



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN Nº

7 0 8 4

BUENOS AIRES

0 1 JUL. 2016

VISTO, el expediente nº 1-47-3110-526/16-0 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma BIOMERIEUX ARGENTINA S.A. solicita la modificación del nombre y la condiciones de conservación del producto para Diagnóstico de uso "In Vitro" denominado CMV R-GENE® QUANTIFICATION, autorizado por Certificado Nº 008001.

Que a fojas 126 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley Nº 16.463, y Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición Nº 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos Nº 1490/92 y por el Decreto Nº 101 de fecha 16 de diciembre del 2015.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T

DISPOSICIÓN N°

7 0 8 4

ARTÍCULO 1º.- Autorízase a la firma BIOMERIEUX ARGENTINA S.A. la modificación del nombre y condición de conservación del producto para Diagnóstico de uso "In Vitro" denominado CMV R-GENE® QUANTIFICATION que en lo sucesivo se denominará CMV R-gene® REAL TIME DETECTION AND QUANTIFICATION KIT con una vida útil de VEINTICUATRO (24) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre -31 y -15 °C .

ARTÍCULO 2º.- Acéptense los nuevos proyectos de Rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 14 a 97 y 118 a 120. Desglosándose fojas 70 a 97 y 120.

ARTICULO 3º.- Practíquese la atestación correspondiente en el Certificado N° 008001, cuando el mismo se presente acompañado de la fotocopia autenticada de la presente Disposición.

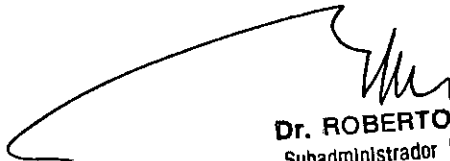
ARTÍCULO 4º.- Regístrese; gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con los nuevos proyectos de Rótulos y Manual de Instrucciones. Cumplido, archívese.-

Expediente n°: 1-47-3110-526/16-0

DISPOSICIÓN N°:

Fd

7 0 8 4



Dr. ROBERTO LEIDE
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.


ARGENE

CMV R-gene [®]

CE 0459 **IVD**

Trousse de détection et de quantification en Temps Réel / Real time Detection and Quantification kit / Kit für den Real-time Nachweis und die Quantifizierung / Equipo de detección y cuantificación a Tiempo Real / Kit di rilevazione e di quantificazione in Real Time / Dispositivo de deteção e quantificação em Tempo Real / Kit för detektion och kvantifiering i realtid / Real time-detekterings-og kvantificeringskit / Sanntidspåvisnings-og kvantifiseringssett / Zestaw do pomiaru ilościowego i wykrywania w czasie rzeczywistym / Souprava pro real time detekci a kvantifikaci / Kit de detectie in timp real si cuantificare

REF 69-003B  90


 2015-12-31

LOT 0123456789

W0 2 x 1.8 mL
IC2 1 x 1 mL
R0 1 x 300 µL
QS1 1 x 300 µL
QS2 1 x 300 µL

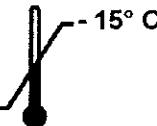
0123456789
0123456789
0123456789
0123456789
0123456789

QS3 1 x 300 µL 0123456789
QS4 1 x 300 µL 0123456789
SC 1 x 300 µL 0123456789
R5 3 x 450 µL 0123456789

 bioMérieux SA
376, Chemin de l'Orme
69280 - Marcy l'Etoile - France



- 31° C



- 15° C



20841E

www.biomerieux.com/techlib



(01)03573026387662(17)151231(10)0123456789

Lote:
Vencimiento:
Establecimiento Importador:
bioMérieux Argentina S.A. Arias 3751 (1430) - Cap. Federal
Directora Técnica: Rosana Labat - MN 8311
Autorizado por MSN- Certificado:8001

Dra. Rosana Labat
Directora Técnica
bioMérieux Argentina S.A.

20910C

7084
01 JUL. 2016



CMV R-gene®

REF 69-003

REF 69-003B

708 C



COMPOSICIÓN

REF 69-003	Kit de extracción de ADN, DNA EXTRACTION KIT	Ref. 67-000
	Kit de detección y cuantificación en tiempo real, CMV R-gene®	Ref. 69-003B

1.	Interés del test	2
2.	Presentación del kit.....	2
3.	Principio del test.....	3
4.	Composición del kit y condiciones de conservación	4
5.	Materiales y reactivos necesarios	4
6.	Reconstitución de los reactivos	5
7.	Peligros y normas de seguridad.....	5
8.	Gama de estándares y controles.....	7
9.	Obtención, transporte y preparación de las muestras.....	8
10.	Protocolo de extracción de muestras	8
11.	Protocolo de detección y de cuantificación en tiempo real.....	10
12.	Análisis de los resultados.....	12
13.	Validación e interpretación de los resultados	13
14.	Guía de Problemas / Soluciones	16
15.	Eficiencia.....	17
16.	Informe de prueba en paneles	24
17.	Bibliografía.....	25
18.	Productos anexos	26
19.	Tabla de símbolos.....	27
20.	Historial de revisión.....	28

E

Dra. Rosana Labat
 Directora Técnica
 bioMérieux Argentina S.A.

1. Interés del test

El kit CMV R-gene[®] permite detectar y medir la carga viral del CMV en muestras de sangre total, plasma, suero, líquidos cefalorraquídeos (LCR), líquido de lavado broncoalveolar (LBA), orina, biopsias y líquido amniótico conforme a un protocolo específico.

El citomegalovirus humano (HCMV) es un virus de la familia del *Herpesvirus* envuelto en ADN bicatenario. Cuanto peores sean las condiciones socioeconómicas, mayor es su grado de difusión (50 a 100%). Tras la primoinfección, el HCMV permanece en estado latente en el huésped y puede ser responsable de infecciones secundarias recurrentes durante la inmunosupresión crónica o transitoria por reactivación del genoma endógeno por reinfección por una nueva cepa.

Las consecuencias de la infección por HCMV dependen esencialmente de la inmunidad celular del sujeto afectado. En la mayoría de los casos, de forma asintomática en individuos sanos, puede conducir a afecciones graves en pacientes inmunodeprimidos y a los fetos o recién nacidos tras la transmisión *in utero*.

La infección por HCMV tras trasplante alogénico de órgano o de médula: el HCMV es el principal agente infeccioso tras el trasplante alogénico de médula ósea y órgano. La infección por HCMV se observa, como media en dos tercios de los receptores, independientemente del tipo de trasplante. Se produce en ausencia de tratamiento profiláctico entre el primer y el cuarto mes tras el trasplante. Es sintomática dos de cada tres veces en caso de primoinfección, en el 40% de los casos de reinfección y en menos del 20% de las reactivaciones. Una fiebre prolongada puede ser la única manifestación clínica de la infección o puede complicarse con una trombocitopenia o leucopenia, una hepatitis citolítica, afecciones digestivas o cistitis. La coriorretinitis es rara. La neumopatía intersticial es una de las principales complicaciones del trasplante de médula: se produce en aproximadamente el 20% de los receptores y su evolución, sin tratamiento, es peligrosa (90% de mortalidad). La infección por HCMV es, además, un factor desencadenante o acelerador del rechazo o de la GVH (reacción del trasplante contra el huésped). Asimismo, agrava la inmunodepresión y favorece las sobreinfecciones.

La infección por HCMV durante el SIDA: la incidencia de las infecciones por HCMV ha disminuido en un 80% desde la instauración de tratamientos antirretrovirales altamente efectivos que permiten una restauración inmunitaria al menos parcial. Se producen manifestaciones clínicas en una fase de inmunodepresión importante, caracterizada por un número mediano de linfocitos T CD4+ inferior a 50/mm³. La retinitis, observada antes del periodo de las triterapias en aproximadamente un 15 y 35% de los pacientes, sigue siendo la manifestación clínica más habitual, seguidas de las úlceras pépticas. Se han descrito muchos tipos de afecciones neurológicas, pero su incidencia aún no se ha determinado. La neumopatía es excepcional.

Las técnicas usadas en el diagnóstico de la infección activa por HCMV incluyen: el cultivo celular con investigación de efecto citopatógeno (6 semanas, método de referencia), el cultivo rápido con detección por inmunocitoquímica mediante anticuerpos monoclonales del tipo anti-IEA (24 a 48 h), la antigenemia leucocitaria ppUL83 (2 a 3 h). Estos métodos implican una infección activa, ya que existe producción de antígenos virales.

La infección por HCMV durante el embarazo: durante el embarazo, la aparición de una primoinfección materna conlleva complicaciones en un 50% de los casos de infección fetal, siendo esta grave en un 10% de los casos, lo que deriva en una discapacidad neurológica en particular.

El kit CMV R-gene[®] aporta una ayuda rápida al diagnóstico y al seguimiento de las infecciones por citomegalovirus al acercar los valores obtenidos a aquellos de los métodos de diagnóstico actuales. Su objetivo es permitir a los médicos el uso de sus reflejos terapéuticos elaborados mediante métodos de diagnóstico (cultivo celular, antigenemia) usados hasta ahora en el contexto clínico de cada paciente.

El kit CMV R-gene[®] permite la detección rápida y la medición de la carga viral de CMV por medio de un estándar de cuantificación, un control de extracción, un control de inhibición y los controles positivos y negativos facilitados en el kit. Los resultados obtenidos se expresan en números de copias/mL de muestra.

La medición de la carga viral permite controlar la evolución de infecciones virales crónicas y decidir rápidamente si hay que comenzar un tratamiento adaptado o evaluar su eficacia.

Los tipos de pacientes afectados son los receptores de trasplantes de órganos o médula ósea, los afectados por el SIDA y los inmunodeprimidos en general. La elevada sensibilidad y precisión de este kit también permite su uso para la detección de CMV en receptores de aloinjertos de médula ósea.

Los valores predictivos positivos y negativos (probabilidad de que se produzca o no una enfermedad por CMV tras una prueba positiva o negativa) se determinarán por el usuario en el contexto de las estrategias profilácticas y terapéuticas usadas para establecer los valores umbral para la cuantificación viral, ya que no existe consenso respecto a estos valores: dependen en buena medida del kit de cuantificación usado, la estrategia terapéutica del sitio, el tipo de paciente (trasplante de médula, de órgano, infección por VIH) y el estado inmune del paciente.

Este kit no puede usarse para localizar donantes.

Combinados con otros métodos de investigación biológicos (diagnóstico por medio de imágenes, análisis bioquímico e inmunológico, etc.), los resultados obtenidos con el kit CMV R-gene[®] permiten diagnosticar primoinfecciones o reactivaciones virales, controlar su desarrollo y, por tanto, mejorar la eficacia del tratamiento.

2. Presentación del kit

El CMV es un Herpesvirus responsable de un amplio espectro de patologías humanas. El episodio de primoinfección ocurre normalmente en la primera infancia. La diseminación del virus en la sangre puede provocar manifestaciones clínicas que, cuando existen, son poco frecuentes y benignas. Desde ese momento, el virus permanece en estado latente en el huésped y se puede reactivar durante una inmunodepresión. La gravedad de las enfermedades derivadas se determina principalmente por el estado inmunológico del paciente. Los huéspedes más susceptibles son los pacientes de SIDA y los que han recibido trasplantes alogénicos de médula ósea o de órganos.

El CMV se relaciona con enfermedades neurológicas, neumopatías, así como con el empeoramiento de la inmunosupresión de los pacientes.

El kit CMV R-gene[®] se usa para detectar y medir la carga viral de CMV por medio de la amplificación en tiempo real tras la extracción del ADN viral. Este kit es apto para cualquier laboratorio dado que es muy fácil de usar y es muy completo.

El kit CMV R-gene[®] permite cuantificar el genoma del virus CMV en sangre total, plasma, suero, líquidos cefalorraquídeos (LCR), líquidos de lavado broncoalveolar (LBA), orina, biopsias y líquido amniótico siempre que haya un protocolo específico de dos fases para este último. De hecho, se suelen encontrar altas cargas virales en el líquido amniótico cuando da positivo en CMV. Este tipo de concentraciones nos ha empujado a definir una estrategia específica de dos fases para este tipo de muestras con el fin de permitir una interpretación completa de los resultados. De este modo, una misma muestra de líquido amniótico debe probarse por duplicado: un tubo que contenga la muestra sin diluir y

otro tubo con la muestra diluida 1/100. Tras la realización de esta prueba, se podrá dar una respuesta positiva o negativa. Si la amplificación de la muestra no queda inhibida, podrá darse también una respuesta cuantitativa. En cambio, si la muestra da positivo y se inhibe, el ADN extraído de la muestra debe volverse a probar con una dilución mayor conforme a los primeros resultados.

Se han validado varios tipos de muestras y dispositivos de purificación automáticos y manuales con el kit. El ADN extraído puede amplificarse por PCR en tiempo real en las plataformas disponibles habitualmente.

El primer estándar internacional para CMV de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya está disponible. Su objetivo es servir como material de referencia para la calibración y la cuantificación de cargas virales de CMV. Los resultados obtenidos estarán, por consiguiente, estandarizados independientemente del tipo de muestras y combinaciones de plataformas de extracción y amplificación que se usen. La utilización de este estándar internacional implica que la carga viral de un paciente determinada por medio de dos técnicas distintas se pueda comparar de un laboratorio a otro.

Los resultados obtenidos mediante el kit CMV R-gene[®], expresados en cp/mL al utilizar el software PCR en tiempo real, pueden ser convertidos a la unidad internacional aplicando el factor de conversión que se describe en la sección "Validación e interpretación de los resultados" de la presente ficha técnica.

Gracias al programa de amplificación general de la gama completa de productos R-gene[®], el análisis de la muestra puede efectuarse al mismo tiempo para otros virus: HSV-1, HSV-2, VZV con el kit HSV1 HSV2 VZV R-gene[®] (ref.: 69-004B), CMV, HHV6, HHV7 y HHV8 con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene[®] (ref.: 69-100B), EBV con el kit EBV R-gene[®] (ref.: 69-002B), Adenovirus con el kit Adenovirus R-gene[®] (ref.: 69-010B), BKV con el kit BK Virus R-gene[®] (ref.: 69-013B) y Parvovirus B19 con el kit Parvovirus B19 R-gene[®] (ref.: 69-019B).

Los resultados se validan por medio de diferentes controles facilitados con el kit, entre los que se incluye un control de extracción.

3. Principio del test

3.1 TIPO DE MUESTRA

El kit CMV R-gene[®] permite detectar y medir la carga viral del CMV en muestras de sangre total, plasma, suero, líquidos cefalorraquídeos (LCR), líquido de lavado broncoalveolar (LBA), orina, biopsias y líquido amniótico conforme a un protocolo específico. La carga viral se mide gracias a un estándar de cuantificación incluido en el kit.

El estándar de cuantificación para CMV es lineal de 500 copias/mL a 10⁷ copias/mL, es decir: de 10 copias/PCR a 200 000 copias/PCR. Los resultados se expresan en números de copias/mL de muestra. Los resultados se validan con controles de extracción, inhibición, y controles positivos y negativos que se suministran con el kit CMV R-gene[®].

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Los siguientes métodos de extracción de ADN han sido probados y validados con el kit CMV R-gene[®] (ref.: 69-003B):

- MagNA Pure Compact Instrument
- MagNA Pure LC Instrument
- MagNA Pure 96 Instrument
- NucliSENS[®] easyMAG[®]
- QIAasymphony SP
- QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit
- DNA Extraction kit (suministrado con la referencia 67-000 de ref. 69-003)
- QIAcube
- m2000sp
- Versant kPCR Molecular System SP

El ADN diana presente en la muestra y en el control de extracción + inhibición (IC2) se extrae utilizando uno de los métodos de extracción validados citados anteriormente.

La técnica usada por el DNA EXTRACTION KIT (Ref.: 67-000) asocia las propiedades selectivas de unión de los geles de sílice con la velocidad de microcentrifugación. En un primer paso, la muestra y el control de extracción + inhibición (IC2) se lisan en presencia de una proteasa, en un tampón elegido para optimizar la capacidad de unión del ADN a la membrana. La utilización de las columnas de sílice permite, tras la unión del ADN, lavar eficazmente la muestra para eliminar los agentes contaminantes. Tras la elución, el ADN está preparado para su uso directo en las técnicas de amplificación.

3.3 AMPLIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL

La amplificación se realiza mediante el uso de la tecnología de la nucleasa 5' (patentes n.º 5210015, 5487972) también llamada sondas TaqMan o de hidrólisis. La mezcla de amplificación está lista para su uso y contiene dNTP, tampón de amplificación, polimerasa Taq y la sonda de CMV además de cebadores específicos y sondas para el control interno (IC2) que deben someterse a todo el procedimiento de extracción (incluyendo la lisis).

Los siguientes instrumentos de amplificación se han probado y validado con el kit CMV R-gene[®] (ref.: 69-003B):

- LightCycler 1.0, 2.0 y 480 (System II).
- Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, 7500 Fast Dx, 7300, ViiA[™] 7 Real-Time PCR System (bloques para placas de 96 pocillos y placas Fast 96), StepOne
- Rotor-Gene
- Mx3005P, (Stratagene y Agilent) y Versant kPCR Molecular System AD
- Dx Real-Time System y CFX 96 Real-Time System

Las muestras extraídas se amplifican y detectan al mismo tiempo.

El CMV se detecta cualitativa y cuantitativamente.

El gen amplificado para CMV corresponde al gen codificante para la proteína ppUL83. Tamaño del fragmento amplificado: 283 pares de bases.

Estándar de 4 puntos (QS1, QS2, QS3, QS4) que comprende entre 5000 y 5 copias/μL de ADN estándar que incluye entre 50 000 y 50 copias de cada plásmido por PCR, utilizado para generar una curva estándar a partir de la cual se cuantifican las muestras analizadas.

Eduardo Peluffo

El punto QS3 contiene 50 copias/μL de ADN estándar correspondiente a 500 copias de cada plásmido por amplificación. QS3 permite medir carga viral de CMV por medio de una curva estándar externa que se haya creado previamente con los 4 puntos y se haya validado y registrado como la curva estándar externa. De esta forma, no es necesario crear 4 puntos cada vez que se lleve a cabo un experimento nuevo (siempre que se satisfagan las condiciones descritas en la sección "Estándar de cuantificación QS3"). También sirve de control positivo para la detección cualitativa del CMV.

SC es un control de sensibilidad que contiene 1 plásmido específico de CMV con una concentración de 10 copias por PCR. El SC (control de sensibilidad) se usa para validar los resultados de un ensayo a lo largo del tiempo.

Además, se incluye un control de extracción + inhibición (IC2) en el kit CMV R-gene®, ref.: 69-003B). Se utiliza para verificar, empezando por la fase de lisis, que cada muestra se extrae correctamente y no contiene inhibidores.

ATENCIÓN: Las características descritas han sido validadas y están garantizadas si el kit se utiliza con las técnicas de extracción y los instrumentos de amplificación recomendados en la ficha técnica. Para seguir la evolución de la carga viral de un paciente (expresada en copias/mL) prueba tras prueba es necesario que los análisis sucesivos de las muestras se realicen siguiendo el mismo protocolo y con las mismas combinaciones de instrumentos de extracción/amplificación.

4. Composición del kit y condiciones de conservación

Ficha técnica: 1 ficha técnica facilitada en el kit o descargable desde www.biomerieux.com/techlib

4.1 DNA EXTRACTION KIT 67-000

• Número de extracciones: 50	
A Minicolumna QIAamp®	5 x 10
B Tubos de recogida (2 mL)	2 x 50
C Tampón AL	12 mL
D** Tampón AW1 (concentrado)	19 mL
E Tampón AW2 (concentrado)	13 mL
F Tampón AE	12 mL
G*** Proteasa QIAGEN	24 mg
H Diluyente de la proteasa	1,2 mL

*, **y ***: Consulte "Peligros y normas de seguridad".

- Este kit puede conservarse antes y después de su apertura en un lugar seco a una temperatura de +2 °C/+8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase, salvo la proteasa QIAGEN que se mantiene estable durante 6 meses a temperatura ambiente cuando esté liofilizada. Después de la reconstitución, debe conservarse en alcuotas a -15 °C/-31 °C para evitar su posterior congelación y descongelación.

4.2 KIT DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN CMV R-GENE® 69-003B

• Número de pruebas: 90	
W0 Agua para la extracción (grado de PCR)	2x1,8 mL
IC2 Control interno 2	1x 1 mL
R0 H ₂ O (grado de PCR)	1x 300μL
QS1 Estándar de cuantificación 1 CMV (5000 copias / μL)	1x 300μL
QS2 Estándar de cuantificación 2 CMV (500 copias / μL)	1x 300μL
QS3 Estándar de cuantificación 3 CMV (50 copias / μL)	1x 300μL
QS4 Estándar de cuantificación 4 CMV (5 copias / μL)	1x 300μL
SC Control de sensibilidad CMV (1 copia / μL)	1x 300μL
R5 Premezcla de amplificación CMV y IC2	3x 450μL

- Al recibirlo, el kit (ref. 69-003B) debe conservarse, tanto antes como después de la primera apertura, a -15 °C/-31 °C, y fuera del alcance de la luz hasta la fecha de caducidad.
- Antes y después de abrir por primera vez el kit (ref. 69-003B), los estándares de cuantificación (QS1, QS2, QS3, QS4), el control de sensibilidad (SC), el control interno 2 (IC2) y el reactivo (W0) deben permanecer a -15 °C/-31 °C en la sala de extracción. La premezcla de amplificación (R5) y el reactivo (R0) deben conservarse a -15 °C/-31 °C en la sala de preparación de premezcla.
- Cada premezcla puede pasar solo por un máximo de 7 ciclos de congelación/descongelación.
- Restablezca las premezclas de amplificación (R5), los estándares de cuantificación (QS) y el control de sensibilidad (SC) a -15 °C/-31 °C inmediatamente después de su uso.

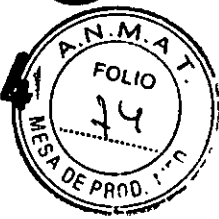
5. Materiales y reactivos necesarios

5.1 PARA LA EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

5.1.1 Con el kit de extracción "DNA/RNA Extraction Kit" (ref. 67-000):

- Etanol 96-100%.
- Centrífuga de mesa (6000 g – 12 000 g).
- Vórtex.
- Tubos de polipropileno para microcentrifugación (1,5 mL, 2 mL).
- Baño María +56 °C.
- Micropipetas y puntas con filtro.
- Guantes desechables.

Eduardo Peluffo
 bioMérieux Argentina S.A.
 APODERADO
 DNI 23.167.514



5.1.2 Con otros métodos de extracción validados:

- Siga las instrucciones del fabricante.

5.2 PARA EL KIT DE DETECCIÓN CUANTITATIVA/CUALITATIVA 69-003B

- Micropipeta (P20) y puntas con filtro estériles de 20 µl.
- Termocicladores validados con el kit CMV R-gene®.
- Centrífuga de carrusel LC para LightCycler 1.0, 2.0, o bien microcentrífuga de mesa (7000 g) o centrífuga de placa.
- Guantes desechables.
- Capilares, tubos o placas apropiados para cada instrumento de amplificación en tiempo real validado con el kit CMV R-gene®.
- Bloque frío apropiado para cada instrumento de amplificación en tiempo real validado con el kit CMV R-gene®.
- Lámpara UV.
- Estación de trabajo o pantalla de plexiglás para la distribución de muestras y premezclas.
- Kit para crear archivos de compensación de color: Colour Compensation r-gene® (ref.: 71-103) para la interpretación de los resultados obtenidos con LightCycler 2.0.

6. Reconstitución de los reactivos

Este paso se aplica a los reactivos suministrados con el DNA EXTRACTION KIT (ref.: 67-000).

6.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE PROTEASA

- Agregue 1,2 mL de diluyente de la proteasa (H) a los 24 mg de la proteasa liofilizada (G).
- Consérvela en alícuotas a -15 °C/-31 °C (evite la congelación y descongelación repetidas).

6.2 PREPARACIÓN DEL TAMPÓN AL (C)

- Consérvelo a +2 °C/+8 °C.
- Mezcle bien el tampón AL (C) antes de su uso.
- No almacene la proteasa mezclada con el tampón AL (C).
- Para disolver cualquier precipitado que aparezca en el tampón AL (C), caliéntelo a +70 °C.

6.3 PREPARACIÓN DEL TAMPÓN AW1 (D)

- Consérvelo a +2 °C/+8 °C.
- El tampón AW1 (D) se suministra como concentrado. Antes de utilizarlo por primera vez, añada 25 mL de etanol (96-100%) a 19 mL de tampón concentrado.

6.4 PREPARACIÓN DEL TAMPÓN AW2 (E)

- Consérvelo a +2 °C/+8 °C.
- El tampón AW2 (E) se suministra como concentrado. Antes de utilizarlo por primera vez, añada 30 mL de etanol (96-100%) a 13 mL de tampón concentrado.

7. Peligros y normas de seguridad

- Este kit está diseñado exclusivamente para uso *in vitro*. El kit debe ser manejado por personal cualificado de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y las instrucciones de manejo para biología molecular.
- Lea todas las instrucciones antes de proceder a su manipulación.

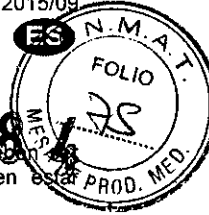
7.1 Peligros generales y normas de seguridad

- Lleve un equipo de protección, es decir: guantes desechables, bata, gafas de protección mascarilla.
- Evite cualquier contacto entre los reactivos y la piel. Si esto ocurre, lávese inmediatamente con abundante agua.
- Las muestras se deben preparar en un espacio de seguridad biológica.
- No pipetee nunca con la boca.
- No fume, coma ni beba en zonas que sean solamente de trabajo.
- El tampón AW2 y el disolvente de la proteasa contienen azida de sodio que puede reaccionar con tuberías de plomo o cobre para formar azidas de metal explosivas. Si se desecha cualquier líquido que contenga azida de sodio por el sistema de tuberías, deberá dejarse correr agua por el desagüe para evitar que se acumule.
- Los reactivos sin usar deberán tratarse como residuos químicos peligrosos y desecharse como corresponde. Deseche los reactivos usados, así como cualquier otro material desechable contaminado, siguiendo los procedimientos para productos infecciosos o potencialmente infecciosos.

Es responsabilidad de cada laboratorio manipular los residuos y efluentes producidos según su naturaleza y grado de peligrosidad, así como tratarlos y desecharlos (o encargar que sean tratados o desechados) de acuerdo con las normativas aplicables.

7.2 Peligros y normas de seguridad para biología molecular

- Para los procedimientos de amplificación, se necesitan técnicas muy desarrolladas con las que evitar el riesgo de contaminación de las muestras:
 - Las fases de preparación de reactivos, preparación de muestras y amplificación deberán desarrollarse en zonas de trabajo separadas. Los movimientos en el laboratorio deben ir en una dirección solamente: del área de preparación de reactivos al área de amplificación. Asigne un juego de batas de laboratorio y pipetas a cada área. No introduzca nunca un producto amplificado en las áreas de preparación de reactivos o muestras.



- Las pipetas empleadas para manejar las muestras se deben reservar para este fin solamente. Estas pipetas deben ser pipetas de desplazamiento positivo o bien pipetas equipadas con puntas con filtro. Todas las puntas deben estar esterilizadas.
- Las pipetas empleadas para preparar y distribuir los reactivos se deben reservar también para este fin solamente. Los reactivos requeridos para la amplificación deberían alicuotarse para que se usen en un único experimento.
- Los tubos con distintas muestras y distintas premezclas de amplificación no se deben abrir nunca a la vez.
- Las muestras usadas se deben reservar exclusivamente para este análisis.
- No use reactivos una vez caducados.
- No mezcle los reactivos de diferentes lotes o kits de otros fabricantes.
- Los reactivos deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de proceder a la prueba.
- Se recomienda usar un bloque de metal frío (+2 °C/+8 °C) para manipular los reactivos y las muestras.
- Efectúe siempre las tareas de mantenimiento preventivo en las estaciones de trabajo, los instrumentos para la extracción automatizada, las plataformas de amplificación y los sistemas de centrifugación respetando las recomendaciones del fabricante.

7.3 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS ESPECÍFICAS SOBRE DETERMINADOS REACTIVOS

- Tampón AL (C) y tampón AW1 (D) en kit 67-000

Este componente no debe utilizarse con agentes desinfectantes que contengan lejía.

- Tampón AL (C)

Palabra de advertencia : **ATENCIÓN**



Indicación de peligro

H315 : Provoca irritación cutánea.
 H317 : Puede provocar una reacción alérgica en la piel
 H319 : Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia

P280 : Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección
 P305 + P351 + P338 : EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 P302 + P352 : EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

- Tampón AW1 (D)

Palabra de advertencia : **ATENCIÓN**



Indicación de peligro

H302/H332 : Nocivo por inhalación y por ingestión.
 H315 : Provoca irritación cutánea.
 H319 : Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia

P280 : Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección
 P305 + P351 + P338 : EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 P302 + P352 : EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

- Protease (G)

Palabra de advertencia : **PELIGRO**



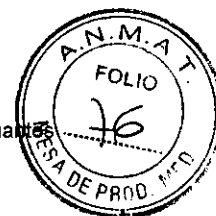
Indicación de peligro

H315 : Provoca irritación cutánea.
 H334 : Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

Consejo de prudencia

P261 : Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
 P305 + P351 + P338 : EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

70841



P342 + P311 : En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

Evite cualquier contacto entre los diferentes reactivos y la piel. En caso de contacto, lavar abundantemente con agua. Llevar guantes durante la manipulación.

Para más información, consulte la ficha de seguridad.

8. Gama de estándares y controles

530 nm = corresponde al canal de lectura "FAM" o "Green" u otros que dependan de plataformas de PCR en tiempo real. Con el fin de simplificar las instrucciones, se utiliza únicamente el término "530 nm".

560 nm = corresponde al canal de lectura "VIC", "HEX" u otro conforme a las plataformas de PCR en tiempo real. Con el fin de simplificar las instrucciones, se utiliza únicamente el término "560 nm".

CT = Crossing Threshold para la mayoría de las plataformas de PCR en tiempo real o CP (Crossing Point) para la gama de instrumentos LightCycler. Para simplificar las instrucciones, solo se utiliza el término "CT".

ATENCIÓN: Respete el orden con el que se añaden las muestras y los controles. (Véase la sección "Preparación de la amplificación").

8.1 ESTÁNDARES DE CUANTIFICACIÓN INTERNOS (QS1, QS2, QS3, QS4)

- Es necesario el uso de la gama de estándares de cuantificación internos para la cuantificación de muestras.
- Los estándares de cuantificación se usan para generar una curva estándar a partir de la cual se calcula la carga viral de CMV.
- Cada punto de la gama de estándares incluye un plásmido específico de CMV.
- Los estándares de cuantificación incluyen desde 5000 copias/μL (QS1) hasta 5 copias. μL (QS4).
- Los estándares de cuantificación deben designarse como "estándar" y sus valores deben introducirse cuando las muestras se registran en el software de análisis de datos.
- La señal QS se detecta a 530 nm.

8.2 ESTÁNDAR DE CUANTIFICACIÓN (QS3)

- El estándar de cuantificación QS3 permite importar una curva estándar creada en el primer experimento.
- La importación de la curva estándar por medio del QS3 solo es posible si se usan kits CMV R-gene® con el mismo número de lote. El periodo que transcurra entre el experimento que define la curva estándar con los cuatro estándares de cuantificación y el experimento en el que se use la curva estándar importada no debe superar los 3 meses.
- Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, 7500 Fast Dx, 7300 y StepOne, Dx Real-Time system, CFX 96 Real-Time System, Mx3005P y Versant kPCR Molecular System AD no permiten importar la curva estándar.

Nota: en caso de tratarse de una detección cualitativa únicamente, QS3 sirve como control positivo para verificar el correcto desarrollo de la fase de amplificación.

8.3 CONTROL DE SENSIBILIDAD (SC)

- El control de sensibilidad (SC) permite validar los resultados del ensayo a lo largo del tiempo.
- El control de sensibilidad (SC) se amplifica con la premezcla de amplificación R5
- Probado de manera sistemática, el control de sensibilidad (SC) equivale a una muestra ligeramente positiva. Por ello, ocasionalmente podría dar un resultado negativo.
- Su señal se detecta a 530 nm.

8.4 CONTROLES DE EXTRACCIÓN + INHIBICIÓN

8.4.1 Control de extracción + inhibición de muestras (IC2sample)

- Este control consiste en un control interno (IC2) que se agrega a las muestras de los pacientes, se extrae y amplifica para verificar la eficacia de la extracción y detectar la presencia de posibles inhibidores.
- Su señal se detecta a 560 nm.

8.4.2 Control de extracción + inhibición de muestras (IC2W0)

- Este control consiste en un control interno (IC2) que se agrega al control de extracción negativo (W0), se extrae y amplifica al mismo tiempo que las muestras de pacientes para obtener una referencia (IC2W0). Debe compararse con los resultados del control de extracción + inhibición de las muestras de pacientes (IC2sample).
- Su señal se detecta a 560 nm.

⇒ La comparación de los valores CT (Crossing Threshold) para los controles IC2W0 y IC2sample con 560 nm evalúa la eficacia de la extracción y detecta la presencia de posibles inhibidores.

8.5 CONTROLES NEGATIVOS

8.5.1 Control negativo de extracción + amplificación (IC2W0)

- Se trata exactamente del mismo tubo que el descrito en la sección "Control de extracción + inhibición de referencia". Sin embargo, cuando se analiza a 530 nm, este control hace patente la ausencia de contaminación durante la extracción y amplificación.
- Su señal se detecta a 530 nm.

8.5.2 Control negativo de amplificación (R0)

- El control negativo de amplificación consiste en amplificar el reactivo (R0) en la premezcla de amplificación (R5).
- Este control hace patente la ausencia de contaminación durante la amplificación.

⇒ El uso de este control es opcional. Los valores CT (Crossing Threshold) de estos dos controles (R0 e IC2W0) a 530 nm se pueden comparar para identificar la etapa del experimento en la que ha podido ocurrir una posible contaminación.

8.6 ESTÁNDAR INTERNACIONAL HCMV DE LA OMS (no se incluye):

Eduardo Peluffo
bioMérieux Argentina SA
APODERADO
DNI 28.167.514

- El comité experto de la OMS ha establecido referencias para el uso de sustancias biológicas para la prevención, tratamiento y diagnóstico de enfermedades humanas. Los estándares internacionales de la OMS se consideran la referencia en este campo y constituyen la unidad internacional (UI).
- Los resultados obtenidos mediante el kit CMV R-gene®, expresados en cp/mL al utilizar el software PCR en tiempo real, pueden ser convertidos a la unidad internacional aplicando el factor de conversión que se describe en la sección "Validación e interpretación de los resultados" de la presente ficha técnica. El factor de conversión considera el tipo de muestra y la combinación de plataformas de extracción/amplificación usadas.

9. Obtención, transporte y preparación de las muestras

Las muestras deben recogerse siguiendo las instrucciones del laboratorio.

9.1 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

- Las muestras deben transportarse según las normativas locales aplicables sobre el transporte de materiales potencialmente infecciosos.
- Las muestras deben ser transportadas y tratadas por el laboratorio en el menor tiempo posible (preferiblemente, en 24 horas).

9.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

9.2.1. Muestras de sangre

ATENCIÓN: Los tubos que contienen heparina no son apropiados para el análisis por amplificación genética. Los tubos de obtención de muestras sanguíneas contienen citrato que puede provocar problemas de pérdida de señal durante la detección de los productos amplificados.

- La sangre se recoge en tubos con EDTA.
- Antes de proceder a la extracción de muestras de sangre, es necesario homogeneizarlas por inversión de los tubos de forma manual o con un agitador automático durante 10 minutos.
- Alicuote la muestra en un espacio de seguridad biológica.
- El tiempo entre la recogida de sangre y la llegada al laboratorio no debe superar las 24 horas.
- Las muestras de sangre deben transportarse al laboratorio a temperatura ambiente (+18 °C/+25 °C).

9.2.2. Muestras de plasma

- La sangre se recoge en un tubo seco o en un tubo con EDTA.
- Centrifugue los tubos a 1200 g durante 10 minutos a 20 °C. Decante un máximo de 2 mL (mínimo 200 µL) de plasma en criotubos en un espacio de seguridad biológica.
- El plasma debe transportarse al laboratorio preferentemente a temperatura ambiente (+18 °C/+25 °C) o a +2 °C/+8 °C. El plasma que no se trate a la llegada al laboratorio puede conservarse a +2 °C/+8 °C durante una semana como máximo. Si se requiere un almacenamiento prolongado, congele el plasma a -15 °C/-31 °C.
- Si las muestras de plasma congelado se envían al laboratorio en hielo seco, deben almacenarse posteriormente a -15 °C/-31 °C o bien a -78 °C/-82 °C preferiblemente.

9.2.3. Muestras de LCR

- El LCR se obtiene siguiendo las condiciones habituales de punciones lumbares.
- Si las muestras de LCR congelado se envían al laboratorio en hielo seco, deben almacenarse posteriormente a -15 °C/-31 °C o bien a -78 °C/-82 °C preferiblemente.

9.2.4 Muestras de orina

- Las muestras de orina se recogen en un bote esterilizado.
- Las muestras de orina deben transportarse al laboratorio a temperatura ambiente (+18 °C/+25 °C) o a +2 °C/+8 °C.
- Si la orina no se procesa nada más llegar al laboratorio, se debe conservar a +2 °C/+8 °C durante una semana como máximo. Si se requiere un almacenamiento prolongado, congele la orina a -15 °C/-31 °C.

10. Protocolo de extracción de muestras

ATENCIÓN: Antes de comenzar el procedimiento de extracción, asegúrese de que las muestras descongeladas y los reactivos IC2 y W0 se han mezclado correctamente. Las muestras de líquido amniótico deben extraerse por duplicado: una extracción a partir de una muestra sin diluir y otra extracción de una muestra diluida 1/100 en agua (grado de PCR). Cada uno de los 2 se consideran muestras en el protocolo de extracción and amplification.

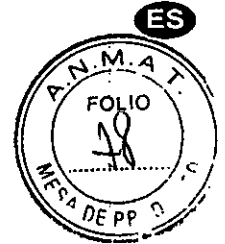
En la sala reservada para la extracción de muestras

10.1 Con DNA EXTRACTION KIT (ref.: 67-000 + IC2 + W0)

- Equilibre la temperatura de las muestras IC2 y W0 a +18 °C/+25 °C.
- Equilibre la temperatura del tampón AE (F) a +18 °C/+25 °C.
- Asegúrese de que el tampón AW1 (D), el tampón AW2 (E) y la solución concentrada de proteasa han sido reconstituidos de acuerdo con las instrucciones de la sección "Reconstitución de los reactivos".
- Para disolver cualquier precipitado que aparezca en el tampón AL (C), caliéntelo a +70 °C.
- Todos los pasos del centrifugado deberán desarrollarse a temperatura ambiente.

10.1.1 LISIS

- Prepare e identifique (en la tapa) el mismo número de tubos de 1,5 mL de microcentrifugación como muestras haya por analizar (2 tubos por cada muestra de líquido amniótico). Agregue un tubo para la extracción de la mezcla de W0+IC2.



- Caliente al baño maría a +56 °C.
- Pipeteo 200 µL de tampón AL (C) en cada tubo de microcentrifugación de 1,5 mL previamente identificados.
- Agregue 20 µL de proteasa.
- Agregue 10 µL de control interno (IC2).
- Agregue 200 µL de **W0 en el tubo identificado para la mezcla W0+IC2.**
- Agregue 200 µL de muestra **en los tubos identificados para las muestras.** Puede añadir PBS a la muestra si el volumen de la muestra es inferior 200 µL. En este caso, el resultado obtenido solo será cualitativo.
- Mezcle la muestra agitando durante 15 segundos. Para garantizar la eficacia de la lisis, es esencial que la muestra se mezcle bien hasta producir una solución homogénea.
- Incube a 56 °C durante 10 minutos.
- La lisis está completa tras 10 minutos de incubación. Una incubación más prolongada no afecta al rendimiento o a la calidad del ADN purificado. Los agentes potencialmente infecciosos pueden desactivarse al incubar las muestras a +95 °C durante 15 minutos tras la etapa de la lisis. No obstante, una incubación prolongada a esta temperatura puede degradar el ADN.
- Centrifugue brevemente los tubos para eliminar cualquier gota del interior de las tapas.

10.1.2 CARGA DE LA COLUMNA

- Agregue 200 µL de etanol de 96-100% a cada tubo y mezcle agitando durante 15 segundos.
- Centrifugue brevemente los tubos para eliminar cualquier gota del interior de las tapas.
- Aplique cuidadosamente la muestra obtenida a la columna QIAamp® en un tubo de 2 mL sin mojar el borde.
- Cierre cada columna para evitar la contaminación cruzada entre muestras y centrifugue a 6000 g durante 1 minuto. Si queda solución en la membrana, centrifugue de nuevo hasta que la columna quede vacía.
- Coloque cada columna en un tubo limpio de 2 mL (no incluido) y deshágase de los tubos que contienen filtrados.

10.1.3 LAVADO

- Abra con cuidado las columnas y agregue 500 µL de tampón AW1 (D). Cierre las columnas y centrifugue a 6000 g durante 1 minuto.
- Coloque cada columna en un tubo limpio de 2 mL y deshágase de los tubos que contienen filtrados.
- Abra con cuidado las columnas y agregue 500 µL de tampón AW2 (E).
- Cierre las columnas y centrifugue a máxima velocidad (12 000 g) durante 3 minutos.
- Coloque cada columna en un tubo limpio de 2 mL (no incluido) y deshágase de los tubos que contienen filtrados.
- Centrifugue durante 1 minuto a velocidad máxima. Este paso elimina cualquier residuo del tampón AW2 (E) en las columnas durante la deceleración de centrifugación o cuando las columnas se retiran del rotor.
- Coloque cada columna en un tubo limpio e identificado de 1,5 mL (no incluido) y deshágase de los tubos que contienen filtrados.

10.1.4 ELUCIÓN

- Abra las columnas con cuidado.

ATENCIÓN: Los volúmenes de elución varían dependiendo del tipo de muestra.

- Para muestras de sangre total y líquido amniótico, agregue **100 µL de tampón de elución AE (F)** a temperatura ambiente.
- Para muestras seroalbúmina, plasma o LCR, agregue **50 µL de tampón de elución AE (F)** a temperatura ambiente.
- Cierre las columnas e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugue a 6000 g durante 1 minuto.
- El ADN extraído se encuentra en el eluido.

El ADN extraído se conserva durante un año a -15 °C/-31 °C.

10.2 INSTRUMENTOS DE EXTRACCIÓN y/o KITS VALIDADOS CON CMV R-gene®

Estos instrumentos de extracción deben ser sometidos a mantenimiento periódico por parte de personal cualificado respetando las recomendaciones del fabricante.

Instrumentos	Kit	Muestra de la prueba	Tipo de muestra	Protocolo	Volumen de la elución
	QIAamp® DNA Blood Mini Kit	200 µL de muestra + 10 µL IC2	Sangre total, líquido amniótico		100 µL
			Plasma, LCR, suero		50 µL
QIAcube			Sangre total, líquido amniótico	Blood and body fluid spin protocol V3	100 µL
			Plasma, LCR, suero		50 µL
MagNA Pure Compact Instrumento	MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I		Sangre total	DNA_Blood_100_400	100 µL
			Plasma, LCR, suero		Total_NA_Plasma_100_400
MagNA Pure LC Instrumento	MagNA Pure DNA Isolation Kit I		Sangre total	DNA I Blood_Cell High Performance	100 µL
	MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit		Líquido amniótico	Total_NA_Serum_plasma_blood	100 µL
		Plasma, seroalbúmina	Total_NA_Variable_Elution_Volume	50 µL	



MagNA Pure 96 Instrumento	DNA and Viral NA Small Volume kit		Sangre total, orina, líquido amniótico, LCR, LBA	Viral NA Universal SV	
NucliSENS® easyMAG®	NucliSENS® Reactivos easyMAG®		Sangre total	Protocolo específico B del fabricante "Whole Blood Viral Extraction" con 140 µL de sílice ⁽¹⁾	50 µL
			Sangre total	Protocolo específico B del fabricante con 140 µL de sílice	50 µL
			Plasma, LCR, líquido amniótico ⁽²⁾ , seroalbúmina	Genérico/Específico B	50 µL
QIASymphony SP	Kit mini QIASymphony DSP DNA	Muestra 300 µL + 15 µL IC2 ⁽³⁾ (Extracción de 200 µL)	Sangre total	VirusBlood200_DSP	90 µL (eluido de 60 µL)
m2000sp	Sample Preparation System DNA	Muestra 800 µL + 10 µL IC2 ⁽⁴⁾ (300 µL de extracción)	Sangre total, plasma, LBA, orina, líquido amniótico, biopsias	DNA-Blood-LL-300-150 v081507	250 µL (eluido de 150 µL)
Versant kPCR Molecular System SP	Versant Sample Preparation 1.0	Muestra 400 µL + 10 µL IC2 ⁽⁵⁾ (Extracción de 250 µL)	Plasma	Sample Preparation Protocol 5	65 µL (eluido de 150 µL)

- ⁽¹⁾ Debe prepararse extemporáneamente una premezcla compuesta por IC2, tampón de lisis y sílice, y añadirse a las muestras previamente repartidas en los recipientes que contienen 2 mL de tampón de lisis. Para n muestras, mezcle 600 µL de tampón de lisis x (n+1) + 10 µL de IC2 x (n+1) + 140 µL de sílice x (n+1). Agregue 740 µL de la mezcla a cada muestra. Para una mayor precisión, véase el protocolo detallado "Worksheet easyMAG® Viral Whole Blood extraction protocol" de bioMérieux.
- ⁽²⁾ Para el líquido amniótico y en caso de extracción con el instrumento NucliSENS® easyMAG®, es necesario el tratamiento previo de las muestras con proteinasa K. En este caso, agregue 10 µL de proteinasa K a 20 mg/mL para 200 µL de muestra y déjela incubar durante 15 minutos a 56 °C.
- ⁽³⁾ Si se utiliza el sistema automático QIASymphony SP, es posible preparar de manera improvisada una premezcla que contenga el tampón IC2 y ATE (QIASymphony). Para 24 mezclas, mezcle 1 414 µL de tampón ATE + 266 µL de IC2.
- ⁽⁴⁾ Para extraer muestras de un volumen inicial superior a 800 µL, agregue las siguientes cantidades de reactivo IC2:
Para 1 volumen de muestra inicial, agregue 1/80 de la cantidad de reactivo IC2 (ejemplo: para extraer una muestra de 1 mL, agregue 12,5 µL de reactivo IC2).
- ⁽⁵⁾ Para extraer muestras de un volumen inicial superior a 400 µL, agregue las siguientes cantidades de reactivo IC2:
Para 1 volumen de muestra inicial, agregue 1/40 de la cantidad de reactivo IC2 (ejemplo: para extraer una muestra de 600 µL, agregue 15 µL de reactivo IC2).

1. Protocolo de detección y de cuantificación en tiempo real

Note: Con el fin de simplificar la ficha técnica, el instrumento de sujeción de la mezcla reactiva de amplificación se denomina "tubo".

ATENCIÓN: Para supervisar la carga viral de un paciente (expresada en copias/mL) prueba tras prueba, es obligatorio que el análisis sucesivo de muestras se efectúe usando exactamente el mismo protocolo y las mismas combinaciones de instrumentos de extracción/amplificación. Las muestras de líquido amniótico deben extraerse por duplicado: una extracción a partir de una muestra sin diluir y otra extracción de una muestra diluida 1/100 en agua (grado de PCR). (Véase la sección "Presentación del kit").

Para determinar los reactivos y el número de tubos de amplificación que se requieren para el experimento, compruebe si el experimento exige la creación de una curva estándar (véase la sección "Estándar de cuantificación QS3").

Se requiere:

- 1 tubo por cada muestra.
- 2 tubos por cada muestra de líquido amniótico.
- 1 o 4 tubo(s) para la curva estándar de cuantificación importada/creada.
- 1 tubo para el QS3 como control positivo en caso de una detección cualitativa.
- 1 tubo para el control de sensibilidad (SC).
- 1 tubo para el control de extracción + inhibición de referencia también utilizado como control negativo de extracción + amplificación (IC2W0).

Notas: - Para los instrumentos de amplificación Dx Real-Time System y CFX 96 Real-Time System, utilice placas transparentes (ref.: HSP9601) con tapones ópticos (ref.: TCS0803).

- Para el instrumento de amplificación LightCycler 480 System II, utilice las placas de color blanco de LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (ref.: 04729692001).

- Cuando se use UNG, consulte los protocolos y programas descritos en la ficha técnica del producto ref. 65-001.

Ejemplo 1:

Investigación cuantitativa para CMV en 2 muestras de sangre total con LightCycler 2.0 o Rotor-Gene. La curva estándar para CMV se importa. Para la amplificación se requiere:

Página 10 de 15
Eduardo Perasso
bioMérieux Argentina SA
APODERAUO
DNI 28.167.514

Dra. Rosana Tabat
Directora Técnica
bioMérieux Argentina S.A.



- 2 tubos para el análisis de muestras: 2 (muestras + R5)
- 1 tubo para importar la curva estándar de cuantificación para CMV (QS3+R5)
- 1 tubo para el control de sensibilidad para CMV (SC+R5)
- 1 tubo para el control de extracción + inhibición de referencia para CMV y para el control negativo de extracción + amplificación (IC2W0+R5)

Ejemplo 2:

Prueba cuantitativa de CMV en 2 muestras de líquido amniótico utilizando LightCycler 2.0 o Rotor-Gene. La curva estándar para CMV se importa.

Para la amplificación se requiere:

- 4 tubos para el análisis de muestras: 2 tubos (muestra extraída sin diluir + R5) y 2 tubos (muestra extraída diluida 1/100 + R5)
- 1 tubo para importar la curva estándar de cuantificación para CMV (QS3+R5)
- 1 tubo para el control de sensibilidad para CMV (SC+R5)
- 1 tubo para el control de extracción + inhibición de referencia para CMV y para el control negativo de extracción + amplificación (IC2W0+R5).

11.1 PROGRAMA

Independientemente de la plataforma de PCR en tiempo real que se use, se sigue el siguiente programa de amplificación:

ATENCIÓN: En Mx3005P, Versant kPCR Molecular system AD, ajuste el paso de desnaturalización a 20 s.

Etapas	Duración	Temperatura	Ciclos	Adquisición de fluorescencia						
				LC1.0	LC2.0 LC480	Applied Biosystems	Rotor-Gene	Mx3005P, Versant kPCR Molecular System AD	Dx Real-Time System y CFX 96 Real-Time System	
Las subidas y bajadas de temperatura están predeterminadas, es decir: al 100% o hasta alcanzar su máximo.										
Amplificación	Desnaturalización	10 seg. 20 seg. para Mx3005P	95 °C	45						
	Hibridación	40 seg.	60 °C		530	530-560)	FAM-VIC	Green-Yellow	FAM-HEX	FAM-HEX
Al final de la hibridación										

Nota 1: En LightCycler, agregue una etapa de enfriamiento: 30 segundos/40 °C/1 ciclo al final de la PCR.

Nota 2: En LightCycler 2.0, ajuste la "seek temperature" a 60 °C durante la programación.

Nota 3: En LightCycler 2.0, es **INDISPENSABLE** utilizar un archivo de compensación de color para la interpretación de resultados. Asegúrese de que este archivo sigue siendo válido (véase la hoja de información técnica correspondiente) y se ha creado y registrado en el software de gestión LightCycler 2.0 utilizando el reactivo Colour Compensation r-gene® (ref.: 71-103).

Nota 4: Para LightCycler 480 existen dos sistemas ópticos: solo "System II" es compatible con el uso del kit CMV R-gene®. El System II incluye una compensación de color automática en el programa.

Nota 5: En los instrumentos Applied Biosystems, seleccione "none" en "passive reference".

Nota 6: En Rotor-Gene, calibre la señal haciendo clic en "gain optimisation".

Nota 7: En Mx3005P o Versant kPCR Molecular System AD, seleccione "none" en "Reference Dye".

11.2 PREPARACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN

En la sala reservada para la amplificación:

Antes de cada uso:

- Los reactivos deberán descongelarse a temperatura ambiente antes de iniciar la prueba.
- Mezcle cada reactivo (agitando durante 2 segundos o con sucesivos pipeteos) y, luego, centrifugue brevemente.
- Asegúrese de que el bloque enfriador se ha descontaminado mediante la exposición a luz ultravioleta durante 30 minutos.
- Asegúrese de que el bloque enfriador se ha refrigerado previamente a +2 °C/+8 °C.

ATENCIÓN: Para evitar la contaminación, cierre los tubos cuando se haya completado la distribución. Sustituya las premezclas de amplificación (R5), estándares de cuantificación (QS) y control de sensibilidad (SC) -15 °C/-31 °C inmediatamente después de cada uso. Cada premezcla puede pasar solo por un máximo de 7 ciclos de congelación/descongelación.

- Homogeneice poco a poco la premezcla de amplificación con la probeta (volumen ajustado a 15 µL) con el fin de distribuir el mismo volumen en todos los tubos.
- Distribuya 15 µL de premezcla de amplificación en los tubos de amplificación.

ATENCIÓN: Respete el orden de agregación de las muestras/reactivos.

- Para cada proceso de amplificación:
 - Agregue 10 µL de cada muestra extraída en los tubos correspondientes.
 - Agregue 10 µL del control de sensibilidad (SC) en los tubos correspondientes (véase la sección "Controles").
 - Agregue 10 µL de cada estándar (de QS4 a QS1) en los tubos correspondientes (véase la sección "Controles").



- o Agregue 10 µL de la mezcla extraída de IC2+W0 extraída en el tubo correspondiente. Este tubo es el control IC2W0 (vease la sección "Controles").

- Centrifugue los tubos con el instrumento correspondiente antes de transferirlos al termociclador.

11.3 EJECUCIÓN DEL PROGRAMA

- Ejecute el programa de amplificación descrito en la sección "Programa".
- Defina las muestras y los controles.
- Para la cuantificación de CMV, introduzca los siguientes valores para el estándar de cuantificación (copias/mL):

	Cuantificación (Sangre total, plasma, suero, LCR, orina, LBA, biopsias, líquido amniótico)				
	Extracción de 200 µL Elución en 50 µL (copias/mL)	Extracción de 200 µL Elución en 100 µL (copias/mL)	Extracción de 300 µL Elución en 250 µL (copias/mL)	Extracción de 250 µL Elución en 65 µL (copias/mL)	Extracción de 200 µL Elución en 90 µL (copias/mL)
QS1	1 250 000	2 500 000	4 000 000	1 250 000	2 250 000
QS2	125 000	250 000	400 000	125 000	225 000
QS3	12 500	25 000	40 000	12 500	22 500
QS4	1250	2500	4000	1250	2250

12. Análisis de los resultados

530 nm = corresponde al canal de lectura "FAM" o "Green" u otros que dependen de plataformas de PCR en tiempo real. Con el fin de simplificar las instrucciones, se utiliza únicamente el término "530 nm".

560 nm = corresponde al canal de lectura "VIC", "HEX" u otro conforme a las plataformas de PCR en tiempo real. Con el fin de simplificar las instrucciones, se utiliza únicamente el término "560 nm".

12.1 ANÁLISIS DE DATOS CON LIGHTCYCLER 1.0

- Use el método de Fit Points en el modo Arithmetic en 2 puntos de medida.
- Desplace la línea de umbral (roja) de modo que atraviese todas las curvas de fluorescencia de las muestras en su parte lineal, por encima del ruido de fondo.
Nota: Si una línea recta no cruza todas las curvas en la parte lineal al mismo tiempo, repita la operación tantas veces como sea necesario para conseguir un CP para cada muestra.
- Para cada muestra positiva, se calcula un Crossing Point (CP) a 530 nm.
- Para cuantificar las muestras, utilice el método "Second Derivative maximum" en modo Arithmetic.
- La concentración calculada para CMV aparece en la columna Calculated (Copias/mL).

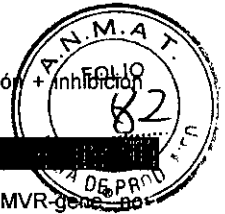
12.2 ANÁLISIS DE DATOS CON LIGHTCYCLER 2.0

- El análisis de la diana viral se realiza en el modo Absolute Quantification a 530 nm.
- El control de extracción + inhibición debe analizarse en modo Absolute Quantification con 560 nm después de activar el archivo de compensación del color (Colour Compensation tab) (Colour Compensation r-gene® ref: 71-103).
- En primer lugar, utilice el método Fit Points para la interpretación cualitativa (identificación positiva de la muestra).
- Desplace la línea de umbral (roja) de modo que atraviese todas las curvas de fluorescencia de las muestras en su parte lineal, por encima del ruido de fondo.
Nota: Si una línea recta no cruza todas las curvas en la parte lineal al mismo tiempo, repita la operación tantas veces como sea necesario para conseguir un CP para cada muestra.
- Para cada muestra positiva, se calcula un Crossing Point (CP) a 530 nm.
- A continuación, para cuantificar las muestras, seleccione el modo Automated F'max (segundo método derivativo).
- La concentración calculada para CMV aparece en la columna Conc (Copias/mL).
- Los controles de extracción + inhibición se analizan al comparar el valor CP calculado para cada control de extracción + inhibición (IC2sample) con el valor CP del control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0) a 560 nm.

12.3 ANÁLISIS DE DATOS CON LIGHTCYCLER 480 (System II)

- Active la compensación automática FAM – HEX de LC480 (System II).
- La diana viral se analiza en el modo de Absolute Quantification a 530 nm (FAM).
- El control de extracción + inhibición se analiza en modo Absolute Quantification con 560 nm (HEX).
- Para cada muestra positiva, se calcula un Crossing Point (CP) a 530 nm.

7084



• Los controles de extracción + inhibición se analizan al comparar el valor CP calculado para cada control de extracción + inhibición (IC2sample) con el valor CP del control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0) a 560 nm (HEX).

- Compruebe que se ha seleccionado none en el campo de Passive reference, ya que la premezcla (R5) del kit CMVR-gene no contiene fluorocromo de referencia pasiva.
- Las muestras se analizan de la misma forma tras seleccionar el detector FAM R-gene en el campo Detector/target.
- Ajuste la línea de umbral manualmente hasta situarla en una posición en la que atravesase cada curva de amplificación en su parte lineal. El objetivo de este paso es identificar muestras positivas para las que se calcula el CT. Las muestras negativas se definen como Undetermined en la columna CT.
- Los controles de extracción + inhibición (IC2sample e IC2W0) se analizan de la misma forma tras seleccionar el detector VIC R-gene en el campo Detector/target.
- Para cuantificar las muestras, regrese al modo lineal.
- La concentración calculada para CMV aparece en el informe editado e impreso al final de cada experimento.
- Los controles de extracción + inhibición se analizan al comparar el valor CT calculado para cada control de extracción + inhibición (IC2sample) con el valor CT del control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0) a 560 nm.

- La diana viral se analiza en el modo Cycling A Green 530 nm.
 - El control de extracción + inhibición se analiza en modo Cycling A Yellow con 560 nm.
 - La línea de umbral debe ajustarse en el modo de Linear Scale tras seleccionar Dynamic tubes y Slope Correct*.
 - La concentración calculada de cada muestra aparece en la columna Calc Conc (copies/mL) de Quant. Results Cycling A Green.
 - Los controles de extracción + inhibición se analizan al comparar el valor CT calculado para cada control de extracción + inhibición (IC2sample) con el valor CT del control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0) a 560 nm.
- * Véase el manual de usuario del termociclador.

- Compruebe que se ha seleccionado none en el campo de reference dye, ya que la premezcla del kit CMV R-gene® no contiene fluorocromo de referencia pasiva.
- La diana viral se analiza desactivando el botón Hex.
- El control de extracción + inhibición se analiza desactivando el botón Fam.
- Ajuste la línea umbral en el modo Linear scale.
- La concentración de CMV calculada aparece en la columna Quantity (copies) de la ventana Quant de la tabla resumen.
- Los controles de extracción + inhibición se analizan al comparar el valor CT calculado para cada control de extracción + inhibición (IC2sample) con el valor CT del control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0) a 560 nm.

- La diana viral se analiza dejando marcado el botón FAM en la pestaña QUANTITATION.
- Si es necesario, ajuste manualmente la línea de umbral de modo que atravesase cada curva de amplificación al final de la fase exponencial. El objetivo de este paso es identificar muestras positivas para las que se calcula el CT. Las muestras negativas se indican mediante N/A en la columna CT. Para cada muestra positiva, la concentración calculada aparece en la columna STARTING QUANTITY (SQ) en las pestañas de QUANTITATION y QUANTITATION DATA.
- Los controles de extracción + inhibición (IC2sample e IC2W0) se analizan de la misma forma tras seleccionar el detector HEX.

13. Validación e interpretación de los resultados

13.1 VALIDACIÓN DEL TEST

ATENCIÓN: El experimento solo es válido si se cumplen todas las condiciones que se especifican a continuación. Si no es así, el experimento completo (incluidas todas las muestras, controles y estándares) deberán repetirse.

CT = Crossing Threshold para la mayoría de las plataformas de PCR en tiempo real o CP (Crossing Point) para la gama de instrumentos LightCycler. Para simplificar las instrucciones, solo se utiliza el término "CT".

- 1ª CONDICIÓN: IC2W0 no debe ofrecer señal (CT) con 530 nm.
- 2ª CONDICIÓN: IC2W0 debe ofrecer una señal (CT) menor o igual a 32 ciclos con 560 nm.
- 3ª CONDICIÓN:
 - Interpretación cuantitativa El valor de CT para el QS3 así como la tendencia o la eficacia requerida para la gama estándar, deben estar comprendidos entre los valores que figuran en la siguiente tabla.
 - Interpretación cualitativa El valor CT del QS3, que sirve como control positivo, debe encontrarse entre los 30 y 35 ciclos a 530 nm.



7084

CUANTIFICACIÓN				DETECCIÓN CUALITATIVA
Instrumentos	CT QS3	Tendencia/eficacia requeridas		CT QS3
	CMV	La curva estándar se prueba para cada experimento	La curva estándar se crea para la posterior importación	CMV
LightCycler 1.0	30-35 ciclos	-3,917 < Tendencia < -3,103	-3,587 < Tendencia < -3,208	30-35 ciclos
LightCycler 2.0 / LightCycler 480		1,8 < Eficacia < 2,1	1,9 < Eficacia < 2,05	
Rotor-Gene		0,8 < Eficacia < 1,1	0,9 < Eficacia < 1,05	
Applied Biosystems		-3,917 < Inclinación < -3,103	No aplicable	
Ax3005P o Versant kPCR Molecular System AD		0,8 < Eficacia < 1,1		
Dx Real-Time System y CFX 96 Real-Time System		0,8 < Eficacia < 1,1		

Si se cumplen todas estas condiciones, se pueden analizar todos los resultados obtenidos con la muestra.

13.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Cada muestra deberá analizarse de forma individual.
- Se muestra un valor CT para cada muestra positiva.
- Si no se puede calcular el valor CT, se considera que la muestra es negativa, inhibida y/o mal extraída.

13.2.1 Para muestras de líquido amniótico

Primera etapa: ANÁLISIS DE LA MUESTRA SIN DILUIR			Segunda etapa: ANÁLISIS DE LA MUESTRA DILUIDA 1/100		
MUESTRA SIN DILUIR		CONCLUSIÓN 1	MUESTRA DILUIDA 1/100		CONCLUSIÓN 2
CMV +/-	IC2sample conforme/no conforme*		CMV +/-	IC2sample conforme/no conforme*	
+	conforme	Muestra de CMV positiva. Cuantificación validada	No se necesita un análisis complementario		
-	conforme	Muestra de CMV negativa.			
+	no conforme	Muestra de CMV positiva. Para obtener resultados de cuantificación, véase el análisis complementario (análisis de muestra diluida 1/100).	+	conforme	Muestra de CMV positiva. La cuantificación de la muestra diluida 1/100 se ha validado.
			+	no conforme	Muestra de CMV positiva. Para obtener resultados de cuantificación, diluya el ADN extraído (de la muestra sin diluir y de la muestra diluida 1/100) en 1/10 y realice de nuevo la etapa de amplificación.
			-	conforme	
			-	no conforme	
			+	conforme	Muestra de CMV positiva. La cuantificación de la muestra diluida 1/100 se ha validado.
			+	no conforme	Muestra de CMV positiva. Para obtener resultados de cuantificación, diluya el ADN extraído (de la muestra sin diluir y de la muestra diluida 1/100) en 1/10 y realice de nuevo la etapa de amplificación.
			-	conforme	La muestra contiene inhibidores. Realice la etapa de extracción de nuevo de la muestra sin diluir.
			-	no conforme	La muestra contiene inhibidores. Realice la etapa de extracción de nuevo de la muestra sin diluir y de la muestra diluida 1/100.

*IC2sample conforme: CT [IC2sample] ≤ CT [IC2W0] + 3 ciclos

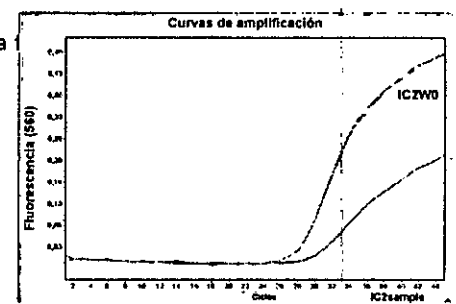
*IC2sample no conforme: CT [IC2sample] > CT [IC2W0] + 3 ciclos

ATENCIÓN: Si la cuantificación válida es la que se obtiene a partir de una dilución de la muestra (1/10, 1/100 o 1/1000) el resultado de cuantificación obtenido con la muestra diluida deberá restablecerse conforme al factor de dilución (x10, x100 o x1000).

13.2.2 Para las demás muestras infecciosas

Control de extracción + inhibición (IC2sample)	CT [IC2sample] ≤ CT [IC2W0] + 3 ciclos		Muestra INHIBIDA y/o mal extraída	
	Muestra NO INHIBIDA y BIEN EXTRAÍDA		CT calculado	CT no calculado
Muestra	CT calculado	CT no calculado	CT calculado	CT no calculado
Interpretación cuantitativa CMV	Patógeno detectado Cuantificación validada	Patógeno no detectado	Patógeno detectado Efectúe de nuevo la cuantificación	Resultado no válido
Interpretación cualitativa CMV	Patógeno detectado	Patógeno no detectado	Patógeno detectado	Resultado no válido

ATENCIÓN: En caso de muestra negativa: si la inclinación de la curva genera una caída en la fluorescencia final (≥ 50%) comparada con la contigua), es posible una leve inhibición. Sugerimos volver a extraer y analizar la muestra.



NOTAS IMPORTANTES:

- Para la interpretación de los resultados, se aconseja expresar el resultado de la cuantificación en logaritmo base 10 (log₁₀).
- En el marco del seguimiento de un paciente, dos resultados de cuantificación se consideran significativamente diferentes si los dos valores expresados en log₁₀ (copias/mL de muestra) o log₁₀ (UI/mL de muestra) difieren en al menos 0,5 log₁₀.
- Si los resultados se expresan en log₁₀ (copias/mL de muestra), esta interpretación solo se aplica si los 2 resultados de la cuantificación se han obtenido usando los mismos métodos de extracción y el mismo instrumento PCR en tiempo real.
- Es **imprescindible** comparar los resultados obtenidos con el kit CMV R-gene® con otros resultados de pruebas clínicas y biológicas para definir el estado viral de cada paciente.

13.3 Resultados expresados en Unidades Internacionales:

Nota: El factor de conversión se ha determinado tomando como base el 1º Estándar Internacional de CMV (NIBSC 09/162).

- Los resultados obtenidos en copias/mL pueden convertirse a Unidades Internacionales (UI/mL). Para ello, se debe definir un factor de conversión. El factor de conversión depende del tipo de muestra probada y los instrumentos de extracción y amplificación usados.
- Los estudios realizados con el kit CMV R-gene® determinaron los diferentes factores de conversión para las siguientes combinaciones de dispositivos y muestras:

Extracción:	Factor de conversión					
	LC2.0	LC480	ABI7500 Fast	Rotor-Gene	Dx Real-Time System y CFX 96 Real-Time System	Mx3005P Versant kPCR Molecular System AD
Plataformas de PCR						
NucliSENS® easyMAG®	0,169				0,308	

Ejemplo: para una muestra de plasma extraída con NucliSENS® easyMAG® y amplificada con LightCycler 480, el factor para la conversión de copias/mL a UI/mL es 0,308.

Número de UI/mL: Número de cp/mL x 0,308

Es decir, para una muestra determinada en 10 000 cp/mL, la cuantificación correspondiente es 3080 UI/mL.

No obstante, cada laboratorio deberá establecer su propio valor de conversión.

La compra de este producto otorga los derechos del comprador contemplados en determinadas patentes de Roche para utilizar el producto exclusivamente con el objetivo de prestar servicios de diagnóstico in vitro humano. bioMérieux no concede, por el presente documento, derechos de patente generales u otras licencias de cualquier tipo aparte del derecho de uso derivado de la compra.

14. Guía de Problemas / Soluciones

14.1 AUSENCIA DE SEÑAL DE FLUORESCENCIA EN MUESTRAS POSITIVAS O CUANTIFICACIÓN SUBESTIMADA

CAUSAS POSIBLES	SOLUCIONES
<p>La premezcla de amplificación se ha descongelado demasiadas veces.</p> <p>La premezcla de amplificación ha permanecido a temperatura ambiente demasiado tiempo o se ha descongelado a una temperatura demasiado alta.</p> <p>Desviación de las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de muestras en el laboratorio.</p> <p>Desviación de las condiciones de almacenaje y caducidad del kit CMV R-gene® (ref.: 69-003B).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Siga las instrucciones de la sección "Composición del kit y condiciones de conservación". Las premezclas no deben descongelarse más de 7 veces. Compruebe que las premezclas de amplificación, los estándares de cuantificación y el control de sensibilidad regresan a los -15°C /-31 °C inmediatamente después de su uso. Compruebe que las premezclas de amplificación, los estándares de cuantificación y el control de sensibilidad se descongelaron a temperatura ambiente. Use un bloque enfriador cuando prepare y distribuya las premezclas. Consulte la sección "Obtención, transporte y preparación de las muestras", que define las condiciones óptimas (temperatura, tiempo) de transporte y almacenamiento. Compruebe el periodo transcurrido entre la recogida de la muestra y su análisis. Siga las instrucciones de la sección "Composición del kit y condiciones de conservación". El kit CMV R-gene® (ref. 69-003B debe conservarse a -15°C /-31 °C en un lugar oscuro.
<p>Problema durante la fase de extracción.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe que las muestras se hayan mezclado bien antes de realizarse la extracción. Si se realiza la extracción de forma manual con el DNA Extraction Kit (ref.: 67-000), respete el número de lavados y el tiempo de incubación indicado en la sección "DNA Extraction Kit". Compruebe los materiales y protocolos que se utilizan para extraer muestras. El rendimiento del kit solo se valida para las extracciones realizadas con los sistemas descritos en la sección "Protocolo de extracción de muestras". Efectúe siempre las tareas de mantenimiento preventivo de los instrumentos para extracción automatizada conforme a las recomendaciones del fabricante.
<p>Error en la distribución de reactivos y muestras.</p> <p>Error de programación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe la calibración de las pipetas. Compruebe que se hayan utilizado los volúmenes correctos. Mezcle bien los reactivos y muestras antes de distribuirlos en los tubos de amplificación. Revise todos los parámetros de programación introducidos (canal de detección, modo, número de ciclos, temperatura y tiempo). Revise todas las etapas relativas al registro de las muestras. Compruebe las concentraciones almacenadas de los estándares de cuantificación. Compruebe el rendimiento térmico del instrumento según las recomendaciones del fabricante.
<p>Problema durante la fase de amplificación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Efectúe siempre las tareas de mantenimiento preventivo del instrumento de PCR en tiempo real según las recomendaciones del fabricante. Compruebe que los tubos estén cerrados y el anillo de fijación del carrusel Rotor-Gene® esté correctamente bloqueado.
<p>Error en el análisis de los resultados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe el ajuste de la línea de umbral. En el caso de un análisis basado en una curva estándar importada, compruebe que la curva importada es válida. Compruebe que se han cumplido TODAS las condiciones de interpretación (véase la sección "Validación e interpretación de los resultados"). Con Applied Biosystems: Compruebe que none esté seleccionado en el campo passive reference. Con LightCycler 2.0: Compruebe que los resultados obtenidos se hayan corregido utilizando un archivo de compensación de color válido previamente creado utilizando el kit con ref. 71-103.
<p>Error en la interpretación de los resultados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Compare el resultado del control de extracción + inhibición (IC2sample) para la muestra considerada sospechosa con el resultado del control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0) (véase la sección "Validación e interpretación de los resultados").



14.2 AUSENCIA DE SEÑAL DE FLUORESCENCIA EN MUESTRAS POSITIVAS O CUANTIFICACIÓN SOBRESTIMADA

CAUSAS POSIBLES	SOLUCIONES
Contaminación durante el experimento.	<ul style="list-style-type: none"> • Siga todas las recomendaciones de la sección "Peligros y normas de seguridad". • Descontamine el bloque enfriador mediante una luz ultravioleta. • Respete todas las recomendaciones del fabricante para la descontaminación de los instrumentos para la extracción automatizada. • Solo el personal cualificado debería manejar el kit CMV R-gene®. • Use el reactivo R0 incluido en el kit de forma paralela a las muestras extraídas para identificar la etapa en la que se produjo la contaminación.
Error en la distribución de reactivos y muestras.	<ul style="list-style-type: none"> • Compruebe la calibración de las pipetas. • Compruebe que se hayan utilizado los volúmenes correctos. • Mezcle bien los reactivos y muestras antes de distribuirlos en los tubos de amplificación.
Error de programación.	<ul style="list-style-type: none"> • Revise todos los parámetros de programación introducidos (canal de detección, modo, número de ciclos, temperatura y tiempo). • Revise todas las etapas relativas al registro de las muestras. • Compruebe las concentraciones almacenadas de los estándares de cuantificación.
Error en el análisis de los resultados.	<ul style="list-style-type: none"> • Compruebe el ajuste de la línea de umbral. • En el caso de un análisis basado en una curva estándar importada, compruebe que la curva importada es válida. • Compruebe que se han cumplido TODAS las condiciones de interpretación (véase la sección "Validación e interpretación de los resultados"). • Con Applied Biosystems: Compruebe que none esté seleccionado en el campo passive reference. • Con LightCycler 2.0: Compruebe que los resultados obtenidos se hayan corregido utilizando un archivo de compensación de color válido previamente creado utilizando el kit con ref. 71-103.
Error en la interpretación de los resultados.	<ul style="list-style-type: none"> • Compare el resultado del control de extracción + inhibición (IC2sample) para la muestra considerada sospechosa con el resultado del control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0) (véase la sección "Validación e interpretación de los resultados").

14.3 LAS MUESTRAS PARECEN INHIBIDAS

CAUSAS POSIBLES	SOLUCIONES
Problema durante la fase de extracción.	<ul style="list-style-type: none"> • Compruebe que las muestras se hayan mezclado bien antes de realizarse la extracción. • Si se realiza la extracción de forma manual con el DNA Extraction Kit (ref.: 67-000), respete el número de lavados y los tiempos de incubación indicados en la sección "DNA Extraction Kit". • Compruebe los materiales y protocolos que se utilizan para extraer muestras. • Los resultados del kit solo se validan para las extracciones descritas en la sección "Protocolo de extracción de muestras". • Efectúe siempre las tareas de mantenimiento preventivo de los instrumentos para extracción automatizada conforme a las recomendaciones del fabricante. • En caso de obtener extractos coloreados y muestras inhibidas con NucliSENS® easyMAG para la matriz de sangre total, es preferible usar el protocolo "Whole Blood Viral Extraction".
El IC2W0 no proviene de la misma extracción.	<ul style="list-style-type: none"> • Asegúrese de que todas las muestras probadas incluyen el mismo lote de IC2 y de IC2W0. • Cada extracción debería tener su propio IC2W0.

15. Eficiencia

ATENCIÓN: Las características de funcionamiento descritas han sido validadas y están garantizadas si el kit se utilizó con las técnicas de extracción y los instrumentos de amplificación recomendados en la ficha técnica.

Como la premezcla de amplificación de CMV (R5) se incluye tanto en el kit CMV HHV6,7,8 R-gene® (Ref. 69-100B) como en el CMV R-gene® (Ref. 69-003B), la eficiencia del parámetro de CMV se determinó con cualquiera de los dos kits indiferentemente.

15.1 REPRODUCIBILIDAD INTRAANALÍTICA

El estudio de reproducibilidad intraanalítica se realizó a partir de tres muestras de sangre total reconstituidas de la "muestra 1 de CMV de la OMS" (cepa HCMV Merlin). La muestra de CMV de la OMS se diluyó en sangre total probada como negativa para CMV en las siguientes concentraciones: 750 000, 75 000 y 7500 copias/mL. Cada dilución se extrajo en 10 ocasiones durante la misma serie de extracción con el instrumento NucliSENS® easyMAG® basándose en el protocolo específico B (140 µL de sílice) con 200 µL de muestra y una elución en 50 µL.



Los 30 extractos obtenidos se amplificaron en el dispositivo Dx Real Time System con la premezcla de amplificación de CMV (R5) en un único experimento.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

	Cuantificación OMS (cps/mL)				
Muestra 1 de CMV de la OMS	750 000 copias CMV/mL	375 267	5,57	0,08	1,39%
	75 000 copias CMV/mL	41 709	4,62	0,06	1,41%
	7500 copias CMV/mL	6609	3,82	0,22	5,72%

Los resultados muestran coeficientes de variación comprendidos entre el 1,39% y el 5,72% para una extracción de NucliSENS[®]easyMAG[®] basándose en el protocolo específico B (140 µL de sílice), lo que demuestra la buena repetibilidad del kit.

15.2 REPRODUCIBILIDAD INTERANALÍTICA

El estudio de reproducibilidad interanalítica se realizó a partir de tres muestras de sangre total reconstituidas de la "muestra 1 de CMV de la JMS" (cepa HCMV Merlin). La muestra de CMV de la OMS se diluyó en sangre total probada como negativa para CMV en las siguientes concentraciones: 750 000, 75 000 y 7500 copias/mL. Cada dilución se extrajo 5 veces durante 5 series independientes de extracción y amplificación. La extracción se realizó con el instrumento NucliSENS easyMAG[®] basándose en el protocolo específico B (140 µL de sílice) con 200 µL de muestra y una elución en 50 µL. La amplificación se realizó en el dispositivo Dx Real Time System con la premezcla de amplificación de CMV (R5).

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

	Cuantificación OMS (cps/mL)				
Muestra 1 de CMV de la OMS	750 000 copias CMV/mL	270 153	5,43	0,03	0,61%
	75 000 copias CMV/mL	27 231	4,44	0,08	1,70%
	7500 copias CMV/mL	2584	3,41	0,1	3,09%

Los resultados muestran coeficientes de variación comprendidos entre el 0,61% y el 3,09% para una extracción de NucliSENS[®]easyMAG[®] basándose en el protocolo específico B (140 µL de sílice), lo que demuestra la buena reproducibilidad del kit.

15.3 ESTUDIO DE LA GAMA DE LINEALIDAD DEL CMV

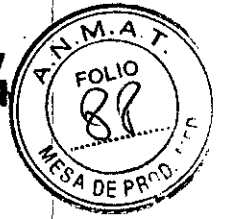
Uno de los problemas que plantea el diagnóstico del CMV es la gran diferencia de cargas virales presentes en la muestra, en particular, en las muestras de líquido amniótico.

La amplia gama de cargas virales en las muestras, en particular en el líquido amniótico, nos ha llevado a comprobar la linealidad de nuestro estándar de cuantificación más allá del primer punto de la gama, es decir, $2,5 \cdot 10^6$ copias/mL para las matrices de sangre total (la matriz más usada) y líquido amniótico.

Para ello, una muestra de cultivo de MRC5 infectada por la cepa AD169 de CMV positiva se diluyó antes de la extracción en líquido amniótico o en sangre total negativa. La gama de dilución abarca 8 log: de 1,43 log a 9,43 log de sangre total y de 1,45 log a 9,45 log de líquido amniótico.

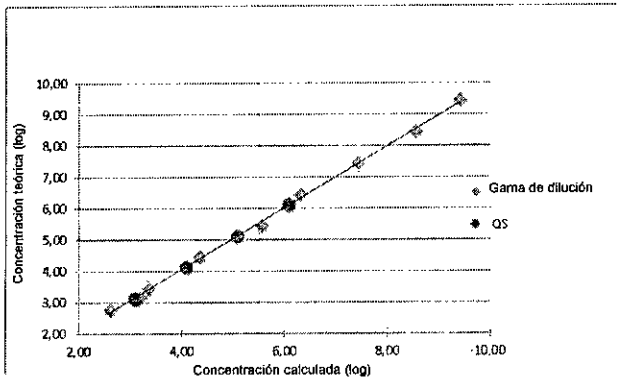
El instrumento de extracción usado fue el NucliSENS[®]easyMAG[®] y la amplificación se realizó en el dispositivo Dx Real-Time System.

7084



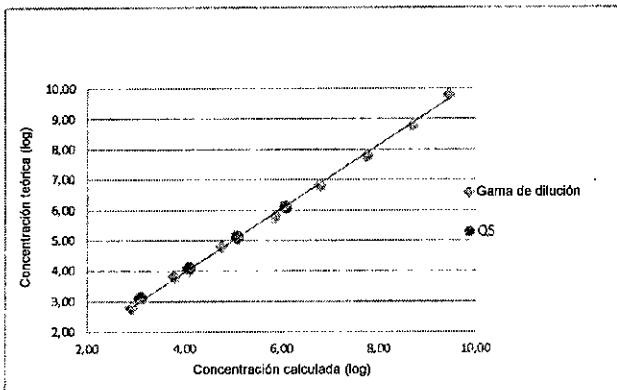
Los resultados se muestran en los siguientes gráficos:

Estudio de linealidad del matriz de sangre total



La cuantificación de CMV en la sangre total con los dispositivos NucliSENS® easyMAG®/Dx Real Time System es lineal de 9,43 log (cp/mL) a 2,63 log (cp/mL).

Estudio de linealidad del matriz de líquido amniótico



La cuantificación de CMV en líquido amniótico con la combinación de dispositivos NucliSENS® easyMAG®/Dx Real Time System es lineal de 9,45 log (cp/mL) a 2,91 log (cp/mL).

15.4 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

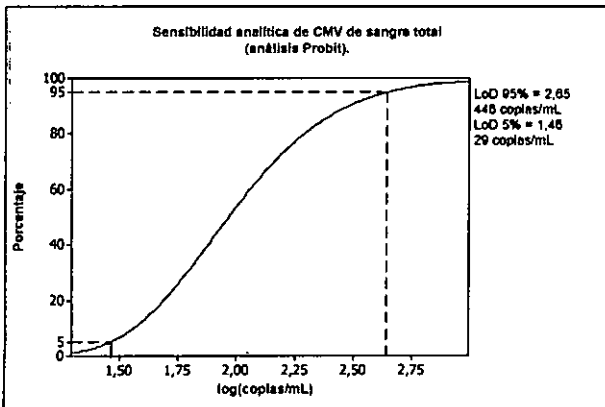
La sensibilidad analítica o límite de detección del parámetro de CMV se determinó para una gama de diluciones del panel de la OMS (cepa de HCMV Merlin) en sangre total. Las muestras se diluyeron en sangre total con EDTA previamente probada como negativa para CMV. Las muestras contenían entre 1 a 1×10^4 copias/mL. Cada dilución se extrajo 15 veces con el dispositivo NucliSENS® easyMAG® conforme al protocolo específico B, programa específico B 2.0.1, volumen de la muestra: 200 µL, volumen de la elución: 50 µL y volumen de sílice: 140 µL. Los 15 extractos obtenidos en cada dilución y en cada protocolo de extracción se amplificaron con el dispositivo Dx Real Time System con la premezcla de amplificación CMV (R5).

E

7084



La siguiente curva muestra el análisis Probit de los resultados obtenidos:
Sensibilidad analítica de CMV de sangre total (análisis Probit).



La curva muestra que existe:

- Un 95% de probabilidad de detectar el virus de CMV en la sangre total que contenga 446 copias/mL.
- Un 5% de probabilidad de detectar el virus de CMV en la sangre total que contenga 29 copias/mL.

15.5 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad de reconocimiento de los cebadores y las sondas seleccionadas para la detección de los virus detectados por el kit se determinó conforme al análisis de las secuencias (viral, bacteriana y humana) presentes en las bases de datos. Se hizo la prueba en la plataforma de PCR en tiempo real con estos virus:

- Herpesvirus humanos: HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8;
- Poliomavirus: JCV, BKV;
- Adenovirus 12

⇒ No se ha observado ninguna amplificación viral con ninguno de estos patógenos salvo con aquel al que se dirige la premezcla.

NOTA: También se han realizado pruebas con ADN extraído de humanos y con muestras de sangre que hayan dado negativo en CMV. Estas pruebas demostraron que las secuencias humanas no estaban amplificadas.

15.6 ESTUDIO CLÍNICO

1- Se ha realizado un estudio clínico retrospectivo a partir de 117 muestras de sangres total probadas en el Departamento de Virología del Hospital de Caen, Francia.

Las muestras, procedentes principalmente de pacientes que habían recibido un trasplante renal, se habían caracterizado previamente mediante el método de antigenemia CMV ppUL83 (CINAKit®). Se extrajeron con el DNA Extraction Kit (ref. 67-000) incluido en el kit completo CMV HHV6,7,8 R-gene® (ref. 69-100). El mismo extracto se amplificó de forma simultánea con el dispositivo LightCycler1.0 con la técnica de PCR en tiempo real usada en el laboratorio y con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene® (ref.: 69-100B).

*Quantitative analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay_Gouarin S, et al. J Clin Virol. 2004 Mar;29(3):194-201.

Análisis cualitativo de los resultados:

Comparación de los resultados obtenidos con el kit CMV HHV.6.7.8 R-gene® y CINAKit®.

82% de concordancia entre ambas técnicas

		Antigenemia ppUL83 CINAKit®		
		+	-	
CMV HHV6,7,8 R-gene®	+	89	20	109
	-	1	7	8
		90	27	117



El alto número de detecciones positivas por medio del kit CMV HHV6,7,8 R-gene[®] se explica por el hecho de que permite una detección más temprana del ADN viral que la detección por antigenemia.
 El análisis de los resultados discordantes se ha podido realizar en parte al comparar ambos métodos de detección de ADN viral: la técnica de PCR en tiempo real del laboratorio y el kit CMV HHV6,7,8 R-gene[®]. Los resultados comparativos de estas dos técnicas se muestran en la siguiente tabla:

Comparación de los resultados obtenidos con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene[®] y la técnica de PCR en tiempo real del laboratorio (Gouarin S; et al JCV 2004; 29 :45-52)

		PCR en tiempo real del laboratorio		
		+	-	
CMV HHV6,7,8 R-gene [®]	+	108	1	109
	-	4	4	8
		112	5	117

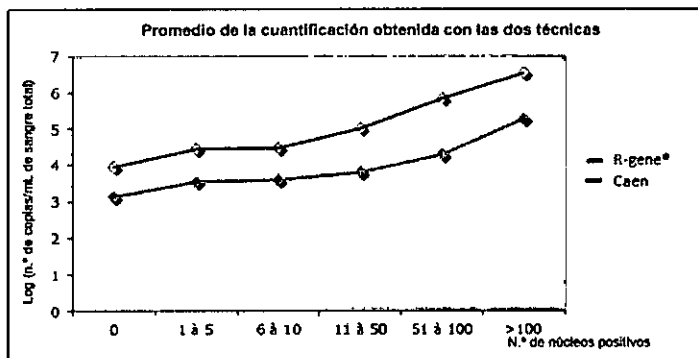
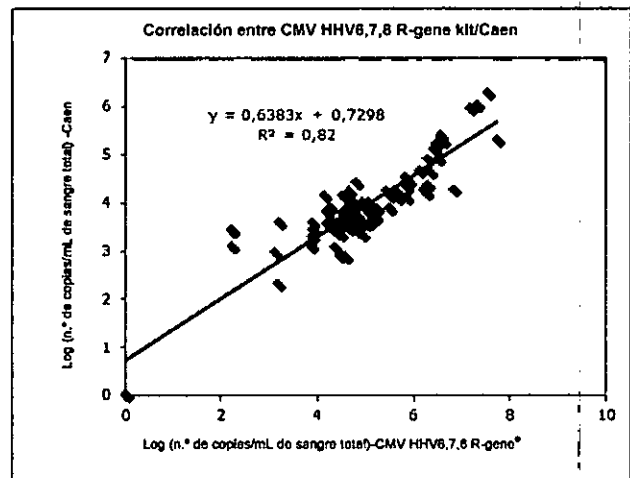
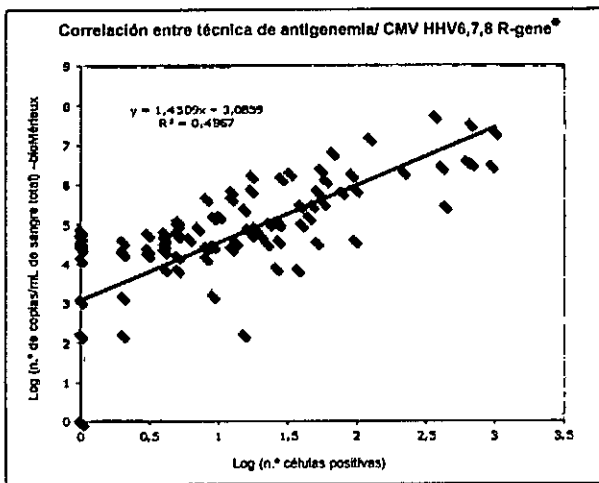
96% de concordancia entre ambas técnicas de PCR en tiempo real. La comparación permite afirmar:

- 19 de los 20 resultados positivos obtenidos con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene[®], pero negativos con el método de antigenemia CINAKit[®] y una muestra positiva obtenida con el método de antigenemia (1 núcleo/200 000 células).
- 1 resultado negativo con las dos técnicas de PCR en tiempo real.
- Los otros 4 resultados discordantes entre CINAKit[®] y CMV HHV6,7,8 R-gene[®] (2 muestras < 5 núcleos/200 000 células y 2 > 5 núcleos/200 000 células) resultaron débilmente positivos con la técnica de PCR en tiempo real del laboratorio (< 3100 copias/mL).

Análisis cuantitativo de las muestras positivas obtenidas con las tres técnicas

La comparación de las cuantificaciones obtenidas con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene[®] y la técnica de antigenemia ppUL83 muestra una dispersión relativa de los valores. En cambio, la comparación de las cuantificaciones obtenidas con las dos técnicas de PCR en tiempo real muestra una correlación bastante mejor.

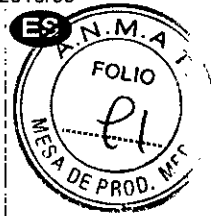
Aparece claramente una diferencia en la cuantificación de aproximadamente 0,7 log entre las dos técnicas, tal y como se muestra en la figura inferior.



2- Se ha realizado un estudio clínico retrospectivo a partir de 74 muestras de sangre total en el Departamento de Virología del Toulouse Hospital, Francia.

Las muestras, procedentes principalmente de pacientes que habían recibido un trasplante renal, se habían caracterizado previamente mediante la técnica de PCR en tiempo real del laboratorio*. Se extrajeron con el instrumento MagNA Pure LC y amplificaron con LightCycler2.0 mediante el kit CMV HHV6,7,8 R-gene[®] (ref. 69-100B).

*Automated Extraction and Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Whole Blood by Real-Time PCR Assay_ Mengelle et al. J Clin Microbiol 2003, 41, 3840-3845)



70841

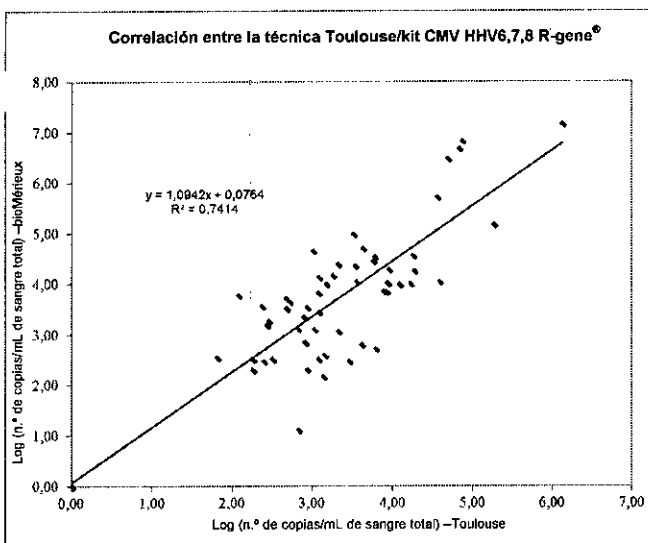
Análisis cualitativo de los resultados:

Comparación de los resultados obtenidos con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene® y la técnica de PCR en tiempo real

		PCR en tiempo real del laboratorio		
		+	-	
CMV HHV6,7,8 R-gene®	+	57	5	62
	-	8	4	12
Total		65	9	74

82% de concordancia entre ambas técnicas de PCR en tiempo real. Entre los 13 resultados discordantes, 10 presentan cargas virales inferiores a 1000 copias/mL de sangre.

Análisis cuantitativo de las muestras positivas obtenidas con las dos técnicas



La pendiente de la línea de regresión de 1,09 muestra la buena correlación entre ambas técnicas.

3- Se ha realizado un estudio clínico a partir de 218 muestras de sangre total en el Departamento de Virología del Saint-Louis Hospital, París, Francia.

Las muestras se tomaron de pacientes que habían recibido trasplantes de médula en el marco de la actividad rutinaria del laboratorio y se realizaron de forma simultánea con el dispositivo ABI 7500 con la técnica de referencia del laboratorio y el kit CMV HHV6,7,8 R-gene®. Se usó un mismo extracto obtenido con el dispositivo de extracción MagnAPure LC para realizar los dos ensayos en paralelo.

Resultados de CMV

Análisis cuantitativo de los resultados CMV obtenidos con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene® en comparación con la técnica de PCR en tiempo real del laboratorio

		PCR en tiempo real del laboratorio		
		+	-	
CMV HHV6,7,8 R-gene®	+	73	1	74
	-	7	137	144
Total		80	138	218

96% de concordancia entre ambas técnicas de PCR en tiempo real desde el punto de vista cualitativo. Las siete muestras que dieron negativo con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene® y positivo con la técnica de referencia del laboratorio tienen todas cargas virales inferiores a 413 copias/mL (por debajo del nivel de sensibilidad del kit). Es estadísticamente posible que las muestras con una carga viral inferior o igual al nivel de sensibilidad del kit salgan positivas o negativas. Del mismo modo, la muestra que dio negativo con la técnica de referencia del laboratorio, pero positivo con el kit CMV HHV6,7,8 R-gene® tenía una carga viral de 289 copias/mL.

Eduardo...
 Director Técnico
 bioMérieux Argentina S.A.

Dra. Rosana Labat
 Directora Técnica
 bioMérieux Argentina S.A.

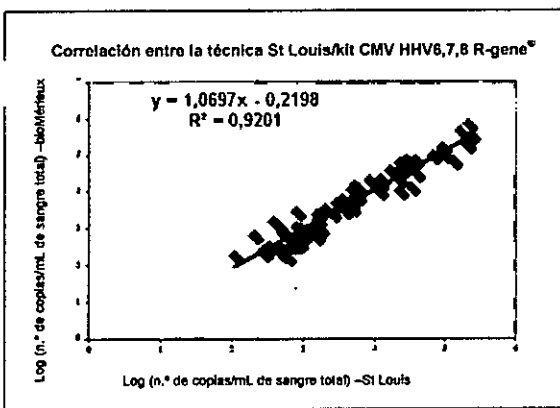
[Handwritten signature]

70841



Análisis de resultados de CMV con grupos de cuantificación

PCR en tiempo real del laboratorio		CMV HHV6,7,8 R-gene®				
Distribución de los resultados	Nº. de muestras	0 a 3000 copias/mL	3000 a 25 000 copias/mL	25 000 a 250 000 copias/mL	250 000 a 2 500 000 copias/mL	> 2 500 000 copias/mL
0 a 3000 copias/mL	180	178	2			
3000 a 25 000 copias/mL	25		21	4		
25 000 a 250 000 copias/mL	13		1	9	3	
250 000 a 2 500 000 copias/mL	0				0	
> 2 500 000 copias/mL	0					0
TOTAL	218	178	24	13	3	0



La concordancia entre los grupos de cuantificación de CMV es del 95,41% (208/218). El análisis de las diez muestras discordantes indica en la siguiente tabla que la diferencia de cuantificación entre las dos técnicas es inferior a 0,5 log para todas estas muestras.

Una diferencia de esta índole no se puede considerar significativa si no se tienen en cuenta los resultados de la técnica de PCR en tiempo real en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Diferencia de los resultados de cuantificación entre el kit CMV HHV6,7,8 R-gene® y la técnica de PCR en tiempo real del laboratorio

Cuantificación				
PCR en tiempo real del laboratorio		CMV HHV6,7,8 R-gene®		Delta Log
Copias/mL	Log	Copias/mL	Log	
2100	3,32	3131	3,50	-0,17
2935	3,47	4212	3,62	-0,16
16 549	4,22	33 862	4,53	-0,31
21 700	4,34	35 602	4,55	-0,22
23 151	4,36	58 593	4,77	-0,40
24 629	4,39	38 474	4,59	-0,19
32 056	4,51	11 912	4,08	0,43
158 391	5,20	424 381	5,63	-0,43
206 004	5,31	630 596	5,80	-0,49
231 817	5,37	317 915	5,50	-0,14

Aunque las dos técnicas de PCR en tiempo real amplifican regiones diferentes del genoma del CMV, la comparación de los resultados de la carga viral de CMV muestra una correlación perfecta entre las dos técnicas.

4- Estudio retrospectivo sobre el líquido amniótico en el Departamento de Virología del Necker University Hospital - Laboratorio asociado: Centro de Referencia Nacional para el Citomegalovirus (Red de Hospitales Públicos de París, Francia).

Se analizaron 138 muestras de líquido amniótico de mujeres embarazadas para las que se había solicitado un diagnóstico de CMV con la técnica de PCR en tiempo real del laboratorio (Leruez et al. J Clin Microbiol 2003 May; 41(5): 2040-6) y el kit CMV HHV6,7,8 R-gene®. De estas muestras, 38 se habían catalogado como positivas para CMV y 100 negativas para CMV (de las cuales 2 eran positivas para el Parvovirus B19) en el primer intento y mediante la técnica de referencia.



Se extrajeron y diluyeron 200 µL de muestras en 100 µL con el autómata MagNaPure y después se amplificaron con ABI Prism. Cada muestra fue probada en estado puro y diluida al 1/10.

Los resultados del estudio retrospectivo muestran una concordancia del 99% entre las dos técnicas. La única muestra discordante muestra una carga viral muy próxima al límite de sensibilidad. En una segunda prueba, resultó ser negativa con ambas técnicas.

	PCR en tiempo real del laboratorio		
	+	-	
CMV R-gene®	+	37	37
	-	1	101
Total		38	138

De las 100 muestras que se detectaron como negativas previamente con las dos técnicas, una se había inhibido y no se podía volver a probar por falta de material.

De las 37 pruebas que se detectaron como positivas previamente con las dos técnicas, se detectó un número poco habitual de muestras inhibidas. De hecho, 24 muestras se habían inhibido (control de inhibición negativo o no contenido en las especificaciones) como resultado de una carga viral de CMV muy elevada. De esta forma, constatamos que las cargas virales de CMV en las muestras de líquido amniótico eran extremadamente altas.

Entre estas 24 muestras, 19 extractos contaban con el volumen suficiente como para que se pudieran realizar más pruebas en diluciones de 1/100 y 1/1000. Las diluciones de 1/100 o 1/1000 de los extractos se usaron para disipar las inhibiciones causadas por CMV excesivo y para cuantificar las muestras.

El conjunto de estos resultados nos ha permitido definir un protocolo específico para el líquido amniótico que permite, en un primer momento, dar un resultado cualitativo de manera sistemática (y a veces un resultado cuantitativo) y, en un segundo momento, un resultado cuantitativo, tal y como se describe en el apartado de "Interpretación de los resultados - Para el líquido amniótico".

16. Informe de prueba en paneles

Con motivo de la campaña europea de control de CMV propuesta por el QCMD en 2013, se probaron mediante un método ciego 10 muestras para el panel de CMV con el kit R-gene®. 200 µL de cada muestra se extrajeron con el NucliSENS® easyMAG® y se amplificaron con el ABI 7500 Fast con la premezcla de amplificación de CMV específica.

	Muestra (cepa)	Resultados de QCMD		Resultados de CMV R-gene®		Delta Log
		cp/mL	Log	cp/mL	Log	
CMV 13-01	CMV (AD169)	875	2,94	851	2,93	-0,01
CMV 13-02	CMV (AD169)	8570	3,93	7375	3,87	-0,07
CMV 13-03	CMV (AD169)	460	2,66	437	2,64	-0,02
CMV 13-04	CMV (AD169)	90	1,95	79	1,9	-0,05
CMV 13-05	Negativa	-	-	-	-	-
CMV 13-06	CMV (AD169)	162	2,21	145	2,16	-0,05
CMV 13-07	CMV (AD169)	826	2,92	811	2,91	-0,01
CMV 13-08	CMV (RS75)	437	2,64	382	2,58	-0,06
CMV 13-09	CMV (RS75)	310	2,49	203	2,31	-0,18
CMV 13-10	CMV (RS75)	2004	3,30	1563	3,19	-0,11

⇒ 100% (10/10) de las muestras probadas concordaban con los resultados esperados.

En el panel de CMV 2013, 9 de las 10 muestras eran CMV positivas.

La muestra negativa se confirmó como tal con la ayuda del kit CMV R-gene®. La detección de muestras con un reducido contenido viral de CMV (CMV13-04 a razón de 90 copias/mL y CMV13-06 a razón de 162 copias/mL) pone de manifiesto la correcta sensibilidad del kit CMV R-gene®.

En términos de cuantificación, se observa una excelente correlación con los resultados del QCMD con los delta logs comprendidos entre -0,01 y -0,18 log.



17. Bibliografía

- Hojas de asistencia para la programación y el análisis, por tipo de dispositivo, descargables en www.biomerieux.com/techlib.
- Protocolo detallado "Worksheet easyMAG® Viral Whole Blood extraction protocol" de bioMérieux.

Publicaciones:

- 1) Kotton CN1, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; Transplantation Society International CMV Consensus Group.
Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013 Aug 27;96(4):333-60. doi: 10.1097/TP.0b013e31829df29d.
- 2) Camille N. Kotton, Deepali Kumar, Angela M. Caliendo, Anders Asberg, Sunwen Chou, David R. Snyderman, Upton Allen, and Atul Humar
International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation
Transplantation 2010;89: 779-795
- 3) Xavier Roblin , Sylvie Pillet , Abderrahim Oussalah, Philippe Berthelot, Emilie Del Tedesco, Jean-Marc Phelip, Marie-Laure Chambonnière, Olivier Garrau, Laurent Peyrin-Biroulet and Bruno Pozzetto
Cytomegalovirus Load in Inflamed Intestinal Tissue Is Predictive of Resistance to Immunosuppressive Therapy in Ulcerative Colitis
Am J Gastroenterol. 2011 Nov;106(11):2001-8
- 4) C. Rodier-Bonifas, P.-L. Cornut, G. Billaud, B. Lina, C. Burillon, P. Denis
Intérêt de la recherche du cytomegalovirus par polymérase chain reaction dans le syndrome de Posner-Schlossman.
Journal Français d'ophtalmologie 2011 34, 24-29
- 5) J. Bordes, J. Masiin, B. Prunet, E. d'Aranda, G. Lacroix, P. Goutorbe, E. Dantzer, E. Meaudre
Cytomegalovirus infection in severe burn patients monitoring by real-time polymerase chain reaction: A prospective study
Burns (2011), doi:10.1016/j.burns.2010.11.006.
- 6) Claire Deback, M.D.; Felix Agbalika; Catherine Scieux; Anne-Geneviève Marcelin; Agnès Gautheret-Dejean; Janine Cherot; Laurence Hermet; Odile Roger; Henri Agut .
Detection of Human Herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in Whole Blood by Real-Time PCR Using the New CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene® kit
J Virol Methods May 2008 ;149(2):285-91.
- 7) Aurélie Ducroux, Samira Cherid, Alexandra Benachi, Yves Ville, and Marianne Leruez-Ville
Evaluation of New Commercial Real-Time PCR Quantification Assay for Prenatal Diagnosis of Cytomegalovirus Congenital Infection.
J of Clinical Microbiology, June 2008, p. 2078–2080.
- 8) Birgit D. A. Michelin, Ita Hadžisejdić, Michael Bozic, Maja Grahovac , Markus Hess, Blaženka Grahovac, Egon Marth, Harald H. Kessler
Detection of Cytomegalovirus DNA in EDTA Whole Blood Samples: Evaluation of the Quantitative artus® CMV LC PCR Kit in Conjunction with Automated Sample Preparation.
J. Clin. Microbiol., February 2008.
- 9) C. Deback, A. M Fillet, N. Dehdin, B. Barrou, S. Varnous, F. Najoullah, F. Bricaire, H. Agut.
Monitoring of human Cytomegalovirus infection in immunosupressed patients using real time PCR on whole blood.
J. of Clinical Virology 40 (2007) 173-179.
- 10) Gouarin S, Vabret A, Scieux C, Agbalika F, Cherot J, Mengelle C, Deback C, Petitjean J, Dina J, Freymuth F.
Multicentric evaluation of a new commercial cytomegalovirus real-time PCR quantitation assay.
J Virol Methods. 2007 Dec;146(1-2):147-54.

Pósteres:

- 1) Sylvie Pillet, Thomas Bourlet, Bruno Pozzetto
Validation Of A New EasyMAG Protocol For Extraction Of Viral DNA From Whole Blood: Application To Cytomegalovirus DNA Load Monitoring
ESCV 2013.
- 2) Sylvie Pillet, Thomas Bourlet, Bruno Pozzetto
Validation of the combination of the QIASymphony extractor with the R gene kits for the quantification of viral DNA loads: application for cytomegalovirus and Epstein Barr virus DNA monitoring in whole blood specimens
ESCV 2013
- 3) Marie Gueudin, Alexandre Louvel, Jean-Christophe Plantier
Comparison of the EZ1 XL advanced and the Magna Pure instruments for the extraction of whole blood before DNA quantification of CMV, EBV, HHV 6 and Adenovirus
ESCV 2013.
- 4) Matthieu Vignoles, Marina Bertrand, Maryse Touchard, Séverine Moutin, Audrey Guichard, Audrey Maingue; Carole Vachon, Aurélie Brion, Karen Brengel-Pesce
Improvement of NucliSENS easyMAG whole blood extraction protocol for virus
CVS 2013.

7084

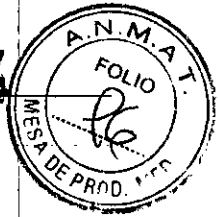


- 5) Vignoles M.; Barranger N.; Bertrand M.; Raoux N.; Magro S.; Barranger C.; Joannes M.
CMV R-gene® real time PCR assay and the 1st WHO International Standard for CMV: Standardization of PCR techniques
Poster 14th annual meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira, 2011
- 6) S. Alain , B. Boyer , M. Vignoles , M. Joannes, C. Barranger , M-C Ploy
Evaluation of CMV R-gene PCR (Argene) coupled with easyMAG® Biomérieux extraction for CMV viral load quantification in amniotic fluid.
CMV Workshop Nüremberg 2011.
- 7) Bubba L, Binda S, Gambino M, Mammoliti A, Pellegrinelli L, Primache V and Barbi M.
Use of a commercial Real-time PCR (Argene) for the detection of CMV-DNA in Dried saliva Swabs (DSS) eluted in molecular biology grade water
ESCV Madeira 2011
- 8) Gambino M, Bubba L, Binda S, Mammoliti A, Pellegrinelli L, Primache V and Barbi M.
Preliminary study of a Real-time PCR analysis for detecting CMV-DNA on Dried Saliva Swab (DSS)
ESCV Madeira 2011
- 9) Germe R, Beyls N, Quetant S, Aribert S, P Bourgeois, Seigneurin JM, Morand P
Measurement of HSV1, CMV, HHV6 and EBV viral loads in 83 bronchoalveolar lavage from lung transplant recipients.
ESCV Madeira 2011.
- 10) Derya Mutlu, Vedat Uygun, Aydan Karagul, Gulsun Tezcan, Hatice Yazisiz, Volkan Hazar, Dilek Colak
Surveillance of CMV and HHV-6 infections in pediatric allogeneic stem cell transplant recipients
ESCV 2009 (Istanbul, Turkey)
- 11) B. Rozé, MC. Legrand, S. Ansart, M. Garré, M. Diserbo, L. De Parscau, C. Payan
HHV6 encephalitis in immunocompetent patients : is it a myth?
CVS 2009 (Daytona Beach, USA)
- 12) Dilek Colak, Mediha Kazık, Derya Mutlu, Vedat Uygun, Aydan Karagul, Volkan Hazar
Assessment of CMV load in hematopoietic stem cell transplant recipients by CMV antigenemia and two different real-time PCR assays
ESCV 2009 (Istanbul, Turkey)
- 13) Pillet S., Bourlet T. and Pozzetto B.
Comparative evaluation of the NucliSENS easyMAG® automated system for the extraction of viral DNA from whole blood samples : application to the monitoring of CMV and EBV
ECCMID 2008 (Barcelona, Spain)
- 14) Marque-Juillet S., Touzard A., Fernand-Laurent C., Therby A., Rigaudeau S., Harzic H.
Evaluation de la quantification du CMV dans le sang par le test de PCR en temps réel CMV R-gene
RICA1 2008 (Paris, France)
- 15) Sentilhes A.C., Jeulin H., Nessali A., Duval R.E., Fortier B.
Comparison of in-house real time PCR vs. CMV HHV-6, 7, 8 R-gene® kit for determination of herpesviruses viral load.
Poster CMV Workshop 2007 (France).
- 16) Leruez-Ville, Couloigner, Marlin, Galimand, Ducroux, Vauloup, Keros.
Mise au point de la quantification de l'ADN du CMV par PCR à partir du sang prélevé sur carte de Guthrie: application au diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à CMV chez des enfants présentant une surdité d'origine génétique.
Journées Francophones de Virologie 2007 (France).
- 17) F. Zhang and C. C. Ginocchio.
Performance Evaluation of the Argene BioSoft CMV HHV-6, 7, 8, R-gene Assay.
Poster CVS 2007.
- 18) Bes J., Magro S., Grossiord C., Vignoles M., Barranger C. and Joannes M.
Development of a new diagnostic tool for the quantitative detection of CMV and HHV-6 DNA and a qualitative detection of HHV-7 and HHV-8 DNA.
Poster CVS 2007.







18. Productos anexos

- Colour Compensation r-gene® ref.: 71-103
- CELL Control r-gene® ref.: 71-106

7084



19. Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fabricante
	Límite de temperatura
	Fecha de caducidad
	Código de lote
	Consulte las instrucciones de uso
	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Conservar protegido de la luz
	Fecha de fabricación

E

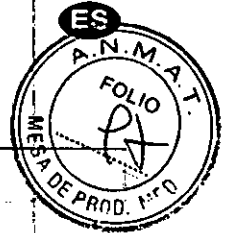
E. Eduardo Peiuffo
 bioMérieux Argentina SA
 APODERADO
 DNI 28.167.514

[Handwritten signature]

~~Dra. Rosana Labat~~
 Directora Técnica
 bioMérieux Argentina S.A.

[Handwritten signature]

7084



20. Historial de revisión

Cambio de tipo de categoría

N/A

No aplicable (primera publicación)

Corrección

Corrección de anomalías de documentación

Cambio técnico

Adición, revisión o eliminación de información asociada a un sistema o subsistema

Administrativo

Implantación de cambios que no son de carácter técnico y que el usuario puede observar

Nota:

Las modificaciones de poca importancia en la tipografía, la gramática y el formato no se incluyen en el historial de revisiones.

Fecha de lanzamiento	Número de pieza	Tipo de cambio	Resumen de cambios
2015/03	20841D	Administrativo	Creación del historial de revisión Composición del kit, Peligros y normas de seguridad, Tabla de símbolos
2015/09	20841E	Administrativo	Composición del kit y condiciones de conservación Peligros y normas de seguridad
		Cambio técnico	Principio del test Gama de estándares y controles Protocolo de extracción de muestras Protocolo de detección y de cuantificación en tiempo real Análisis de los resultados Validación e interpretación de los resultados Eficiencia Modificación de la temperatura de almacenamiento

BIOMERIEUX, el logo azul, ARGENE, R-GENE, EASYMAG y NucliSENS son marcas utilizadas, depositadas y/o registradas pertenecientes a bioMérieux o a cada una de sus filiales o a cada una de sus sociedades.

Productos como "QIAamp Kits" y "HotStar Taq" cuentan con licencia para su uso en aplicaciones virológicas de tecnología patentada, propiedad de QIAGEN GmbH y son marcas registradas de QIAGEN.

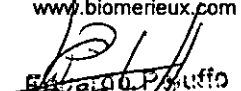
Cualquier otro nombre o marca registrada pertenece a su propietario correspondiente.



 bioMérieux SA
376 Chemin de l'Orme
69280 Marcy-l'Etoile - France

RCS LYON 673 620 399
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com




Eduardo Posutto
bioMérieux Argentina SA
APODERADO
BNI 28.167.514


Dra. Rosana Labat
Directora Técnica
bioMérieux Argentina S.A.

