



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

DISPOSICIÓN Nº - **11039**

BUENOS AIRES, **07 OCT 2016**

VISTO el expediente Nº 1-47-3110-952/16-1 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma BIOARS S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in vitro" denominado CMV DNA QUANTITATION (QT) 2ª GENERACIÓN/ ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL DE SEGUNDA GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL ADN DE CITOMEGALOVIRUS EN MUESTRAS HUMANAS (SANGRE, PLASMA Y LÍQUIDO AMNIÓTICO) .

Que a fojas 80 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 la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

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

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

A
E. A.



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

DISPOSICIÓN N° 11039

Por ello;

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

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del producto de diagnóstico para uso in Vitro denominado CMV DNA QUANTITATION (QT) 2ª GENERACIÓN/ ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL DE SEGUNDA GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL ADN DE CITOMEGALOVIRUS EN MUESTRAS HUMANAS (SANGRE, PLASMA Y LÍQUIDO AMNIÓTICO) en envases que se detallan en el Anexo, con una vida útil de DOCE (12) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre 2-8 °C ; el que será elaborado por DIA. PRO. Diagnostic Bioprobes Srl. Via G. Carducci n°27. 20099 Sesto San Giovanni. Milán. (ITALIA) e importado terminado por la firma BIOARS S.A. y que la composición se detalla a fojas 22.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 44 a 76. Desglosándose fojas 48 a 52 y 59 a 64 debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los

Handwritten signature/initials



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

DISPOSICIÓN Nº **11039**

métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

EXPEDIENTE Nº 1-47-3110-952/16-1

DISPOSICIÓN Nº: **11039**

Fd


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



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

ANEXO

Expediente Nº 1-47-3110-952/16-1

PRODUCTO/USO: CMV DNA QUANTITATION (QT) 2ª GENERACIÓN/ ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL DE SEGUNDA GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL ADN DE CITOMEGALOVIRUS EN MUESTRAS HUMANAS (SANGRE, PLASMA Y LÍQUIDO AMNIÓTICO).

PRESENTACIÓN: ENVASES POR 25, 50, 100 Y 150 DETERMINACIONES, CONTENIENDO:

	25 DETERMINACIONES	50 DETERMINACIONES	100 DETERMINACIONES	150 DETERMINACIONES
MEZCLA MAESTRA (COMPONENTE A)	1 x 0.40 ml	1 x 0.825 ml	2 x 0.825 ml	3 x 0.825 ml
CEBADORES/SONDAS (COMPONENTE B)	1 vial liofilizado	2 viales liofilizados	4 viales liofilizados	6 viales liofilizados
AGUA GRADO MOLECULAR (COMPONENTE C)	2 x 1.50 ml	4 x 1.50 ml	5 x 1.50 ml	7 x 1.50 ml
CONTROL NEGATIVO (NTC)	1 x 1.50 ml	1 x 1.50 ml	1 x 1.50 ml	1 x 1.50 ml
ESTANDAR CUANTITATIVO (STD)	2 viales liofilizados	4 viales liofilizados	4 viales liofilizados	6 viales liofilizados
CONTROL INTERNO (IC)	1 vial liofilizado	2 viales liofilizados	4 viales liofilizados	6 viales liofilizados

DISPOSICION Nº: - **11039**

fd

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

TRIPPLICADO



11039

PROYECTO DE ROTULOS EXTERNOS

07 OCT 2016

Nombre del producto:

CMV DNA QUANTITATION (QT) 2nd Generation

25 pruebas



0000-00

0000-00

$\Sigma = 25$

CMV DNA QT 2G CE 25IS

CMV DNA

Quantitation 2nd Generation

LOT 0000

REF: CMVDNAQT.2G.CE.26



Dia.Pro Diagnostic BioProbes srl
Via Carducci, 27 - 20128 Sesto San Giovanni (MI) Italy
Tel: +39 02 27007181 Fax: +39 02 26207728
e-mail: info@diapro.it



0318

CMV DNA Quantitation 2nd Generation
Reagents/Reagent/Reactifs
Reagenzien/Reactivos/Reagentes

COMPONENT A	(A)	n° 1	0.40 ml
COMPONENT B	(B)	n° 1	lyoph.
COMPONENT C	(C)	n° 2	1.6 ml
NTC		n° 1	1.6 ml
STD		n° 2	lyoph.
INTERNAL CONTROL	(IC)	n° 1	lyoph.
LOT			mmaa

50 pruebas



0000-00

0000-00

$\Sigma = 50$

CMV DNA QT 2G CE 50IS

CMV DNA

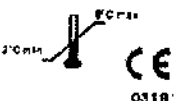
Quantitation 2nd Generation

LOT 0000

REF: CMVDNAQT.2G.CE



Dia.Pro Diagnostic BioProbes srl
Via Carducci, 27 - 20128 Sesto San Giovanni (MI) Italy
Tel: +39 02 27007181 Fax: +39 02 26207728
e-mail: info@diapro.it



0318

CMV DNA Quantitation 2nd Generation
Reagents/Reagent/Reactifs
Reagenzien/Reactivos/Reagentes

COMPONENT A	(A)	n° 1	0.825 ml
COMPONENT B	(B)	n° 2	lyoph.
COMPONENT C	(C)	n° 4	1.6 ml
NTC		n° 1	1.5 ml
STD		n° 4	lyoph.
INTERNAL CONTROL	(IC)	n° 2	lyoph.
LOT			mmaa

100 pruebas



0000-00

0000-00

$\Sigma = 100$

CMV DNA QT 2G CE 100IS

CMV DNA

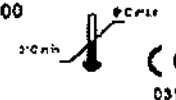
Quantitation 2nd Generation

LOT 0000

REF: CMVDNAQT.2G.CE.100



Dia.Pro Diagnostic BioProbes srl
Via Carducci, 27 - 20128 Sesto San Giovanni (MI) Italy
Tel: +39 02 27007181 Fax: +39 02 26207728
e-mail: info@diapro.it



0318

CMV DNA Quantitation 2nd Generation
Reagents/Reagent/Reactifs
Reagenzien/Reactivos/Reagentes

COMPONENT A	(A)	n° 2	0.825 ml
COMPONENT B	(B)	n° 4	lyoph.
COMPONENT C	(C)	n° 6	1.5 ml
NTC		n° 1	1.5 ml
STD		n° 4	lyoph.
INTERNAL CONTROL	(IC)	n° 4	lyoph.
LOT			mmaa

DIA. PRO DIAGNOSTIC BIOPROBES S.R.L.
DIRECTOR TECNICO

150 pruebas



0000-00: 0000-00



$\Sigma = 150$

11039

CMVONAQT.2G.CE.150A

CMV DNA

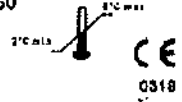
Quantitation 2nd Generation

LOT 0000

REF: CMVONAQT.2G.CE.160



Dia.Pro Diagnostic Bioprobes srl
Via Carducci, 27 - 20099 Sesto San Giovanni (Mi) Italy
Tel.: +39 02 27037181 Fax: +39 02 2609721
www.dia.pro



CMV DNA Quantitation 2nd Generation

Reagents/Reagenti/Reactifs
Reagenzien/Reactivos/Reagentes

COMPONENT A	(A)	n° 3	0.825 ml,
COMPONENT B	(B)	n° 6	lyoph.
COMPONENT C	(C)	n° 7	1.6 ml
NTC		n° 1	1.6 ml
STD		n° 6	lyoph.
INTERNAL CONTROL	(IC)	n° 8	lyoph.
			LOT mmaq

Establecimiento Elaborador: Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l. – Via G. Carducci, 27 - 20099 Sesto S. Giovanni (Mi) Italia.
Establecimiento Importador BIOARS S.A. – Estomba 961/965 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. Certificado N°

CMV DNA QUANTITATION (QT) 2nd Generation; Producto Dia.Pro Diagnostic BioProbes S.r.l.

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO

ORIGINAL

-11039

PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

Nombre del producto:

CMV DNA QUANTITATION (QT) 2nd Generation

25 pruebas	
<p>Mezcla maestra</p> <p>Dia.Pro srl A 0.400 ml</p> <p>mm-aa LOT mmaa</p> <p>2°C min 18°C min ALL/MLA</p>	<p>Cebadores/sondas liofilizados</p> <p>Dia.Pro srl CMV DNA QT B 60 µl</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>2°C min 18°C min CMVCB</p>
<p>Agua grado molecular</p> <p>G 1.5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>25°C min 18°C min ALLAC</p>	<p>Control negativo</p> <p>Dia.Pro srl NTC 1.5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>2°C min 18°C min ALL/NTC</p>
<p>Estándar cuantitativo liofilizado</p> <p>STD 300 µl</p> <p>0000-00 LOT 0000/30</p> <p>2°C min 18°C min CMVSTD</p>	<p>Control interno liofilizado</p> <p>ALLIC 500 µl</p> <p>2019-07 LOT 0715</p> <p>2°C min 18°C min ALLAC</p>

50 pruebas	
<p>Mezcla maestra</p> <p>Dia.Pro srl A 0.825 ml</p> <p>mm-aa LOT mmaa</p> <p>2°C min 18°C min ALL/MLA</p>	<p>Cebadores/sondas liofilizados</p> <p>Dia.Pro srl CMV DNA QT B 60 µl</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>2°C min 18°C min CMVCB</p>

CMV DNA QUANTITATION (QT) 2nd Generation; Producto Dia.Pro Diagnostic BioProbes S.r.l.

[Signature]
[Signature]
BIOARS S.A.
BIOQ CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TÉCNICO

- 11039

<p>Agua grado molecular</p> <p>Dia.Pro srl C 1,5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>-35°C min / +8°C max ALLIC</p>	<p>Control negativo</p> <p>Dia.Pro srl NTC 1,5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>-35°C min / +8°C max ALL/NTC</p>
<p>Estándar cuantitativo liofilizado</p> <p>Dia.Pro srl CMV DNA QT STD 300l</p> <p>0000-00 LOT 0000/30</p> <p>-20°C min / +8°C max CMVSTD</p>	<p>Control interno liofilizado</p> <p>Dia.Pro srl ALLIC 500-µl</p> <p>2019-07 LOT 0715</p> <p>-20°C min / +8°C max ALLIC</p>

100 pruebas	
<p>Mezcla maestra</p> <p>Dia.Pro srl A 0.825 ml</p> <p>mm-sa LOT mmas</p> <p>-20°C min / +8°C max ALL/MA</p>	<p>Cebadores/sondas liofilizados</p> <p>Dia.Pro srl CMV DNA QT B 60 µl</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>-20°C min / +8°C max CMV/CB</p>
<p>Agua grado molecular</p> <p>Dia.Pro srl C 1,5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>-35°C min / +8°C max ALLIC</p>	<p>Control negativo</p> <p>Dia.Pro srl NTC 1,5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>-35°C min / +8°C max ALL/NTC</p>
<p>Estándar cuantitativo liofilizado</p> <p>Dia.Pro srl CMV DNA QT STD 300l</p> <p>0000-00 LOT 0000/30</p> <p>-20°C min / +8°C max CMVSTD</p>	<p>Control interno liofilizado</p> <p>Dia.Pro srl ALLIC 500-µl</p> <p>2019-07 LOT 0715</p> <p>-20°C min / +8°C max ALLIC</p>

CMV DNA QUANTITATION (QT) 2nd Generation; Producto Dia.Pro Diagnostic BioProbes S.r.l.

[Signature]

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVEZ
DIRECTOR TECNICO

150 pruebas	
<p>Mezcla maestra</p> <p>Dia.Pro srl</p> <p>A 0.826 ml</p> <p>mm-aa LOT mmas</p> <p>7°Cm 18°Cm ALLAME4</p>	<p>Cebadores/sondas liofilizados</p> <p>Dia.Pro srl</p> <p>CMV DNA QT</p> <p>B 60 µl</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>7°Cm 18°Cm CMVQB</p>
<p>Agua grado molecular</p> <p>Dia.Pro srl</p> <p>C 1.5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>7°Cm 18°Cm ALLC</p>	<p>Control negativo</p> <p>Dia.Pro srl</p> <p>NTC 1,5 ml</p> <p>0000-00 LOT 0000</p> <p>7°Cm 18°Cm ALLNVC</p>
<p>Estándar cuantitativo liofilizado</p> <p>STD 300U</p> <p>0000-00 LOT 0000130</p> <p>7°Cm 18°Cm CMVSTD</p>	<p>Control interno liofilizado</p> <p>Dia.Pro srl</p> <p>ALLIC 600U</p> <p>2018-07 LOT 0715</p> <p>7°Cm 18°Cm ALLIC</p>

Establecimiento Elaborador: Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l. – Via G. Carducci, 27 - 20099 Sesto S. Giovanni (Mi) Italia.
 Establecimiento Importador BIOARS S.A. – Estomba 961/965 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires
 Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028
 Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. Certificado N°

CMV DNA QUANTITATION (QT) 2nd Generation; Producto Dia.Pro Diagnostic BioProbes S.r.l.



BIOARS S.A.
 BIOQ CLAUDIA ETCHÉVES
 DIRECTOR TÉCNICO

ORIGINAL



11039

CMV DNA QUANTITATION (QT)

2ª Generación

**PCR en tiempo real
para la cuantificación del
genoma del CMV**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro" -



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia

Teléfono +39 02 27007161
Fax +39 02 26007726
e-mail: info@diapro.it

REF. CMVDNAQT.2G.CE
25/50/100/150 pruebas

1

[Handwritten Signature]
S.C.A.R.S. S.p.A.
B.O.Q. CLAUDIA ETC. ETC.
DIRECTOR TÉCNICO

ADN DE CMV

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

El equipo PCR en tiempo real de segunda generación para cuantificación (QT) de ADN del CMV, código CMVDNAQT.2G.CE, está diseñado para la detección cuantitativa de ADN del citomegalovirus en muestras humanas (sangre, plasma, líquido amniótico) con control simultáneo de la reacción de extracción/amplificación mediante un control interno (IC). El ensayo CMVDNAQT.2G.CE se ha normalizado según la 1ª Norma Internacional de la OMS para HCMV (NIBSC código 09/162) con el fin de expresar también la concentración de las muestras en unidades internacionales (IU/ml).

El equipo se ha adaptado para el uso en termocicladores Real-Time y ABI 7500 Sequence Detection System® (software SDS, versión 1.3.1, Applied Biosystems™), MiniOpticon® (software CFX manager, versión 1.6, Biorad™), MX3000P (software MxPro, versión 4.01, Stratagene™) o CFX96 (Software CFX manager versión 1.7, Biorad™).

* Applied Biosystems es una marca comercial registrada y ABI PRISM® es una marca comercial de Applied Biosystems Corporation o sus filiales en EE.UU. y/o en otros países determinados.

** Biorad es una marca comercial registrada

***Stratagene es una marca comercial registrada.

B. INTRODUCCIÓN.

El citomegalovirus humano (HCMV) es un miembro ubicuo de la familia de herpesvirus humanos.

Los datos clínicos indican que el HCMV infecta varios tipos de tejidos y células y, por lo tanto, es responsable de numerosas complicaciones clínicas. Dependiendo del tipo de tejido y del estado inmunológico del huésped, el HCMV participa en tres modos distintos de infección: infecciones agudas con un crecimiento altamente productivo, infecciones persistentes con bajos niveles de replicación e infecciones latentes en las que no se produce progenie viral. El mecanismo de reactivación es desconocido en gran parte, pero parece estar muy relacionado con el control inmune deteriorado del virus. Por esta razón, el CMV es uno de los patógenos oportunistas más comunes que complican el cuidado de los receptores de trasplantes. Potencialmente, es una causa importante de morbilidad y mortalidad.

Con un genoma de ADN lineal de doble cadena de >230 kb, el HCMV es el mayor miembro de la familia de herpesvirus humanos.

Dentro de la familia, el HCMV es el prototipo del subgrupo herpesvirus b, que incluye los herpesvirus 6 y 7.

El tratamiento de la enfermedad del CMV con medicamentos antivirales específicos, como ganciclovir y foscarnet, reduce la gravedad de la enfermedad y la mortalidad en estos pacientes. Se han desarrollado estrategias antivirales profilácticas y preventivas con el objetivo de evitar el tratamiento agresivo de la enfermedad establecida en el órgano afectado.

La cuantificación de la carga viral de ADN de CMV define de forma específica la progresión de la enfermedad. Los ensayos basados en PCR en tiempo real pueden cuantificar el ADN viral de forma precisa y sin el manejo de una muestra post-PCR, proporcionando resultados rápidos y un riesgo realmente bajo de contaminación cruzada para la muestra en evaluación.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El equipo CMVDNAQT.2G.CE se basa en una química en tiempo real que utiliza cebadores y sondas específicas.

El ADN de CMV, recuperado de una muestra biológica en investigación en una fase de extracción, se amplifica utilizando un sistema de amplificación en tiempo real. El producto amplificado se detecta y se cuantifica comparándolo con la curva estándar, utilizando una sonda con tinte indicador fluorescente específica para una secuencia genómica única del CMV.

El Control Interno (IC) heterólogo sirve como control de extracción/amplificación para cada muestra procesada individualmente con el fin de identificar inhibidores de la reacción.

Se suministra una curva estándar que permite la determinación de la carga viral.

D. COMPONENTES

El formato estándar del producto, código CMVDNAQT.2G.CE, contiene reactivos suficientes para realizar 50 pruebas.

Componente	Contenido	CMVDNAQT.2G.CE 50 reacciones
A CÓDIGO: ALL/MM4 CÓDIGO COLOR: TRANSPARENTE	Mezcla maestra	Viales n.º 1 / 0,825 ml
B CÓDIGO: CMV/CB CÓDIGO COLOR: AMARILLO	Cebadores/sondas liofilizadas	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
C CÓDIGO: ALL/C CÓDIGO COLOR: GRIS	Agua grado molecular	Viales n.º 4 / 1,5 ml
NTC CÓDIGO: ALL/NTC CÓDIGO COLOR: BLANCO	Control negativo	Viales n.º 1 / 1,5 ml
STD Estándar de cuantificación (6×10^6 copias/ μ l or 6.0×10^4 IU/ μ l) CÓDIGO: CMV/STD CÓDIGO COLOR: ROJO	Estándar cuantitativo liofilizado	Viales n.º 4 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
IC Control Interno CÓDIGO: ALL/IC CÓDIGO COLOR: VERDE	Control interno liofilizado	Viales n.º 2 (Disolver con el volumen de ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
Manual de instrucciones	Instrucciones de uso	1

Nota importante: A petición, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 25, 100, 150 pruebas, como se indica a continuación:

	25	100	150
Número de pruebas	25	100	150
Código	CMVDNAQT.2G.CE.25	CMVDNAQT.2G.CE.100	CMVDNAQT.2G.CE.150



Doc.: INS CMVDNAQT.2G.CE/esp	Página 3 de 10	Rev.: 0	Fecha: 07/2013
------------------------------	----------------	---------	----------------

E. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El equipo CMVDNAQT.2G.CE debe almacenarse a +2...8 °C. Una vez disueltos, el **Componente B** (código CMV/CB) y el **Componente IC** (código ALL/IC) se mantienen estables durante 1 mes a -20 °C. Una vez disuelto, el **Componente STD** (código CMV/STD) se mantiene estable durante 2 semanas a -20 °C. Si los componentes se van a utilizar solo de forma intermitente, deberían congelarse en alícuotas. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos. Solo se permite descongelar una vez.

F. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (0,5 µl < volumen < 1000 µl)
2. Equipo de extracción de ADN
3. MG EtOH
4. Bloque térmico
5. Microcentrifuga
6. Racks para tubos
7. Puntas filtradas estériles con barrera contra aerosoles
8. Microtubos libres de nucleasa
9. Microtubos de 0,2 ml o microplacas PCR recomendados por los fabricantes de los instrumentos PCR en tiempo real
10. Guantes desechables, sin polvo
11. Termociclador Real-Time PCR (*)
12. Papel absorbente.
13. Vórtex o similar.

(*) **Atención:** Se debe realizar de forma rutinaria una calibración válida de los tintes puros (archivo del componente del espectro puro) y del fondo (archivo del componente de fondo)

G. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo sólo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe tener una amplia formación en el uso de termocicladores Real-Time, en la manipulación de reactivos para biología molecular y en los protocolos de amplificación de PCR en tiempo real.
3. El equipo debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en este campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada del laboratorio, guantes sin polvo y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
6. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire.
7. Los componentes A y B son sensibles a la luz. Protegerlos de la exposición a la luz intensa.
8. Evitar vibraciones de la superficie de la mesa de trabajo donde se realiza la prueba.
9. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2,8 °C en un refrigerador o en una cámara de refrigeración con control de temperatura.
10. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
11. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
12. Evitar contaminación cruzada entre muestras usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
13. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.

14. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase externo.
15. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Todas las muestras de sangre/plasma/líquido amniótico humanos deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de control de enfermedades de Atlanta, EE.UU., y de conformidad con lo publicado por los Institutos nacionales de la salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
16. Almacenar y extraer las muestras separadas de los demás reactivos y usar un espacio separado para su manipulación
17. Disolver los reactivos liofilizados con la cantidad correcta (indicada en las etiquetas) de componente C (código: ALL/C) suministrado con el equipo.
18. Llevar a cabo todas las operaciones lo más rápido posible, manteniendo los componentes en hielo o en un bloque de refrigeración.
19. El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, comenzando en la zona de extracción y avanzando hasta la zona de amplificación y de análisis de datos. No devolver las muestras, equipos o reactivos a la zona donde se hayan realizado las fases anteriores.
20. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los componentes a los diferentes equipos automatizados para evitar contaminación cruzada.
21. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. Especialmente, los desechos líquidos procedentes de los procedimientos de extracción de muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y deben ser inactivados antes de su eliminación. No poner en contacto con lejía los desechos de la extracción.
22. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
23. Otros materiales de desecho generados (por ejemplo: puntas usadas para las muestras) deben ser manipulados como potencialmente infecciosos y deben eliminarse de acuerdo con las directivas y leyes nacionales sobre los residuos de laboratorio.

H. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínicos.
2. La recogida del líquido amniótico debe realizarse después de 16 semanas desde el inicio de la gestación, bajo control de ultrasonido continuo, siguiendo las pautas clínicas establecidas y aprobadas.
3. No se ha observado ninguna influencia debida a la preparación de la muestra con citrato o EDTA
Atención: La heparina (>10 IU/ml) afecta a las reacciones de PCR. Las muestras recogidas en tubos que contengan heparina como anticoagulante no deben usarse. Por lo tanto, las muestras de pacientes heparinizados no deben usarse.
4. Evitar cualquier adición de conservantes a las muestras.
5. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados.
6. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
7. El plasma y el líquido amniótico, si no se usan inmediatamente, deben almacenarse a una temperatura de -20 °C a -80 °C tras la extracción. Las muestras pueden almacenarse a -80 °C durante varios meses. Las muestras congeladas no se deben descongelar más de una vez, ya que podría afectar al resultado de la prueba.
8. Las muestras de plasma para extracción de ADN deben recogerse en EDTA, de acuerdo con los procedimientos comunes del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un periodo máximo de 4 horas. Las muestras

E.

D. O. O. DIRECTOR TECNICO

de plasma pueden almacenarse a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos.

9. Las muestras de líquido amniótico deben centrifugarse antes de la extracción de ADN y disolverse en PBS, de acuerdo con los procedimientos comunes del laboratorio. Las muestras de líquido amniótico deben transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un máximo de 4 horas. Las muestras de líquido amniótico pueden almacenarse a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos.

10. Para un almacenamiento óptimo de las muestras, recomendamos dividir las en varias alícuotas (volumen mínimo 300 µl) y almacenarlas a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C para períodos más largos. Evitar ciclos de congelación/descongelación repetidos.

11. Al utilizar muestras congeladas, descongelar las muestras justo antes de la fase de extracción para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

12. Las muestras de sangre periférica para extracción de ADN deben recogerse en EDTA, de acuerdo con las indicaciones del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 3 días. No congelar todas las muestras de sangre periférica para evitar lisis celular y pérdida de título viral.

I. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Mezcla maestra:

Componente A. Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar y centrifugar brevemente para recoger el volumen completo.

ADVERTENCIA: El componente A es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Cebadores/Sondas:

Componente B.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el componente B liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

ADVERTENCIA: El componente B es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Agua grado molecular:

Componente C. Listo para el uso.

Control negativo:

NTC. Listo para el uso.

Curva estándar:

STD.

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el STD liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial
- Mantener en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex
- Preparar los viales libres de nucleasa para la preparación de la curva estándar
- Establecer una dilución de serie STD 1:10 en el componente C (código: ALL/C) para obtener los puntos de la curva estándar, como se describe en la siguiente tabla:

Preparación de la curva estándar		
STD	Calibrador 60000 copias/ µl o 60000 IU/µl *	Añadir el volumen de componente C (código: ALL/C) como se indica en la etiqueta del vial
STD 1	6000 copias/ µl o 6000 IU/µl *	10 µl (STD) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)
STD 2	600 copias/ µl o 600 IU/µl *	10 µl (STD 1) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)
STD 3	60 copias/ µl o 60 IU/µl *	10 µl (STD 2) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)
STD 4	6 copias/ µl o 6 IU/µl *	10 µl (STD 3) + 90 µl de componente C (Código: ALL/C)

*Calibrado según la 1ª Norma Internacional de la OMS (NIBSC código 09/162)

Control interno:

IC

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 11000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver de forma homogénea el IC liofilizado con el volumen de componente C (código: ALL/C) indicado en la etiqueta del vial.
- Mantener en la parte superior de la mesa de trabajo durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C)
- Mezclar brevemente con un vórtex

L. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las micropipetas deben calibrarse y deben someterse a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 5%.
2. **Dispositivo de extracción:** El equipo CMVDNAQT.2G.CE está diseñado para utilizarse en combinación con QIAamp DNA Minikit, código 51306 (QIAGEN), y Nucleospin Blood kit, código 740951 (Macherey Nagel), exclusivamente; también puede utilizarse con el instrumento de extracción automática DIA.FASTEX, NA Body Fluid Kit, código D2021 (Dia.Pro es distribuidor de Chemagen), y el instrumento de extracción automática nucliSENSeasyMAG. Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por los fabricantes. Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por los fabricantes.
3. **Termocicladores Real-Time y software de los instrumentos.** El equipo CMVDNAQT.2G.CE ha sido diseñado para usarse solo con los termocicladores Real Time ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01

(Stratagene), MiniOpticon, software CFX manager, versión 1.6 (Biorad) y CFX96 RTS, software CFX manager versión 1.7 (Biorad).
Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso de los instrumentos suministradas por los fabricantes.

M. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados observables a simple vista. Comprobar que en la parte inferior de los viales de los componentes liofilizados haya un agregado bien formado. Comprobar que no se han producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.
3. Disolver los componentes liofilizados con la cantidad adecuada de componente C (código: ALLUC) como se describe en la sección correspondiente (H).
4. Encender los termocicladores, comprobar la configuración y asegurarse de que se usa el protocolo de ensayo correcto.
5. Seguir estrictamente los manuales de los instrumentos suministrados por los fabricantes para la configuración correcta de los termocicladores Real-Time.
6. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en los volúmenes requeridos.
7. Comprobar que el resto del equipamiento esté disponible y listo para usarse.
8. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

N. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con lo indicado a continuación.

N.1 Extracción de ADN

La fase de extracción del ADN genómico de CMV debe realizarse exclusivamente en combinación con los siguientes equipos:

Herramientas para extracción manual

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
Plasma/sangre/líquido amniótico	Nucleospin Blood	740951	MN™
Plasma/sangre/líquido amniótico	QIAamp DNA mini kit®	51306	Qiagen™

Herramienta para extracción automática

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante	Instrumento
Plasma/sangre/líquido amniótico	NA Body Fluid Kit	D-2021	Chemagen distribuido por Dia.Pro	DIA.FASTEX

Nota: Antes del aislamiento de ADN, centrifugar las muestras de líquido amniótico (10.000 g, 5 minutos), retirar el sobrenadante y disolver el precipitado en 200 µl de PBS estéril.

Muestra	Protocolo	Soluciones	Código	Fabricante	Instrumento
Sangre	Protocolo general	Tampón de lisis NucliSENS	200292	Blomérieux	NucliSENS easyMAG
		Tampón de lisis NucliSENSe easyMAG	280134		
		Tampón de extracción NucliSENSe easyMAG 1	280130		
		Tampón de extracción NucliSENSe easyMAG 2	280131		
		Tampón de extracción NucliSENSe easyMAG 3	280132		
		Silice magnética NucliSENSe easyMAG	280133		

El aislamiento de ADN solo debe realizarse de acuerdo con el manual de instrucciones (QIAGEN™, MN™, Dia.Pro, Blomérieux).

Nota importante: los siguientes volúmenes deben usarse estrictamente en los procedimientos de extracción:

Descripción	Volumen muestra (µl)	Volumen elución (µl)
Nucleospin Blood	200	100
QIAamp DNA mini kit®	200	100
NA Body Fluid Kit	200	100
NucliSENS easyMAG System (Protocolo general)	100	55

El ADN extraído de las muestras, no usado en la serie, debe almacenarse congelado (de -20 °C a -80 °C).

Nota importante: el IC del equipo CMVDNAQT.2G.CE puede usarse en el procedimiento de aislamiento como control de extracción.

El valor Ct del control interno se usa para evaluar si el procedimiento de extracción de ADN se ha realizado correctamente (véase el apartado Q).

Para esta aplicación

- Nucleospin Blood y QIAamp DNA mini kit : añadir 5 µl de IC a la mezcla de tampón de lisis y muestra, y proceder siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante del equipo de extracción.

- NA Body Fluid Kit : añadir 5 µl de IC a la muestra (protocolo de sangre) o a la mezcla de tampón de lisis y muestra (protocolo de plasma), y proceder siguiendo las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante del equipo de extracción.

- Sistema NucliSENSeasyMAG: Añadir 5 µl de IC a la muestra tras la lisis y antes de añadir la silice (protocolo general); también es posible añadir 55 µl de IC directamente al tubo de silice (550 µl de silice+550 µl de H2O) y dispensar 100 µl de la mezcla en las muestras.

[Firma]
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA BACHEVAL
DIRECTOR TÉCNICO

Proceder según las instrucciones del manual proporcionado por el fabricante del equipo de extracción.

N.2 Configuración de la reacción

El equipo CMVDNAQT.2G.CE ha sido diseñado para usarse solo con ABI 7500, software SDS, versión 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, software MxPro, versión 4.01 (Stratagene), CFX96 RTS, software CFX manager versión 1.7 (Biorad) y MiniOpticon, software CFX manager, versión 1.6 (Biorad).

N.2.1 Preparación de PCR

Importante: En la sección O se incluye un ejemplo de esquema de dispensación. Consúltelo antes de iniciar las operaciones que se describen a continuación.

- Preparar los componentes como se describe en la sección I ;
- Preparar el número requerido de tubos de reacción o una placa de reacción de 96 pocillos para las muestras en evaluación y para la curva estándar (preparada como se describe en la sección I).

Nota importante: Usar sólo tubos ópticos o microplacas sugeridos por los fabricantes de los termocicladores Real-Time.

- Tener en cuenta que las muestras deberían comprobarse en duplicado, siempre que sea posible;
- Incluir al menos 1 tubo para el NTC (control negativo)
- Preparar la **mezcla de amplificación** para muestras, NTC y curva estándar según la siguiente tabla:

Preparación de la mezcla de amplificación (IC como control de amplificación)

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	15 µl	180 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	24 µl
IC	Control Interno	0,5 µl	6 µl
C	Agua grado molecular	2,5 µl	30 µl
Vol. total		20 µl	240 µl

Nota importante: Si el control interno se añadió durante el procedimiento de aislamiento del ADN, preparar la **mezcla de amplificación** para muestras, NTC y curva estándar según la siguiente tabla:

Preparación de la mezcla de amplificación (IC como control de extracción/amplificación)

Número de reacciones		x1	x12
A	Mezcla maestra	15 µl	180 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	24 µl
C	Agua grado molecular	3 µl	36 µl
Vol. total		20 µl	240 µl

N.2.2 Procedimiento de amplificación

- Dispensar 20 µl de la mezcla de amplificación en cada tubo de reacción o pocillo de la microplaca
- Añadir 10 µl de las **muestras, NTC y curva estándar** a los tubos de reacción.
- Cerrar bien los tubos de reacción
- Centrifugar brevemente los tubos de reacción a 2000 rpm.
- No dejar los tubos de reacción a temperatura ambiente (RT) durante más de 30 minutos ni exponer a la luz (cubrir los tubos).
- Cargar los tubos en el soporte del bloque térmico del termociclador Real-Time.
- Tras las operaciones de configuración descritas en la sección N3 (Programación del instrumento), iniciar la serie del termociclador.

Nota importante: Los componentes liofilizados tras la disolución en componente C (código: ALL/C) no estarán estables más de 3 horas. Mantener en hielo o a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

Al final de la jornada laboral, desechar adecuadamente los materiales sobrantes de los puntos de dilución STD.

El volumen no utilizado de Componente B, STD y de IC puede congelarse a -20 °C y usarse como se indica en el apartado E.

N.3 Programación del instrumento

Para la programación del instrumento, consultar el manual de instrucciones del instrumento proporcionado por los fabricantes.

Nota importante: Para Mx3000P ajustar "Ajuste de ganancia del filtro": ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (véase el manual de instrucciones del software MxPro™ QPCR, pág. 41)

N.3.1 Perfil térmico

El **perfil térmico** se indica en la siguiente tabla:

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

NOTA IMPORTANTE: (*) fase para la adquisición de datos en tiempo real

ADVERTENCIA: Prestar atención para programar el termociclador Real-Time con el perfil térmico correcto siguiendo las instrucciones del manual del instrumento suministrado por el fabricante del instrumento.



N.3.2 Selección de los detectores

Seguendo los manuales de instrucciones de los termocicladores Real-Time sugeridos (ABI 7500, Biorad Miniopticon, BioRad CFX96 y MX3000P Stratagene), seleccionar los detectores indicados en la siguiente tabla:

Detección	Indicador	Templador
CMV	FAM	No fluorescente
Control Interno (IC)	JOE/VIC	No fluorescente
Referencia pasiva	ROX	No presente

ADVERTENCIA: Prestar atención para programar el termociclador Real-Time con la configuración correcta siguiendo las instrucciones del manual suministrado por el fabricante.

O. ESQUEMA DEL ENSAYO.

A continuación, se ofrece un ejemplo de esquema de dispensación para el análisis cuantitativo:

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

Leyenda: NTC = Control negativo STD 1,2,3,4 = Curva estándar de ADN de CMV. Muestra 1,2,3 = Muestras en evaluación.

P. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

P.1 Configuración pre-análisis

Antes de iniciar la interpretación de los datos:

- Ajustar la "línea de base" (nivel fluorescente del fondo) como se indica en la siguiente tabla:

"Línea de base"	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Línea de base automática
BIORAD™ MiniOpticon®	Línea de base automática
STRATAGENE™ MX3000P®	Línea de base adaptable Nota importante: No usar algoritmo Mx4000 v1.00 a v3.00
BIORAD™ CFX96®	Línea de base automática

- Ajustar manualmente el "Threshold" fluorescente FAM/JOE/VIC

"Threshold" fluorescente FAM	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0,15
BIORAD™ MiniOpticon®	0,08
STRATAGENE™ MX3000P®	0,15
BIORAD™ CFX96®	600

"Threshold" fluorescente JOE/VIC	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0,1
BIORAD™ MiniOpticon®	0,02
STRATAGENE™ MX3000P®	0,02
BIORAD™ CFX96®	200

P.2 Análisis de datos

Se realiza una comprobación en los calibradores STD cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores Ct son los esperados e indicados en la siguiente tabla:

ABI™PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®	
Comprobar FAM	Exigencia
STD 1	22,0 < Ct (Threshold Cycle) < 24,5
STD 2	25,5 < Ct (Threshold Cycle) < 28,5
STD 3	29,0 < Ct (Threshold Cycle) < 32,0
STD 4	32,0 < Ct (Threshold Cycle) < 35,5

BIORAD™ MiniOpticon® - BIORAD™ Dx RT System	
Comprobar FAM	Exigencia
STD 1	23,0 < Ct (Threshold Cycle) < 25,5
STD 2	26,5 < Ct (Threshold Cycle) < 29,5
STD 3	30,0 < Ct (Threshold Cycle) < 33,0
STD 4	33,0 < Ct (Threshold Cycle) < 36,5

Además, los valores de pendiente y R2 se comprueban para verificar la calidad de la serie. Se deben cumplir los siguientes requisitos.

Comprobar FAM	Exigencia
Pendiente	-3,1 < Pendiente < -3,9

Comprobar FAM	Exigencia
Eficiencia	R² > 0,98

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para cada muestra, se asume la fluorescencia FAM (valor Ct positivo/negativo) y la fluorescencia JOE/VIC del control interno para validar la detección de CMV, como se describe en la siguiente tabla:

CMV FAM	JOE/VIC del control interno	Resultado del ensayo
MUESTRA POSITIVA	20 < Ct < 40	CORRECTO
	Ct > 40 or Indeterminada	INVÁLIDO**
MUESTRA NEGATIVA	20 < Ct < 40	CORRECTO
	Ct > 40 or Indeterminada	INVÁLIDO**

* IMPORTANTE: Una concentración inicial alta de ADN de CMV (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.

** Pueden aparecer problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficiente o ausente) o durante la fase de extracción (presencia de inhibidores o muestra inicial con número insuficiente de células) que podrían dar lugar a resultados incorrectos. El

Handwritten signatures and stamps at the bottom of the page, including a signature and the text 'D.O. CLAUDIA... DIRECTOR TECNICO'.

procedimiento de prueba debe repetirse empezando desde la fase de extracción, utilizando una muestra fresca procedente del paciente.

Por cada muestra positiva detectada por el equipo con código CMVDNAQT.2G.CE, se puede aplicar una cuantificación correcta de la carga viral como se indica en las siguientes tablas:

DATOS ANALÍTICOS	DATOS DIAGNÓSTICOS
Datos de la serie CMV (copias/μl – IU/μl)	Carga viral de CMV (copias/ml – IU/ml)
Cantidad > 2,0E+05	Carga viral de CMV > 1,0E+08
1,0E+00 < Cant < 2,0E+05	CUANTIFICACIÓN
Cantidad < 1,0E+00	Carga viral de CMV < 5,0E+02

NOTA IMPORTANTE: Para la cuantificación de las muestras, consultar la sección R

Los resultados obtenidos con el equipo CMVDNAQT.2G.CE deben ser interpretados por el responsable del laboratorio, teniendo en cuenta los síntomas clínicos de los pacientes y los demás marcadores de infección del laboratorio.

Los siguientes resultados son posibles:

Tabla de solución de problemas

	FAM	JOE/VIC	Resultado	COMPROBAR
MUESTRA desconocida	+	+	RESULTADO CORRECTO <u>Positivo</u>	IMPORTANTE Una concentración inicial alta de ADN de CMV (señal FAM positiva) puede llevar a una señal fluorescente REDUCIDA del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.
MUESTRA desconocida	+/-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Inhibición, error en el procedimiento o mal funcionamiento de los instrumentos	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los límites de detección seleccionados sean FAM para la detección de CMV y JOE/VIC para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo; 7. que el procedimiento de extracción se haya realizado correctamente
MUESTRA desconocida	-	+	RESULTADO CORRECTO <u>Negativo</u>	
STD	+	+/-	RESULTADO CORRECTO	La señal JOE/VIC negativa solo es correcta cuando el control interno (IC) se utiliza como control de extracción.
STD	-	-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los límites seleccionados sean FAM para la detección de CMV y JOE/VIC para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente; 6. que ningún inhibidor PCR potencial haya contaminado el tubo;

STD	-	+	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que los límites de detección seleccionados sean FAM para la detección de CMV y JOE/VIC para la detección de IC; 4. que el análisis se haya realizado con la configuración correcta del instrumento; 5. que el equipo se haya almacenado correctamente;
NTC	-	+/-	RESULTADO CORRECTO	La señal JOE/VIC negativa solo es correcta cuando el control interno (IC) se utiliza como control de extracción.
NTC	+	+/-	¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación	1. que los componentes se hayan preparado correctamente; 2. que no se hayan cometido errores en el procedimiento de ensayo; 3. que el lugar de trabajo y los instrumentos se descontaminen a intervalos regulares; 4. que el equipo se haya almacenado correctamente

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Al transmitir los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.

Si los resultados de la prueba coinciden con los requisitos del RESULTADO DEL ENSAYO CORRECTO establecidos anteriormente, pasar a la siguiente sección.

Si aparecen uno o más de los problemas descritos en la tabla anterior, tras la comprobación, informar al supervisor de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

R. CUANTIFICACIÓN

Los calibradores STD se tratan como muestras del paciente y se usa el mismo volumen, 10 μl, durante la fase de amplificación. La concentración de los calibradores STD se expresa en copias/μl. La concentración del genoma viral por ml para cada muestra del paciente se calcula aplicando la siguiente fórmula:

Resultados (copias/ml) =

$$\frac{\text{copias/μl (datos de la serie)} \times \text{Volumen muestra de elución (μl)}}{\text{Volumen de extracción de muestras (ml)}}$$

Ejemplo:

$$\text{Resultados (copias/ml)} = \frac{1500 \times 100}{0.2}$$

$$\text{Resultados (copias/ml)} = 7,5 \text{ E}+05$$

Para convertir a IU/ml la carga viral de las muestras expresadas en copias/ml se utiliza un factor de conversión de 1,0.

$$\text{Resultados: } 1,0 \text{ copia/ml} = 1,0 \text{ IU/ml}$$

S. PRESTACIONES

La evaluación de los rendimientos se ha realizado de acuerdo con lo indicado en las Especificaciones técnicas internas (ITS).

La evaluación del rendimiento se llevó a cabo en laboratorios DiaPro con materiales suministrados por los laboratorios clínicos de referencia.

S.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica se puede expresar como **Límite de detección** y como **Límite de cuantificación**.

Límite de detección (LOD): es la cantidad mínima de sustancia que puede detectarse por el sistema con una probabilidad establecida.

Para las pruebas NAT se expresa como la concentración mínima del analito que, tras probarse en múltiples repeticiones, da un resultado positivo.

El **límite de detección (LOD)** se determina probando diluciones en serie que contienen concentraciones conocidas del analito.

El LOD es la concentración mínima de analito que puede detectarse de forma consistente (p. ej., en $\geq 95\%$ de las muestras en condiciones rutinarias del laboratorio).

Para el equipo CMVDNAQT.2G.CE el LOD se ha determinado probando diluciones en serie de 1:5 y 1:2 (8 réplicas en tres series distintas) de un plásmido que porta la secuencia viral meta.

Los resultados se analizaron mediante un análisis **Probit** para determinar el límite de detección en 95%.

Los resultados del análisis **PROBIT** son los siguientes:

Límite de detección (LOD) (p=0.05)	
BIORAD™ MiniOpticon®	0.50 copias/ µl
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.57 copias/ µl
STRATAGENE™ MX3000P®	0.62 copias/ µl
BIORAD™ Dx RT System®	0.85 copias/ µl

S.1.1 Límite de cuantificación

El **límite de cuantificación** se determinó midiendo la **linealidad**, el **rango dinámico** y la **reproducibilidad**.

La **linealidad** es la medida del grado en que una curva se aproxima a la línea recta. Se expresa con el valor **PENDIENTE**.

El **rango dinámico** es la extensión de concentraciones de analito para la que el valor de salida final (ciclo umbral Ct) del sistema es directamente proporcional a la concentración de analito, con confiabilidad y precisión aceptables.

Los límites del rango dinámico son los límites inferior y superior de cuantificación (**Límite de cuantificación**).

Para el equipo CMVDNAQT.2G.CE se preparó una curva de dilución límite de una muestra positiva para CMV con valores definidos en copias/ul. Los puntos de dilución se probaron en el sistema analítico y se determinaron sus Ct (ciclo umbral).

En el ensayo CMVDNAQT.2G.CE realizado con ABI 7500, Mx3000P, BioRadMiniOpticon y BioRad CFX96 se estableció un límite de cuantificación superior de $5.30 \log_{10}$ ($2.0E+05$ copias/ul) y un límite de cuantificación inferior de $0.00 \log_{10}$ ($1.0E+00$ copias/ul).

El rango dinámico se determinó con una dilución en serie del material calibrado según la 1ª Norma Internacional de la OMS para HCMV (NIBSC código 09/162).

En el ensayo CMVDNAQT.2G.CE realizado con ABI 7500, Mx3000P, BioRadMiniOpticon y BioRad CFX se estableció un límite de cuantificación superior de $6.70 \log_{10}$ ($5.0E+06$ IU/ml) y un límite de cuantificación inferior de $2.70 \log_{10}$ ($5.0E+02$ IU/ml). CMVDNAQT 2G.CE

S.2 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica es la capacidad de un método de detectar sólo la secuencia de ADN meta.

La especificidad analítica del ensayo de ADN de CMV se ha estudiado del siguiente modo:

1. El juego de cebador/sonda se ha elegido analizando la secuencia meta del genoma con un software adecuado (LionSoft v.1.0 suministrado por Biotools y Primer Express v.3.0 suministrado por Applied Biosystems Inc.).
2. El juego de cebador/sonda y la secuencia meta del genoma han sido controlados por el software "BLAST" para

comprobar si alguna de las secuencias nucleótidas depositadas en los bancos genómicos a nivel mundial tiene alguna homología con el CMV, y por el software "ClustalX" para comparar las secuencias meta del genoma de los distintos genotipos de CMV.

3. La especificidad se mejoró mediante la selección de condiciones de reacción estrictas.
4. Las muestras procedentes de pacientes con infecciones debidas a organismos que interfieren potencialmente se obtuvieron de un centro clínico de referencia y se comprobaron.

Los resultados se indican en la tabla siguiente:

Organism	Resultado
VZV	negativo
EBV	negativo
HHV6	negativo
HHV8	negativo
HSV1	negativo
HSV2	negativo

S.3. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

S.3.1. Especificidad diagnóstica:

La especificidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado negativo en ausencia del marcador meta. Así, la muestra **negativa verdadera** es una muestra conocida como negativa para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

Para estudiar este parámetro se analizaron 19 muestras de ADN en plasma negativas para CMV y 83 muestras de ADN en sangre entera negativas para CMV.

NEGATIVOS VERDADEROS	102
FALSOS POSITIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	102
ESPECIFICIDAD %	100

Tomando como base los resultados obtenidos, la **especificidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%**.

S.3.2. Sensibilidad diagnóstica

La **sensibilidad diagnóstica** es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en presencia del marcador meta. Así, la muestra **positiva verdadera** es una muestra conocida como positiva para el marcador meta y clasificada correctamente por el dispositivo.

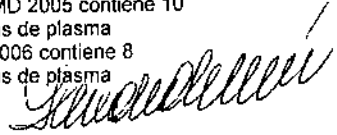
Para el equipo con código CMVDNAQT.2G.CE, este parámetro se estudió examinando 14 muestras de plasma y 28 muestras de sangre positivas de ADN de CMV.

Muestras positivas de ADN de CMV	
POSITIVOS VERDADEROS	42
FALSOS NEGATIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	42
SENSIBILIDAD %	100

Asimismo, se analizaron los paneles del citomegalovirus QCMD 2005 y QCMD 2006. El panel QCMD 2005 contiene 10 muestras de plasma positivas y 2 muestras de plasma negativas, mientras que el panel QCMD 2006 contiene 8 muestras de plasma positivas y 2 muestras de plasma negativas.

E




 DIRECTOR TÉCNICO

Tomando como base los resultados obtenidos, la sensibilidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%.

Sensibilidad diagnóstica	100 %
Especificidad diagnóstica	100 %

S. 4 PRECISIÓN

La precisión muestra el grado de fiabilidad del sistema. Cada procedimiento de medición tiene una variación aleatoria inherente denominada "error aleatorio". El error aleatorio no tiene un valor numérico, sino que se determina por dispersión de la medición como desviación estándar (DevST) y variación de coeficiente (CV%). Normalmente, la precisión de un ensayo se refiere a la concordancia entre mediciones repetidas del mismo material.

En el equipo CMVDNAQT.2G.CE, la precisión se expresó como variabilidad intraensayo y variabilidad interensayo. Se probaron 4 puntos de dilución en 8 réplicas en la misma serie (intraensayo) y en tres series distintas (interensayo).

Tomando como base los resultados obtenidos, se calculó la variabilidad intraensayo e interensayo.

En ausencia de parámetros internacionales establecidos, hemos identificado el siguiente valor de aceptabilidad para el equipo CMVDNAQT.2G.CE:

Variación de coeficiente de intraensayo (CV%) ≤ 10%.

Variación de coeficiente de interensayo (CV%) ≤ 10%.

T. LIMITACIONES

El usuario final del equipo deberá leer cuidadosamente y entender este manual de instrucciones. El seguimiento estricto del protocolo es fundamental para obtener unos resultados fiables. Especialmente, el pipeteado preciso de muestra y reactivo, la aplicación de un flujo de trabajo correcto junto con una programación cuidadosa de la fase de termociclado, son esenciales para la detección y cuantificación precisas y reproducibles de ADN de CMV.

La determinación de ADN de CMV en la muestra de un paciente tiene numerosas implicaciones médicas, sociales, psicológicas y económicas.

Se recomienda que la confidencialidad, el asesoramiento y la evaluación médica apropiados, se consideren un aspecto esencial de la secuencia de prueba.

U. BIBLIOGRAFÍA

1. Diagnosis Herpesvirus Infections by Real-Time Amplification and Rapid Culture. Van Doornum G.J.J., Guldemeester J., Osterhaus A.D.M.E., Niesters H.G.M.. J. Clin. Microbiol., 2003; 41:576-580.
2. Validation of clinical application of Cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. Kalpoe J.S., Kroes A.C.M., de Jong M.D., Schinkel J., de Brouwer C.S., Beersma M.F.C., Claas E.C.J. J. Clin. Microbiol., 2004; 42: 1498-1504.
3. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. Dunn W., Chou C., Li H., Hai R., Patterson D., Stolt V., Zhu H., Liu F. PNAS, 2003;100:14223-14228.
4. Detection of citomegalovirus (CMV) DNA in EDTA whole-blood samples: evaluation of the quantitative *artus* CMV LightCycler PCR kit in conjunction with automated sample preparation. Michelin B.D.A., Hadzisejdic I., Bozic M., Grahovac M., Hess M., Grahovac B., Marth E., Kessler H.H. J. Clin. Microbiol., 2008; 46:1241-1245.
5. DNA microarrays of the Complex Human Cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. Chambers J., Angulo A., Amaratunga D., Guo H., Jiang Y., Wan J.S., Bittner A., Frueh K., Jackson

M.R., Peterson P., Erlander M.G., Ghazal P. J.Virol., 1999; 73:5757-5766.

6. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR. Visconti M.R., Pennington J., Gamer S.F., Allain J.P., Williamson L.M. Blood, 2004; 103:1137-1139.
7. Comparative analysis of human cytomegalovirus a-sequence in multiple clinical isolates by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assays. Zaia J.A., Gallez-Hawkins G., Churchill M.A., Morton-Blackshere A., Pande H., Adler S.P., Schmidt G.M., Forman S.J. J. Clin. Microbiol., 1990; 28:2602-2607.
8. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine Laboratory testing. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. III, Smith T.F. Clin. Microbiol. Rev.2006; 19:165-256.

5. Símbolos

LEYENDA			
	Código del producto		Temperatura de almacenamiento
	Dispositivo de diagnóstico in vitro		Ver instrucciones de uso
	N.º de lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
	Marca de conformidad CE		Fecha de fabricación

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el marcado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Producido por Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italia

CE
0318

11039



INDICACIÓN AL CONSUMIDOR

1. Por cualquier información puede consultar al siguiente teléfono: (011) 4555-4601 en el horario de 9.00 a 18.00 de Lunes a Viernes. Personal de BIOARS S.A. estará a vuestra disposición.
2. La mercadería viaja por cuenta y riesgo del destinatario. Todo reclamo será atendido según lo prevee el "Manual de procedimiento para reclamos técnicos y devolución de mercadería" que BIOARS S. A. pone a disposición del Cliente.

Establecimiento elaborador: Dia.Pro Diagnostic
Bioprobes S.r.l. - Via G. Carducci, 27 - 20099 Sesto S.
Giovanni (Mi) Italia.
Establecimiento Importador: BIOARS S.A. - Estomba
961/965 - Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica-
Matrícula Nacional N° 7028
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T.
N° Certificado:

Claudia E. Etchevés
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHÉVÉS
DIRECTOR TÉCNICO



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

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE
 PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO**

Expediente nº 1-47-3110-952/16-1

Se autoriza a la firma BIOARS S.A. a importar y comercializar el Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado CMV DNA QUANTIFICATION (QT) 2ª GENERACIÓN/ ENSAYO DE PCR EN TIEMPO REAL DE SEGUNDA GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL ADN DE CITOMEGALOVIRUS EN MUESTRAS¹ HUMANAS (SANGRE, PLASMA Y LÍQUIDO AMNIÓTICO).-----

PRESENTACIÓN: ENVASES POR 25, 50, 100 Y 150 DETERMINACIONES, CONTENIENDO:

	25 DETERMINACIONES	50 DETERMINACIONES	100 DETERMINACIONES	150 DETERMINACIONES
MEZCLA MAESTRA (COMPONENTE A)	1 x 0.40 ml	1 x 0.825 ml	2 x 0.825 ml	3 x 0.825 ml
CEBADORES/SONDAS (COMPONENTE B)	1 vial liofilizado	2 viales liofilizados	4 viales liofilizados	6 viales liofilizados
AGUA GRADO MOLECULAR (COMPONENTE C)	2 x 1.50 ml	4 x 1.50 ml	5 x 1.50 ml	7 x 1.50 ml
CONTROL NEGATIVO (NTC)	1 x 1.50 ml	1 x 1.50 ml	1 x 1.50 ml	1 x 1.50 ml
ESTANDAR CUANTITATIVO (STD)	2viales liofilizados	4viales liofilizados	4viales liofilizados	6viales liofilizados
CONTROL INTERNO (IC)	1 vial liofilizado	2 viales liofilizados	4 viales liofilizados	6 viales liofilizados


Vida útil: DOCE (12) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre 2-8 °C . Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley Nº 16.463 y Resolución Ministerial Nº 145/98. Lugar de elaboración: DIA. PRO. Diagnostic Bioprobes Srl. Vía G. Carducci nº27. 20099 Sesto San Giovanni. Milán. (ITALIA). En las

etiquetas de los envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA
DIAGNOSTICO USO IN VITROAUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL
DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado nº

008485

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA
MEDICA

Buenos Aires, **07 OCT 2016**


Dr. ROBERTO LEDEZ Firma y sello
Subadministrador Nacional
A.N.M.A.T.