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
IC PCR Solution (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Water (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

To prepare different reaction number must be multiplied the volume of reagents for a reaction by the number of required reactions.

3- Pipette 15µL of the final PCR solution in microtubes or wells previously determined.

4- Add 5µL of extracted DNA sample or 5µL of Quantitative Standards or 5µL of **Negative Control (R6)** in previously determined tubes.

5- Mix well.

6- The total volume of the reaction is 20µL. Each PCR run should include the relevant controls: Negative Control, Internal Control and Quantitative Standards.

7- Transport the tubes/plate to the thermocycler and follow the instructions in the section E (Thermocycler Settings for Real-Time PCR).

E. Thermocycler Settings for Real-Time PCR

Check the operation manual of the Real-time PCR thermocycler to program the experiment.

1- Set the type of experiment:

Quantitative Test with Standard Curve.

2- Set the fluorescent probes:

Target	Detector	Quencher
CMV	FAM	NFQ-MGB
Internal Control	VIC	

Note: The Negative Control and Quantitative Standards do not present the Internal Control, because it is used for extraction and amplification control of the samples.

3- Set the quantitative standards:

Standard A - 2×10^5 copies/ μ L

Standard B - 2×10^4 copies/ μ L

Standard C - 2×10^3 copies/ μ L

Standard D - 2×10^2 copies/ μ L

4- Set the cycling conditions:

Stage	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	2 minutes	1
2	95°C	10 seconds	50
	60°C	60 seconds	

Set "Data Collection" as "stage 2, step 2 (60@0:60)".

F. Result Validation

1- Standard Curve

Standard Curve	Permitted Range	Amplification / Detection
Correlation Coefficient (R^2)	$0.99 \leq R^2 \leq 1.00$	Valid

If the R^2 value does not fall within the limits of range, the result must be considered invalid and the test must be repeated.

2- Negative Control

CT Negative Control		Result	Amplification/ Detection
FAM	VIC		
Undetermined	Undetermined	Negative	Valid

3- Samples

CMV		Result	Detection
FAM	VIC		
Determined concentration	$25 \leq CT \leq 35$	Positive	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Positive	Invalid*
Undetermined concentration	$25 \leq CT \leq 35$	Negative	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Negative	Invalid*

*The CT values of Internal Control vary with the process conditions, as the extraction efficiency of the DNA/RNA, the concentration of the samples and the thermocycler settings. Therefore, these conditions must be evaluated when the CT values are not appropriated and, in case it is relevant, the results can be validated.

Example: In some cases, the samples with high numbers of copies of DNA / RNA can inhibit the amplification of the Internal Control, resulting in CT value outside the optimal range, this does not invalidate the test results.

If the above requirements are not achieved, the assay must be considered invalid and must be repeated.

G. Result Interpretation

This kit is able to detect from 10 to 1.000.000 copies of DNA per reaction.

The thermocycler software calculates automatically the samples concentration.

Example: If the program shows a concentration of 2.00E+005, this means that the sample concentration is 2.0×10^5 copies/ μ L.

Sample Result in Copies/μL (FAM)	Copies per Reaction
$\geq 1 \times 10^6$	$> 1.000.000$
$2 \leq \text{Quantity} \leq 9 \times 10^5$	Quantity obtained
< 2	< 10

The non-detection of the pathogen DNA does not exclude the presence of infection when the pathogen title is below the detection limit of this kit.

The results provided by this kit must be interpreted by the medical professional responsible, not being the only parameter for the determination of diagnosis and/or treatment of the patient.

The results obtained must be evaluated considering the clinical data and laboratory tests of the patient.

1- Conversion calculation for copies/mL

$$\text{Result in copies/mL} = \frac{\text{Copies/}\mu\text{L} * \text{Elution volume (}\mu\text{L)}^{**}}{\text{Extracted sample volume (mL)}^{**}}$$

*Result of quantification of the sample provided by the equipment in copies/ μL .

**According to the protocol of the extraction kit used.

Example: Elution volume: 30 μL

Sample volume: 200 μL (0.2 mL)

Quantification of the sample: 5000 copies/ μL

$$\text{Result in copies/mL} = \frac{(5000 \text{ copies/}\mu\text{L} \times 30\mu\text{L})}{0.2\text{mL}}$$

$$\text{Result in copies/mL} = 750.000 \text{ copies/mL}$$

PROCESS LIMITATIONS

Cross contamination that eventually occurs during the sample collection, processing, transportation and storage may give false results.

The heparin use in the samples collection for molecular tests is not recommended, due to the PCR inhibition which can generate false negative results.

The samples with presence of PCR inhibitors should be diluted to reduce their effect on the reaction.

PRODUCT PERFORMANCE

ACCURACY

COMPARISON OF METHODS AND METHODOLOGY SPECIFICITY

The **Bio Gene CMV PCR** test was compared with another protocol for the quantification of the CMV DNA. 50 analyzes were performed and the results were evaluated. Comparing the two tests, the difference between the results obtained was ≤ 0.5 log. This show that the test has good methodological specificity.

PRECISION

Repeatability

The repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 2 positive samples with different concentrations, obtaining the following results:

	Sample 1	Sample 2
Average Concentration (Log)	5.114	4.319
Standard Deviation (Log)	0.070	0.094
Coefficient of variation (%)	1.374	2.198

Reproducibility

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations for 3 consecutive days, using 1 sample with different concentrations, obtaining the following results:

	Day 1	Day 2	Day 3
Average Concentration (Log)	4.319	4.307	4.395
Standard Deviation (Log)	0.094	0.059	0.061
Coefficient of variation (%)	2.198	1.373	1.403

CLINICAL SENSITIVITY

The **Bio Gene CMV PCR** showed clinical sensitivity of 99.9% and a clinical specificity of 99.9%.

Method		Clinical Data		Total
Bio Gene CMV PCR	Result	Positive	Negative	
	Positive	25	0	25
	Negative	0	25	25
TOTAL		25	25	50

ANALYTICAL SENSITIVITY

It was found in the performance study that the analytical sensitivity of the kit is 2.40 copies/ μ L (0.38 log). This means the assay is capable to detect approximately 12 target molecules in 5 μ L DNA extraction product, used on the amplification reaction.

LINEARITY

The linearity found in the performance studies was 2.03×10^5 copies/ μ L (5.307 log).

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Human cytomegalovirus (CMV) belongs to Herpesviridae family and genus Cytomegalovirus and is now called Human betaherpesvirus 5 (HHV5). The CMV is a human pathogen transmitted through saliva, sexual contact, perinatal, organ transplant or blood transfusion. In most cases, the infection is asymptomatic. However, CMV infection can cause serious illness in neonatal and immunocompromised individuals, such as patients with HIV, cancer or patients who have received organ transplants. During immunosuppressive therapy, often there is a reactivation of a latent virus or a primary infection. CMV infections can be acquired before birth, during birth and later in life. It is may cause serious birth defects such as microcephaly, physical disabilities and mental retardation. Because of that, the primary determination of maternal infection and its distinction of latent infection are so important.

Therefore, the quantitative detection of CMV by real time PCR is very important due to its accuracy and agility.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Baldanti, F.; Lilleri, D.; Gerna, G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. J Clin Virol 2008; 41:237-41.
3. De Vries. J. J; Van der Eijk. A. A; Wolthersc. K. C. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J Clin Virol 2011:2352.
4. Grosse, S. D; Ross, D. S; Dollard, SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. J Clin Virol 2008;41:57-62.

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service

Phone: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for Bio Gene CMV PCR: 10269360245

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR <N> TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER



Bioclin · QUIBASA



Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130
Tel +55 31 3439 5454 . Fax +55 31 3439 5455 . www.bioclin.com.br
FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira