

راهنمای کیت CMV RQ

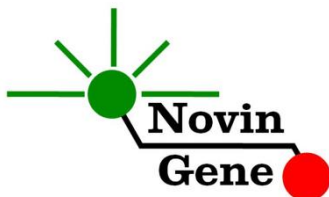
جهت تشخیص و کمیت سنجی سیتومگالوویروس انسانی به روش
Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-05-400

ویرایش ۴/۰

اسفند ۱۳۹۵



فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۲
۲. محتویات کیت ۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ۳
۴. سایر موارد مورد نیاز ۴
۵. نکات قابل توجه ۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۵
۷. عوامل مزاحم ۵
۸. کنترل داخلی ۶
۹. استخراج DNA ۶
۱۰. دستورکار PCR ۷
۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۷
۱۲. تنظیم دستگاه StepOne ۸
۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها ۹
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۹
۱۵. آنالیز نتایج StepOne ۱۱
۱۶. محاسبه تیترو ویروس ۱۳
۱۷. محدوده خطی ۱۴
۱۸. میزان حساسیت ۱۴

کیت **CMV RQ** جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne و به منظور تشخیص و کمیت سنجی DNA سیتومگالو ویروس انسانی در پلاسما می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

ویروس هرپس انسانی (human herpesvirus 5, HHV-5) معروف به سیتومگالو ویروس (Cytomegalovirus, CMV) از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) است و ژنوم آن از DNA دو رشته ای تشکیل شده است. این ویروس یکی از عوامل بیماریزای بسیار شایع است و حدود ۸۰٪ بزرگسالان به آن مبتلا هستند. عفونت اولیه معمولاً در سنین کودکی اتفاق می افتد و عمدتاً فاقد علائم بالینی واضح است. در پی عفونت اولیه ویروس به صورت نهفته (latent) تا پایان عمر در بدن فرد باقی می ماند. در صورت بروز ضعف سیستم ایمنی امکان فعال شدن ویروس نیز وجود دارد؛ به طور مثال پس از پیوند سلول های بنیادی و مغز استخوان و یا پیوند بافت و عضو و همچنین در صورت عفونت با HIV. تشخیص و مدیریت عفونت سیتومگالوویروس در چنین بیمارانی عمدتاً مبتنی بر اندازه گیری تیترا ویروس می باشد. اندازه گیری کمی تیترا ویروس در خون بیمار امکان ارزیابی احتمال بازگشت عفونت و تشخیص زودهنگام آن، پیشگیری، بررسی پاسخ درمانی، تعیین موفقیت یا عدم موفقیت درمان و بروز گونه های مقاوم را فراهم می کند.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیترا سیتومگالوویروس را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این روش در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیعترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود. بر همین اساس می توان

تعداد ویروس را در نمونه مورد بررسی تعیین نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به این که در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
CMV Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
CMV S1	استاندارد ۱: ده هزارکپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
CMV S2	استاندارد ۲: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
CMV S3	استاندارد ۳: یک صدکپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
CMV S4	استاندارد ۴: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارآیی آنها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله ها) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله ها) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آن‌ها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام دریافت نمونه در آزمایشگاه باید پلاسما را جدا نموده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو ویروس در آن ثابت می ماند.

حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما می باشد که نیازمند نیم میلی لیتر خون کامل می باشد.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید

استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمیکند.

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، کیت حاوی کنترل داخلی می باشد. کنترل داخلی به صورت مخلوط با میکس در کیت قرار دارد و در صورت موفق بودن PCR منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه Rotor-Gene و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می شود. در این حالت کنترل داخلی موفق بودن PCR را نشان می دهد.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستورکار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن‌ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن‌ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۴ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از **CMV Mix** اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از **DNA استخراج شده و یا استاندارد** یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید. توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود. در لوح فشرده همراه کیت روی فایل **CMV 0.2** یا **CMV 0.1** (با توجه به لوله های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود. در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و سپس فایل آزمایش را در

پوشه مور نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و ده نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای اینکار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات، دکمه Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاهها

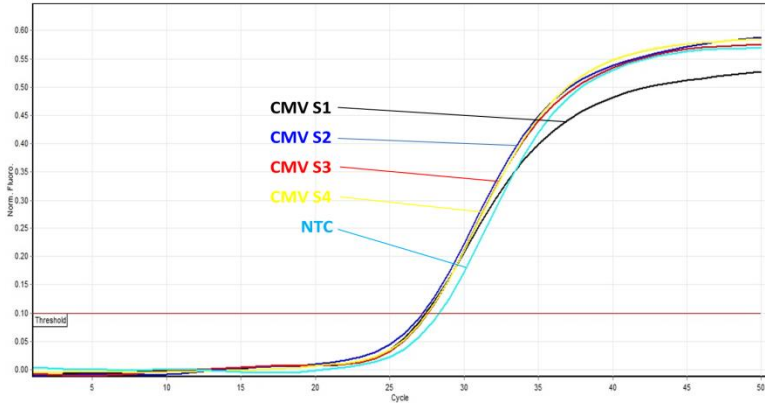
چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاههای Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	58°C x 60 sec	

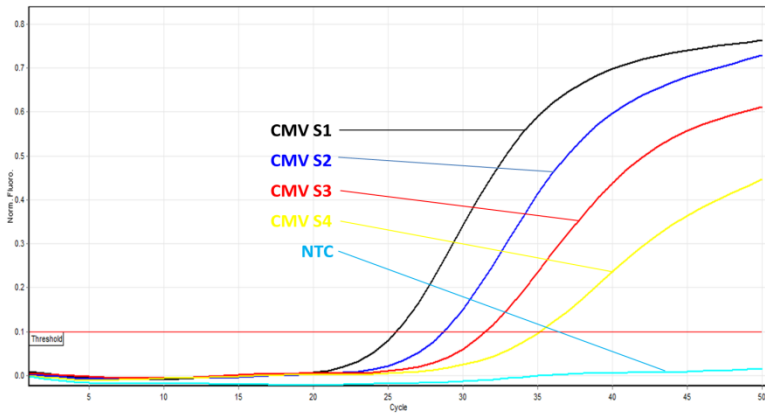
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۵۸ درجه و برای رنگهای FAM و VIC تنظیم شود. CMV Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM میباشد.

۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می توانید به طور ساده آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱: منحنی استانداردهای CMV در کانال سبز دستگاه Rotor-Gene



تصویر ۲: منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه Rotor-Gene

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **CMV** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

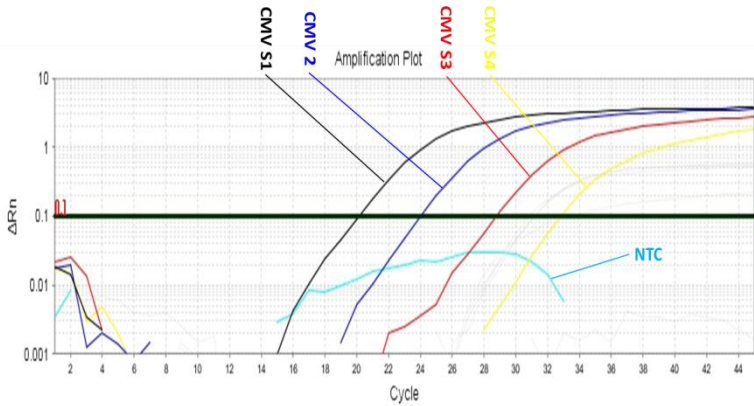
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و CT آندر صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

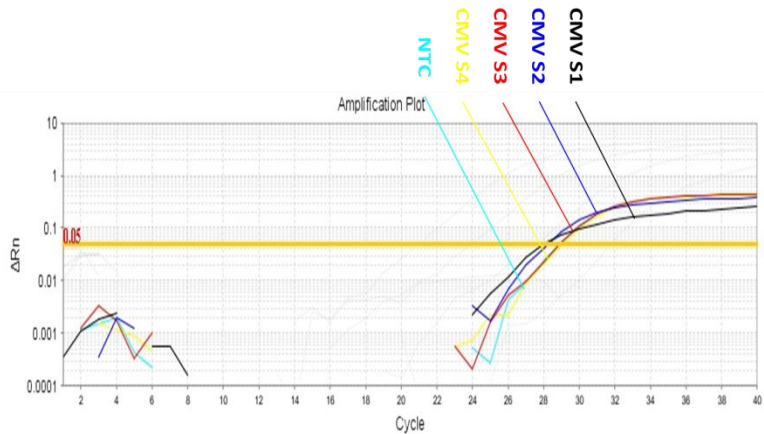
- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای CMV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۳: منحنی استانداردهای CMV در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر ۴: منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

توجه داشته باشید که افزایش **تابش CMV/FAM** مربوط به **CMV** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و CT آندر صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **CMV/FAM** مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و **CT** کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال **IC/VIC** می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **CMV/FAM** منفی باشد ولی در کانال **IC/VIC** مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و **CT** بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال **CMV/FAM** و **IC/VIC** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۶. محاسبه تیترا ویروس

هر کیت حاوی ۴ استاندارد کمی با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آن‌ها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می شود. استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر ($\mu\text{g}/\text{copy}$) مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۱۷. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاذه از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و شامل بازه یک میلیون کپی در میکرولیتر تا یک کپی در میکرولیتر می باشد.

۱۸. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاذه از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و معادل یک کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترو نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

CMV RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection and
Quantitation of Cytomegalovirus
(CMV) DNA**

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-05-400
Version 4.0
March 2017

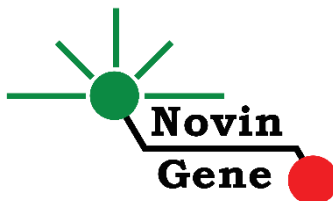


Table of Contents:

1. Introduction.....	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability.....	3
4. General Precautions	4
5. Additionally Required Materials.....	4
6. Specimen, storage and transport	5
7. Interfering substances.....	5
8. Internal control (IC).....	5
9. DNA isolation	5
10. PCR Protocol	6
11. Programming of the Rotor-Gene	6
12. Programming of StepOne(/Plus)	7
13. Programming other machines	7
14. Data Analysis: Rotor-Gene.....	8
15. Data Analysis: StepOne	10
16. Quantitation	12
17. Linear Range	12
18. Sensitivity	12

CMV RQ kit is intended for use with Rotor-Gene or StepOne machines and for the quantitative detection of CMV-DNA. This kit is for research use only.

1. Introduction

Human Herpesvirus 5 (HHV-5) known as Cytomegalovirus (CMV) is a double-stranded DNA virus and a member of Herpesviridae family. It is a widespread pathogen with high seropositivity (about 80%) in adult population. Primary infection is usually subclinical and mostly happens in early childhood. The primary infection is followed by the latent infection and CMV persists in the infected person through life. CMV can be reactivated in immunocompromised hosts for example after stem cell, bone marrow or solid organ transplantation or in the course of HIV infection. In these patients, viral load assays are the cornerstone for the diagnosis and monitoring of CMV disease. Viral load quantification in blood allows assessing patients at risk of developing relapsing infection, early detection of active CMV infection, guiding preemptive therapy, monitoring response to therapy, determining duration of therapy and prediction of treatment failure due to emergence of resistant strains.

CMV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of cytomegalovirus with Rotor-Gene or StepOne machines. This method provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other available methods. In this method application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product.

Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

This kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to identify possible PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
CMV Mix	PCR Master mix*	360 μ l
CMV S1	Standard 1: 10,000 copy/ μ l	150 μ l
CMV S2	Standard 2: 1,000 copy/ μ l	150 μ l
CMV S3	Standard 3: 100 copy/ μ l	150 μ l
CMV S4	Standard 4: 10 copy/ μ l	150 μ l
Water	PCR Grade Water	200 μ l

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits, respectively.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components **on ice** completely, mix by flickering followed by a quick spin and **store on crushed ice** after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate plasma for CMV detection. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Upon receipt plasma should be separated from whole blood and can be stored at +4°C for few days or aliquoted and stored at -20°C for up to few weeks.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well. Elevated levels of bilirubin (≤ 4.5 mg/dl) and lipids (≤ 1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. Internal Control (IC)

To examine the possible PCR inhibition and to prevent false negative results, the kit contains an *Internal Control* included in PCR Mix. Internal control should generate a CT of 28-32 in Yellow Channel on Rotor-Gene and a CT of 28-34 in VIC channel on StepOne.

9. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

Pipette 15ul of CMV Mix directly to each tube followed by adding 10ul of standard or isolated DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

11. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on CMV Template 0.2 or CMV 0.1 according to the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On

the pop up window click start again and save program on desired location.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 4 standards and 10 samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on "Define Targets and Samples" menu. When finished, click on "Start Run" and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	58°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 58°C for FAM and VIC dyes. The CMV Mix contains ROX. Final concentration of ROX in reaction is 300nM.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as “unknown” and Negative control or no template control as “Negative Control” or “NTC” respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **CMV (Green channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green.

In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then click on OK.

Repeat the above for Cycling A. Yellow but cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1. Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

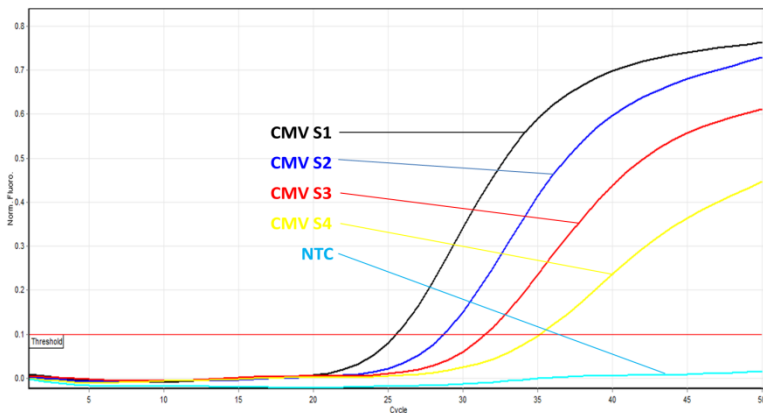


Figure 1. Typical CMV Graph in Green Channel for Rotor-Gene

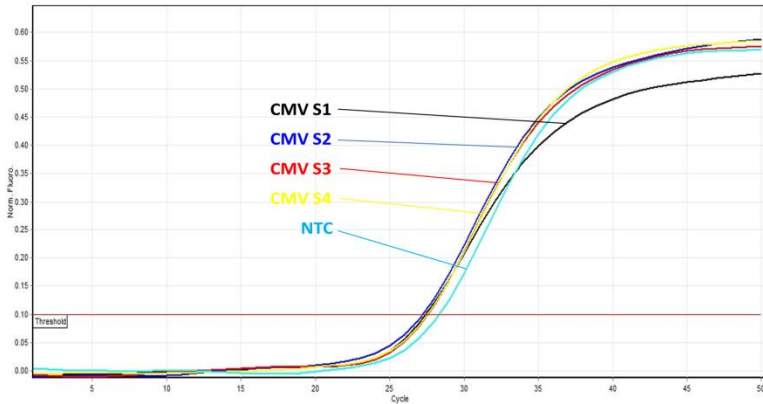


Figure 2. Typical IC Graph in Yellow Channel for Rotor-Gene

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.

- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green and Yellow channels.

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for CMV/FAM at 0.1 and at 0.05 for IC/VIC.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

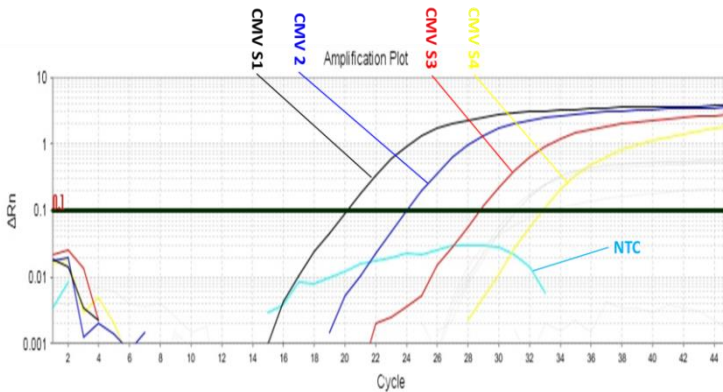


Figure 3. Typical CMV Graph in FAM Channel for StepOne

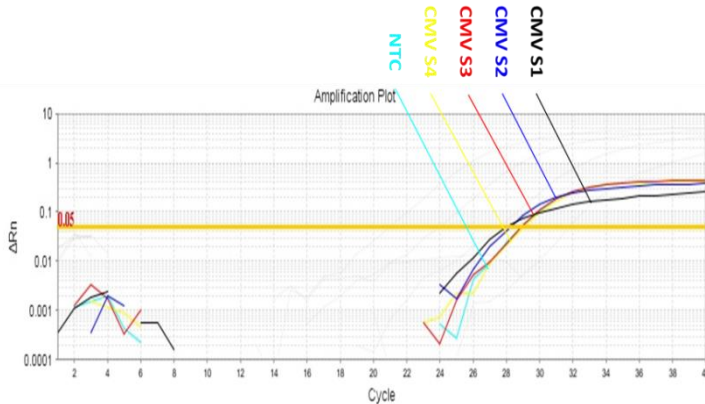


Figure 4. Typical IC Graph in VIC Channel for StepOne

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM/CMV channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/CMV channel while it is positive in VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 28-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM/CMV and VIC/IC channels.

16. Quantitation

The kit provides 4 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all five standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/ μ l. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result(copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the plasma volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

17. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 1,000,000 copies/ μ l to 1 copy/ μ l.

18. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 1 copy/ μ l.

