

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



CMV q

CE

0318

IVD



These instructions for use apply to the following references / *Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:*

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CMV106L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CMV106H
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CMV112L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CMV112H
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CMV113L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CMV113H

Table A 1. References for Open format with internal control products. / *Referencias para productos Open Format con control interno.*

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CMV196T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / *Referencias para productos formato Tubo con control interno.*

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	6
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	9
8.1.	Specimen collection, transport and storage	9
8.2.	DNA extraction	9
8.3.	Reference workflow of VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit for Conversion Factor (CF) calculation	10
8.4.	Standard curve preparation for quantitative assay	10
9.	Result interpretation	11
10.	Limitations of the test	14
11.	Quality control.....	15
12.	Performance characteristics.....	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	15
12.2.	Linear range	17
12.3.	Analytical sensitivity	18
12.4.	Lower Limit of Quantification (LLOQ)	19
12.5.	Analytical specificity.....	19
12.6.	Analytical reactivity	19
	ANNEX 1	20
A1.1	Principle of the procedure.....	20
A1.2	Reagents provided.....	20
A1.3	Test procedure.....	21
A1.3.1	Conversion factor protocol	21
A1.3.2	Lyophilized quantitative standards	22
A1.3.3	PCR protocol.....	22
	ANNEX 2	24
A2.1	Principle of the procedure.....	24
A2.2	Reagents provided.....	24
A2.3	Test procedure	25
A2.3.1	Conversion factor protocol	25
A2.3.2	Lyophilized quantitative standards	25
A2.3.3	Lyophilized reaction mix tube.....	26
A2.3.4	PCR protocol.....	26

Contenido

1.	Uso previsto	27
2.	Introducción y explicación	27
3.	Procedimiento	28
4.	Reactivos suministrados	28
5.	Material requerido y no suministrado	28
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento	29
7.	Precauciones para el usuario	30
8.	Procedimiento del test	31
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras	31
8.2.	Extracción de DNA	32
8.3.	Flujo de trabajo de referencia de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit para el cálculo del Factor de Conversión (FC)	32
8.4.	Preparación de la curva estándar para el ensayo cuantitativo	33
9.	Interpretación de resultados	34
10.	Limitaciones del test	37
11.	Control de calidad	38
12.	Características del test	38
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica	38
12.2.	Rango lineal	40
12.3.	Sensibilidad analítica	41
12.4.	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	42
12.5.	Especificidad analítica	42
12.6.	Reactividad analítica	43
	ANEXO 1	44
A1.1	Procedimiento	44
A1.2	Reactivos suministrados	44
A1.3	Procedimiento del test	45
A1.3.1	Protocolo para el Factor de Conversión	45
A1.3.2	Estándares cuantitativos liofilizado	46
A1.3.3	Protocolo PCR	46
	ANEXO 2	48
A2.1	Procedimiento	48
A2.2	Reactivos suministrados	48
A2.3	Procedimiento del test	49
A2.3.1	Protocolo para el Factor de Conversión	49
A2.3.2	Estándares cuantitativos liofilizados	50
A2.3.3	Mezcla de reacción liofilizada	50
A2.3.4	Protocolo PCR	51
	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	52
	Trademarks	53

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit is a real-time PCR test designed for the detection and quantitative measurement of Cytomegalovirus (CMV) DNA in human EDTA-plasma samples. This test is intended for use as an aid in the universal screening of the CMV infection, in the diagnosis and management of CMV in solid organ transplant patients and in hematopoietic stem cell transplant patients. The test can be used in these populations to assess the need to initiate antiviral treatment, and in patients receiving anti-CMV therapy, serial DNA measurements can be used to assess viral response to treatment. The results from the VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit must be interpreted within the context of all relevant clinical and laboratory findings. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real-time PCR, and detected using fluorescent reporter dye probes specific for CMV.

2. Summary and Explanation

Cytomegalovirus (CMV) is a wide-spread double-stranded DNA virus which belongs to the viral family known as herpesviruses, *Herpesviridae*, or human herpesvirus-5 (HHV-5). Human cytomegalovirus infections may be asymptomatic in healthy people, but it can be life-threatening in an immunocompromised patient. It is possible to be transmitted transplacentally to neonates, or through breast milk of an infected and shedding mother (congenital CMV infection), as well as by intimate contact and by transplantation from (or sharing syringes with) an infected individual. Like other herpesviruses, after recovery of the initial infection, CMV often remains latent, but it can reactivate at any time, during the compromise of the immune system with immunosuppression. Of all herpesviruses, CMV harbours the largest number of genes dedicated to evading innate and adaptative immunity in the host. CMV infects between 60% to 70% of adults in industrialized countries and close to the 100% in emerging countries.

In some cases, infection in healthy people can cause mild illness that may include: fever, sore throat, fatigue or swollen glands. Occasionally, CMV can cause mononucleosis or hepatitis (liver problems). People with weakened immune system who get CMV can have more serious symptoms affecting the eyes, lungs, liver, esophagus, stomach, and intestines.

Congenital CMV infection is a leading infectious cause of deafness, learning disabilities, and intellectual disability in infants worldwide. Congenital CMV infection occurs when a baby is born with CMV infection, and it is estimated that one out of every 200 babies is born infected with CMV. CMV-positive babies can have brain, liver, spleen, lung and growth problems, but the most common long-term health problem in babies born with congenital CMV infection is hearing loss.

The diagnosis of human cytomegalovirus infection is confirmed by demonstrating the presence of infectious virus, viral antigens, or viral DNA in clinical samples (including blood and other body fluids) from infected patients. Serologic tests, highlighting ELISA test, are commonly used for diagnosis of CMV infection for people older than 12 months, but PCR-based assays are currently considered the standard diagnostic method to confirm congenital CMV infection in newborns.

3. Principle of the procedure

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit is designed for the detection and quantitative measurement of CMV DNA in human EDTA-plasma samples. After DNA isolation, the detection of CMV is performed by the amplification of a conserved region of the *pp65* and *gB* genes, using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an **endogenous internal control** to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous internal control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

In addition, this kit contains 5 lyophilized vials (CMV1Q1 to CMV1Q5) with different standardized concentrations of CMV specific DNA (CMV *q* Quantitative Standards) for the quantification of CMV viral DNA in clinical samples. These quantitative standards are calibrated against the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162), ensuring the quality of the results and the comparison with results from other laboratories.

4. Reagents provided

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open format with internal control products and Annex 2 for tube format with internal control products.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

Optional:

- 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code 09/162), or another reference material (in case the final user needs to calculate its own conversion factor when using a different workflow with VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit).

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit has been validated with different workflows, although the MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) workflow in plasma samples (hereinafter referred to as VIASURE CMV q reference workflow in this document) was the one considered for the analytical/clinical validation, and therefore, for the interpretation of results.

The different workflows validated are listed below:

	Matrix	Workflow
1 (recommended)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + VIASURE V-Lab96 Cyclor (CerTest Biotec S.L)
3	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
4	Plasma	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega) + CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
5	Plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Table 1. Sample matrix extraction-amplification methods (workflows) validated using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the CMV q Quantitative Standards has been re-suspended, they are stable at room temperature during the time needed to dispense a 96-well plate, but they should be stored at 4 °C for up to 5 months, or at -20° C or lower for longer period of time. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Quantitative Standards has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the CMV q Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.

- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-CMV113L and VS-CMV113H). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- **Do not mix CMV q Quantitative Standards from different kits and / or lots.** Each quantitative standard set has been validated for each lot of master mix with which it is supplied.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Use calibrated micropipettes and proper tips with VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit and stick to test procedure of this instructions of use. Inaccurate volumes due to imprecise pipetting or malpractices may result in an erroneous quantification.
- Standard curve should be included in the same run of samples to be quantify and should be generated by running each of CMV q Quantitative Standard in triplicate.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.

- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.
- When using 1st WHO International Standard for human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC 09/162), please note that the stability of this standard can be affected by some use practices. Therefore, it is recommended to reconstitute the standard and prepared the aliquots maintaining the cold chain. Additionally, aliquots should be for single use only since freeze-thawing cycles affect the integrity of the reference material.

8. Test procedure

Please, see Annex 1 for Open format with internal control products Test Procedure and Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit has been tested in human EDTA-plasma clinical samples. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, clinical samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at room temperature for up to 2 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 2 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit has been validated with EDTA-plasma samples extracted with MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and amplified on CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

However, although they are not considered as reference workflows, other extraction-amplification workflows have been validated when using EDTA-plasma samples (see table 1 in section 5).

8.3. Reference workflow of VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit for Conversion Factor (CF) calculation

Before CMV quantification from clinical samples, an extraction-amplification procedure (workflow) must be decided in advance and maintained for further analysis. Because CMV concentration must be expressed in International Units (IU), and the quantitative results are obtained in copies per mL after interpolation in the linear calibration curve, a conversion factor (CF) is required to be calculated in order to relate copies/mL values with IU/mL data. **The conversion factor (CF) depends on the type of sample tested and the extraction and amplification procedure used (workflow).**

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit has been validated using EDTA-plasma samples extracted with MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and run on CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The conversion factor value was calculated using the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162) and established at **1.263 IU/copies**.

$$\text{IU/mL} = \text{copies/mL} \times 1.263$$

For instance, a CMV viral load determined at 10,000 copies/mL in a sample would correspond to 12,630 IU/mL.

Other workflows were validated using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit. The CF value obtained for each one is summarized in tables A1.5 and A2.4 (see Annexes 1 and 2, respectively), but please note that these CF values are applicable only for EDTA-plasma samples as sample matrix. Nevertheless, **each laboratory must establish its own conversion factor**.

If you wish to have a quick guide for how to calculate your CF value and an excel template to perform it, visit the website www.certest.es.

NOTE: It has been noticed that the **stability of WHO International Standard can be affected by some use practices**. Therefore, it is recommended to reconstitute the standard and prepare the aliquots maintaining the cold chain. Additionally, aliquots should be for single use only since freeze-thawing cycles affect the integrity of the reference material.

8.4. Standard curve preparation for quantitative assay

This kit contains 5 lyophilized vials (CMV1Q1 to CMV1Q5) with different standardized concentrations of CMV specific DNA (CMV q Quantitative Standards) for the quantification of CMV viral DNA in clinical samples. These Quantitative Standards were calibrated against the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162) and can be used to generate a standard curve with which to determine the amount of CMV viral DNA in a sample in IU/mL. Lyophilized CMV q Quantitative Standard panel of VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit are ready to use after being reconstituted in RNase/DNase free Water.

The CMV q Quantitative Standards have the following concentrations:

CMV q Quantitative Standard	Concentration (copies/mL)
CMV1Q1	5×10^6
CMV1Q2	5×10^5
CMV1Q3	5×10^4
CMV1Q4	5×10^3
CMV1Q5	5×10^2

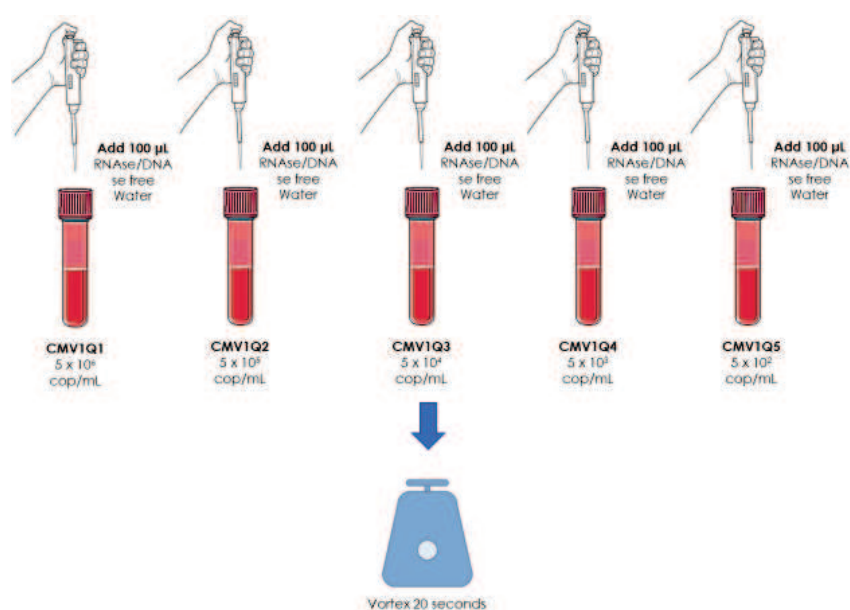
Table 2. CMV q Quantitative Standards and concentrations.

To perform a quantitative assay, take CMV q Quantitative Standard set (aluminium pouches, red vials), and prepare the standard curve as follows:

- Rehydrate CMV q Quantitative Standard set. Pipette 100 μ L of RNase/DNase free Water in each lyophilized CMV q Quantitative Standard, changing the micropipette tip between vials.
- Vortex each vial for 20 seconds.

CMV q Quantitative Standards should be manipulated in an area separated from the extraction procedure, and it is recommended to have them ready to be added for when samples are to be loaded.

Figure 1. Preparation of CMV q Quantitative Standard set for quantitative assay.



9. Result interpretation

All the result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Endogenous Internal Control (EIC) signal to verify the extraction and correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the CMV q Quantification Standards amplification curves as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the

fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of CMV q Quantitative Standards and negative control in each run validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal (i.e. exponential) in CMV q Quantitative Standards wells.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	CMV (FAM) ¹	Endogenous Internal Control (EIC) (HEX) ²	Interpretation of Controls
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	+	-	Valid
Negative Control (NC)	-	-	Valid

Table 2. Expected Performance of Controls

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the CMV q Quantitative Standards wells for the target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

2 Due to human housekeeping *RNase P* gene target is present in nucleated human cells, amplification signal of Endogenous Internal Control (EIC) is not expected in CMV q Quantitative Standards.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the CMV q Quantitative Standards and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

A standard curve can be generated from the dilution series of CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-5) following the formula:

$$Ct = m \log (Q) + b$$

Where: Ct = Threshold Cycle; m = Slope; Q = Concentration; and b = Intercept.

Positive samples of unknown concentration can be quantified by interpolating their Ct value in the standard curve according to the formula:

$$Q = 10^{(Ct-b)/m}$$

The obtained quantification result is reported in the concentration units of the calibrators set.

NOTE: Standard curve should be included in the same run of samples to be quantify and should be generated by running each of CMV q Quantitative Standard in triplicate.

The quantification results are valid if the generated standard curve reaches the following control parameter values:

- Efficiency: 80 - 120%
- R^2 : ≥ 0.98

The concentration of your "Positive sample" refers to the concentration in the eluted DNA after extraction, not to the original clinical sample. **To determine the target concentration of the original sample, consider the dilutions of the extraction procedure and PCR Set-up.**

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read and analyzed the results if VIASURE CMV q reference workflow (MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)) has been performed:

CMV (FAM)	Endogenous internal control (HEX)	Interpretation of patients' individual samples	
< 298.12 IU/mL	≤40 or no signal ¹	Valid	Non-quantifiable CMV positive sample
298.12 to 631.5 IU/mL	≤40 or no signal ¹	Valid	Quantifiable CMV positive sample by extrapolation ²
631.5 to 631.5 x 10 ⁴ IU/mL	≤40 or no signal ¹	Valid	Quantifiable CMV positive sample in the quantification range
> 631.5 x 10 ⁴ IU/mL	≤40 or no signal ¹	Valid	Quantifiable CMV positive sample by extrapolation ³
No signal	≤ 35 ³	Valid	Target not detected
No signal	>35 or no signal ³	No valid	Test Failure – Repeat Testing ⁴

Table 3. Interpretation of individual patient sample results. No signal = no amplification curves.

1 The Endogenous Internal Control (EIC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 CMV target genes positive below the quantification range let quantification of CMV viral load by extrapolation of the standard curve, but results could not be accurate.

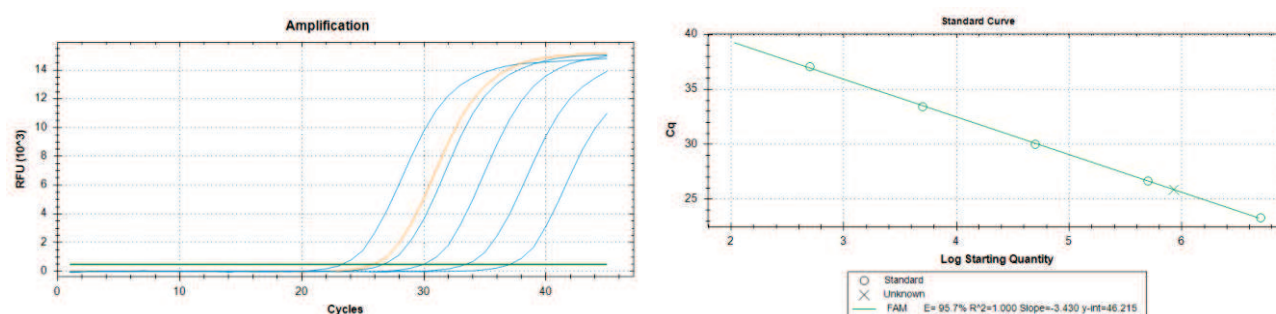
3 CMV target genes positive above the quantification range let quantification of CMV viral load by extrapolation of the standard curve, but results could not be accurate. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100.

4 In the case of CMV target genes negative, EIC must show an amplification signal with Ct ≤35. The Ct value could be very variable due to the endogenous internal control is a human housekeeping gene that should be present in all human nucleated cells in the original samples. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the endogenous internal control, the result is considered as 'invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use; the correct performance of each workflow steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- a) repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- c) obtain a new specimen and retest.

Figure 3. Standard curve from the dilution series (blue) and quantification of a positive sample of unknown concentration (orange) run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated with DNA extracted EDTA-plasma samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- Lower levels of target below the low limit of quantification might be detected, but results may not be accurately quantifiable.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by CMV, either the high number of DNA template copies which contains each CMV q Quantitative Standard vial, samples containing high concentrations of target DNA, or contamination due to PCR products from previous reactions.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the viral DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown CMV variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent infection of CMV or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Inaccurate viral DNA results (loss of viral load) may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Improper maintenance of commonly used equipment, especially micropipettes and extraction/amplification systems.
 - Use of uncalibrated micropipettes and/or improper tips.

- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targeted viral sequences.
- Negative results do not preclude CMV infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by CMV have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the pathogen.
- If diagnostic tests for other immunodepressive-related illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that CMV infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.
- The conversion factor (CF) depends on the type of sample tested and the extraction and amplification instruments used (workflow). Therefore, each sample type-extraction-amplification workflow requires the calculation of its own CF.

11. Quality control

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit contains CMV q Quantitative Standards and a negative control that must be included in each run to correctly interpret and quantify the results. Also, the endogenous internal control (EIC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit was tested using plasma-EDTA clinical samples from patients who underwent to a universal screening of the CMV infection, for the analysis and management of CMV in solid organ transplant patients, or in hematopoietic stem cell transplant patients before the antiviral treatment. The study also included patients that have been received anti-CMV therapy.

In order to determine the clinical diagnostic accuracy, an evaluation has been conducted through collaboration with national and international entities. A summary of the sites, sample type and workflow are included in the following table:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Spain) in collaboration with Cerba Xpert (Saint Ouen L'Aumone, France)	EDTA-Plasma	MagDEA® Dx SV Kit using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	CMV
2	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Spain) in collaboration with Cerba Xpert (Saint Ouen L'Aumone, France)	EDTA-Plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	CMV

Table 4. Site, sample type, workflow, and target.

Correlation between extraction methods using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit with comparator assays were assessed as shown in the following figures:

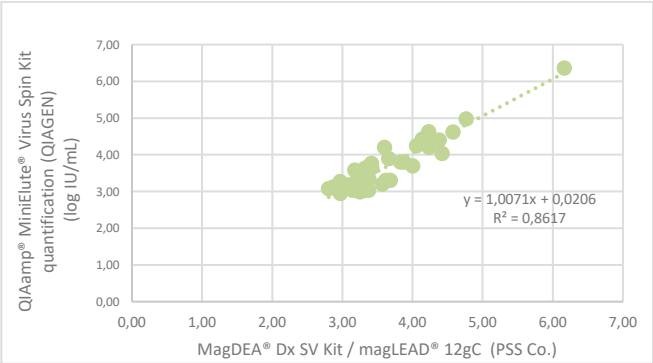


Figure 2. Correlation between the QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit and MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC extraction method results using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit.

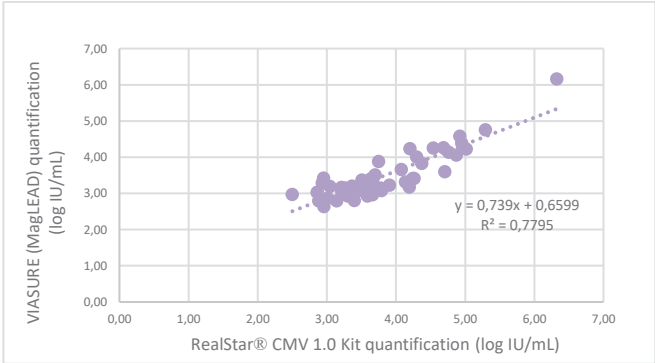


Figure 3. Correlation between VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit and RealStar® CMV 1.0 Kit (Altona Diagnostics) results.

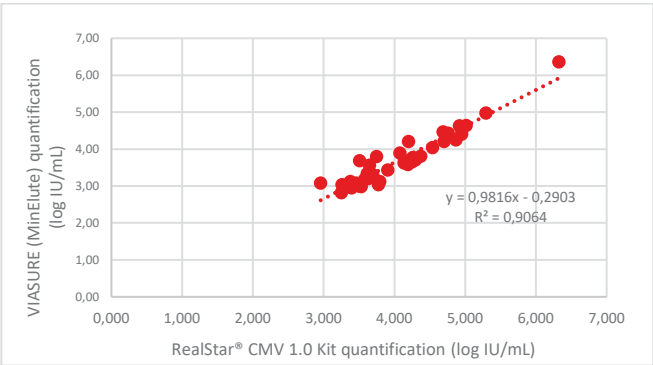


Figure 4. Correlation between VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit and RealStar® CMV 1.0 Kit (Altona Diagnostics) results using QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN).

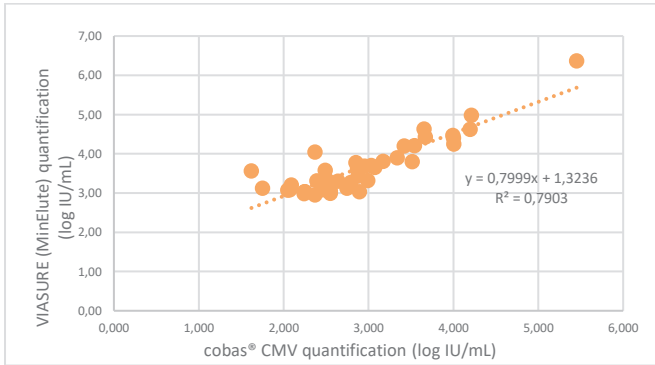


Figure 5. Correlation between VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit using QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) and cobas® CMV (Roche Diagnostics) results.

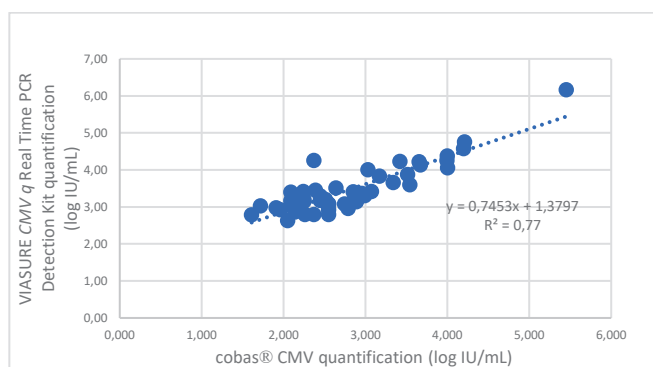


Figure 5. Correlation between VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit and cobas® CMV (Roche Diagnostics) results using MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC and quantifiable samples.

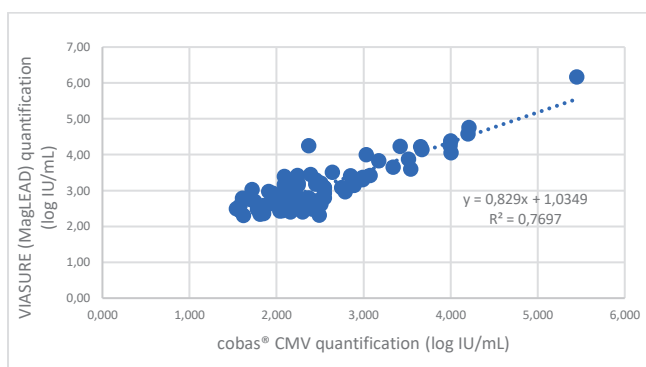


Figure 6. Correlation between VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit and cobas® CMV (Roche Diagnostics) results using MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC and samples over VIASURE LoD (231 IU/mL).

Lastly, it was possible to calculate the clinical sensitivity and specificity and the negative and positive predictive values (with 95% confidence intervals) using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit. Briefly, when a sigmoid curve was observed in a clinical sample when analyzed with VIASURE assay, it was considered positive, and samples with absence of curve were negative.

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	cobas® CMV (Roche Diagnostics)	CMV	120	153	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.96-1)	1 (0.97-1)

Table 5. True positive (TP) and negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV), Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, using MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

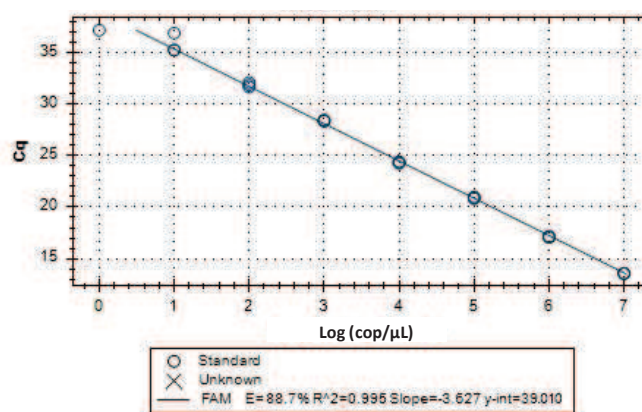
Results show high agreement to detect and quantify CMV using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Linear range

The linearity of VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit was determined using specific and synthetic DNA belonging to CMV, and further confirmed with reference material in plasma samples.

First, a series of ten-fold dilutions containing a known concentration (ranging from 10^7 to 10^1 copies/ μ L) of specific CMV DNA (CMV1Q) was amplified, and Ct values in all dilution tested were obtained.

Figure 7. Dilution series of CMV1Q (10^7 - 10^1 copies/ μ L) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).



Afterwards, linear range was further confirmed using negative plasma samples spiked with a known concentration of CMV reference material (1st WHO IS for human Cytomegalovirus NAT (NIBSC code 09/162) and NATtrol™ Cytomegalovirus Linearity Panel (Zeptometrix Corporation, Ref: NATCMV-LIN).

Using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, amplifications in all dilutions tested were obtained. End-point fluorescence level was maintained, and no crosstalk was observed. Assays with 1st WHO IS for human Cytomegalovirus and NATtrol™ Cytomegalovirus Linearity Panel showed statistical significance.

Figure 8. Dilution series of 1st WHO IS for human CMV template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).

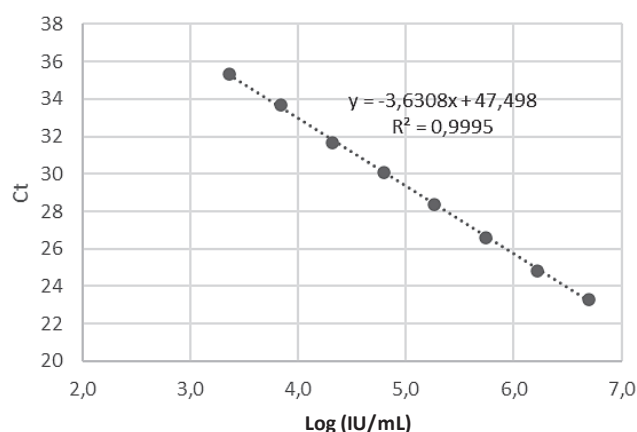
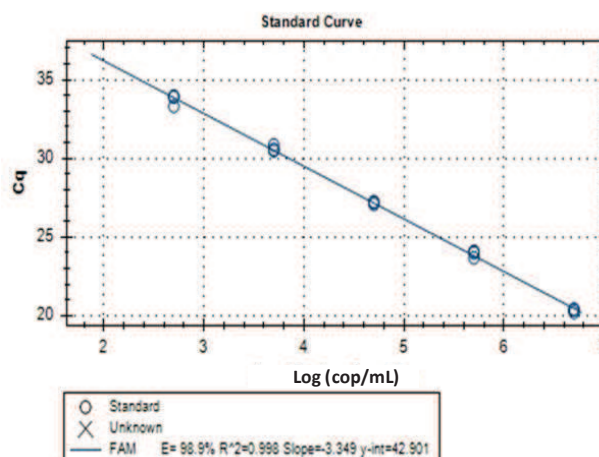


Figure 9. Dilution series of NATtrol™ Cytomegalovirus Linearity Panel template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).



12.3. Analytical sensitivity

To determine the LoD of the product, a dilution series of the 1st WHO International Standard for human CMV NAT (NIBSC code 09/162) and a tentative LoD concentration of NATtrol™ Cytomegalovirus Strain AD-169 (Zeptometrix, Ref: NATCMV-0002) were set up.

A total of 71 replicates per concentration level of 1st WHO IS for human CMV reference material and 89 replicates of the NATtrol™ Cytomegalovirus Strain AD-169 reference material were extracted with the MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and amplified in CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Using the 1st WHO IS for human CMV NAT (NIBSC code 09/162) and Probit Model to analyse the results, VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit showed a detection limit of 236.04 copies /mL, equivalent to 298.12 IU/mL for CMV, with a positive rate of $\geq 95\%$. Using NATtrol™ Cytomegalovirus Strain AD-169 material, VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit showed a detection limit of 100 copies/mL, equivalent to 504 IU/mL for CMV, with a positive rate of $\geq 95\%$.

CMV concentration (copies/mL)	CMV concentration (IU/mL)	N° of replicates	N° positive replicates	Hit rate (%)
500	631.5	71	71	100
400	505.2	71	71	100
300	378.9	71	70	98.6
200	252.6	71	63	88.7

Table 6. Analytical sensitivity (limit of detection or LoD) evaluated with negative plasma samples spiked with the 1st WHO International Standard for human CMV NAT (NIBSC code 09/162) and VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, (IU) = International Units.

CMV concentration (copies/mL)	CMV concentration (IU/mL)	N° of replicates	N° positive replicates	Hit rate (%)
100	504	89	85	95.5

Table 7. Analytical sensitivity (limit of detection or LoD) evaluated with negative plasma samples spiked with the NATtrol™ Cytomegalovirus Strain AD-169 (Zeptometrix, Ref: NATCMV-0002) and VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, (IU) = International Units.

12.4. Lower Limit of Quantification (LLOQ)

The lower limit of quantification (LLOQ) is the lowest concentration value that CMV can be detected and at which the total error meets the acceptance criterium of being below 40%. The LLOQ was determined to be 500 copies/mL, equivalent to 631.5 IU/mL, for CMV.

12.5. Analytical specificity

The specificity of the VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms associated to common disorders in transplant recipients or immunocompromised individuals. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing (wet testing)					
Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Hepatitis A virus	-	<i>Plasmodium falciparum</i> strain 3D7	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Herpes simplex virus 1 (HSV-1) strain MacIntyre	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> type A1 and g885652	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Herpes simplex virus 2 (HSV-2) strain MS	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) strain Z29 and types A and B	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
BK virus types 1b-2 and IV	-	JC virus types 1A and 2B	-	<i>Toxoplasma gondii</i> type II	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotype 1/2b and serovar 4b	-	Varicella-Zoster Virus strain Ellen	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotype Cloaca A	-	<i>Listeria innocua</i> serotype 6a	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Epstein-Barr virus	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	Parvovirus B19 genotypes 1, 2 and 3a	-
<i>Escherichia coli</i> strain 0.1285;O18:H7:K1	-				

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.6. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit was evaluated against DNA from Cytomegalovirus, strains Merlin and AD-169 (as template), showing positive results.

ANNEX 1

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CMV106L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CMV106H
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CMV112L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CMV112H
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CMV113L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CMV113H

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

In addition, this kit contains 5 lyophilized vials (CMV1Q1 to CMV1Q5) with different standardized concentrations of CMV specific DNA (CMV q Quantitative Standards) for the quantification of CMV viral DNA in clinical samples. These quantitative standards are calibrated against the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162), ensuring the quality of the results and the comparison with results from other laboratories.

Target	Channel	Gene
CMV	FAM	<i>pp65</i> and <i>gB</i>
Endogenous Internal control (EIC)	HEX, VIC or JOE *	human <i>RNase P</i>

Table A1 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.certest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3 and A1.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
CMV q 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	5 (1 vial per concentration)
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CMV106L, VS-CMV106H, VS-CMV112L and VS-CMV112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
CMV q 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	5 (1 vial per concentration)
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-CMV113L and VS-CMV113H.

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Conversion factor protocol

CMV q Quantitative Standards has been calibrated against the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162) and can be used to generate a standard curve with which to determine the CMV viral DNA in a sample in International Units (IU) per mL after calculating the conversion factor (CF). **The conversion factor (CF) depends on the type of sample tested and the extraction and amplification instruments used (workflow).** Therefore, the combination for which the conversion factor is to be tested must be decided in advance and maintained in all corresponding analyses.

The reference workflow established to use with VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit is EDTA-plasma samples extracted with **MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and run on CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)**. If this workflow is performed, the concentration of samples in IU/mL can be calculated using the CF value **1.263 IU/copies** as shown in the following formula:

$$\text{IU/mL} = \text{copies/mL} \times 1.263$$

Other alternative workflows were validated using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit. The CF value obtaining for each one is summarized in table A1.5:

	Matrix	Workflow	Conversion Factor (CF) (IU/copies)
1 (recommended)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.263
2	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + VIASURE V-Lab96 Cyclor (CerTest Biotec S.L)	1.03
3	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	1.30
4	Plasma	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega) + CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	2.12
5	Plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.86

Table A1 5. Calculation of conversion factor (CF) with different extraction-amplification methods using plasma samples spiked with a known concentration of 1st WHO International Standard for CMV DNA (NIBSC 09/162). (IU) = International Units.

If another workflow is followed, then CF value must be calculated by the user. If you wish to have a quick guide for how to calculate your CF value and an excel template to perform it, visit the website www.certest.es.

A1.3.2 Lyophilized quantitative standards

CMV q Quantitative Standards contain high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized CMV q Quantitative Standards (red vials) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) into each vial and vortex thoroughly for 20 seconds.

Once the CMV q Quantitative Standards has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.3 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. At least one replicate of each CMV q Quantitative Standard and one replicate of negative control must be included in each run for each assay. However, standard curve should be generated by running each of CMV q Quantitative Standard in triplicate, as well as to be included in the same run of samples to be quantified.

Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, each reconstituted CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-5) (aluminium pouches, red vials), and Negative Control (violet vial) and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A1 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (CMV) and HEX, JOE or VIC (Endogenous Internal Control (EIC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CMV196T

Table A2. 1.References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

In addition, this kit contains 5 lyophilized vials (CMV1Q1 to CMV1Q5) with different standardized concentrations of CMV specific DNA (CMV q Quantitative Standards) for the quantification of CMV viral DNA in clinical samples. These quantitative standards are calibrated against the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162), ensuring the quality of the results and the comparison with results from other laboratories.

Target	Channel	Gene
CMV	FAM	<i>pp65</i> and <i>gB</i>
Endogenous Internal control (EIC)	HEX, VIC or JOE *	human <i>RNase P</i>

Table A2 6. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.cerfest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
CMV q Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	5 (1 vial per concentration)
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 2. Reagents and materials provided in VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CMV196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Conversion factor protocol

CMV q Quantitative Standards has been calibrated against the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162) and can be used to generate a standard curve with which to determine the CMV viral DNA in a sample in International Units (IU) per mL after calculating the conversion factor (CF). **The conversion factor (CF) depends on the type of sample tested and the extraction and amplification instruments used (workflow).** Therefore, the combination for which the conversion factor is to be tested must be decided in advance and maintained in all corresponding analyses.

The reference workflow established to use with VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit is EDTA-plasma samples extracted with **MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) and run on CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)**. If this workflow is performed, the concentration of samples in IU/mL can be calculated using the CF value **1.263 IU/copies** as shown in the following formula:

$$\text{IU/mL} = \text{copies/mL} \times 1.263$$

Other alternative workflows were validated using VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit. The CF value obtaining for each one is summarized in table A2.4:

	Matrix	Workflow	Conversion Factor (CF) (IU/copies)
1 (recommended)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.263
2	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + VIASURE V-Lab96 Cyclor (CerTest Biotec S.L)	1.03
3	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	1.30
4	Plasma	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega) + CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	2.12
5	Plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.86

Table A2 4. Calculation of conversion factor (CF) with different extraction-amplification methods using plasma samples spiked with a known concentration of 1st WHO International Standard for CMV DNA (NIBSC 09/162). (IU) = International Units.

If another workflow is followed, then CF value must be calculated by the user. If you wish to have a quick guide for how to calculate your CF value and an excel template to perform it, visit the website www.certest.es.

A2.3.2 Lyophilized quantitative standards

CMV q Quantitative Standards contain high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized CMV q Quantitative Standards (red vials) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) into each vial and vortex thoroughly for 20 seconds.

Once the CMV q Quantitative Standards has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A2.3.3 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (at least one replicate of each CMV q Quantitative Standard and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the CMV q Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.4 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. At least one replicate of each CMV q Quantitative Standard and one replicate of negative control must be included in each run for each assay. However, standard curve should be generated by running each of CMV q Quantitative Standard in triplicate, as well as to be included in the same run of samples to be quantified.

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated CMV q Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, each reconstituted CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-5) (aluminium pouches, red vials), and Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tubes in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A2. 5. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (CMV) and HEX, JOE or VIC (Endogenous Internal Control (EIC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección y cuantificación del DNA de Citomegalovirus (CMV), a partir de muestras humanas de EDTA-plasma. El uso previsto del test es facilitar el cribado universal de la infección por CMV, así como el diagnóstico y gestión de CMV en pacientes trasplantados con órganos sólidos, y trasplantados con células madre. Este test puede emplearse en estas poblaciones para evaluar la necesidad de iniciar un tratamiento antiviral, y para realizar mediciones seriadas de DNA en pacientes que están recibiendo una terapia anti-CMV, con el objeto de estudiar la respuesta a dicho tratamiento. Los resultados obtenidos con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit deben ser interpretados en el contexto de todos los resultados clínicos y obtenidos en el laboratorio. El DNA es extraído a partir de los especímenes clínicos, se amplifica mediante PCR en tiempo real, y se detecta mediante sondas específicas marcadas con una molécula fluorescente (*quencher*) específicos para CMV.

2. Introducción y explicación

Citomegalovirus (CMV) es un virus de doble cadena de DNA ampliamente extendido, que pertenece a la familia viral de herpesvirus, *Herpesviridae*, o herpesvirus-5 humano (HHV-5). Las infecciones por Citomegalovirus humano pueden cursar de manera asintomática en personas sanas, pero en pacientes inmunocomprometidos, dicha infección puede suponer un riesgo para su integridad vital. La transmisión puede darse vía transplacentaria a neonatos, o a través de la leche materna procedente de una madre infectada y excretora (infección congénita de CMV). También puede ocurrir mediante contacto íntimo o mediante trasplante procedente de (o por uso compartido de jeringuillas con) individuos infectados. Tal y como ocurre con otros herpesvirus, tras la recuperación de la infección inicial, CMV normalmente permanece latente, pero puede reactivarse en cualquier momento, durante el compromiso del sistema inmunitario por la inmunosupresión. De todos los herpesvirus, CMV porta el mayor número de genes dedicados a evadir la respuesta inmune innata y adquirida del hospedador. CMV infecta entre 60% y el 70% de adultos en países industrializados y cerca del 100% de los países emergentes.

En algunos casos, la infección en personas sanas puede producir una enfermedad leve que puede manifestarse con: fiebre, dolor de garganta, fatiga o inflamación de glándulas. Sin embargo, CMV puede causar de forma ocasional mononucleosis o hepatitis (afectaciones hepáticas). Las personas con un sistema inmune débil que contraen CMV pueden padecer síntomas más serios que afectan a los ojos, pulmones, hígado, esófago, estómago e intestino.

La infección congénita de CMV es una de las principales causas infecciosas mundiales causantes de sordera, así como de disfunciones cognitivas y del aprendizaje en bebés. Dicha infección ocurre cuando un bebé nace infectado con CMV, y se estima que uno de cada 200 bebés nace con infección por CMV. Los bebés positivos a CMV pueden manifestar problemas cerebrales, hepáticos, pulmonares, de bazo y de crecimiento, pero el problema a largo plazo más común en bebés recién nacidos con infección congénita de CMV es la pérdida de audición.

El diagnóstico de la infección por Citomegalovirus humano se confirma demostrando la presencia de virus infectivos, antígenos virales o DNA viral en muestras clínicas de pacientes infectados (incluyendo sangre y otros

fluidos corporales). Los test serológicos, destacando los test ELISA, se emplean comúnmente para el diagnóstico de la infección por CMV en personas mayores de 12 meses, pero los ensayos basados en la PCR son los actualmente considerados como el método de diagnóstico estándar para confirmar la infección congénita de CMV en recién nacidos.

3. Procedimiento

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y cuantificación del DNA de Citomegalovirus (CMV), a partir de muestras humanas de EDTA-plasma. Después del aislamiento del DNA, la detección de CMV se realiza mediante la amplificación de una región conservada de los genes *pp65* y *gB*, utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un **Control Interno** para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza el gen humano *housekeeping* como **Control Interno Endógeno (CIE)** (gen *RNasa P* presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Además, este kit contiene 5 viales liofilizados (CMV1Q1 a CMV1Q5) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico de CMV (CMV *q* Quantitative Standards) para la cuantificación del DNA viral de CMV en muestras clínicas. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", asegurando así la calidad de los resultados y la comparativa con los procedentes de otros laboratorios.

4. Reactivos suministrados

VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open format" con productos con control interno, y el anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexo 2).

- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μL , 20-200 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

Opcional:

- Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", u otro material de referencia (en caso de que el usuario final necesite calcular su propio factor de conversión si utiliza un flujo de trabajo diferente).

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit ha sido validado con varios flujos de trabajo, aunque el configurado por MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) empleando muestras de plasma (en adelante mencionado en este documento como flujo de trabajo VIASURE CMV q) es el aplicado en la validación analítica y clínica, y por tanto, el que sirve de base para la interpretación de los resultados.

Los diferentes flujos de trabajo validados se nombran a continuación:

	Matriz	Flujo de trabajo
1 (recomendado)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
2	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + VIASURE V-Lab96 Cyclor (CerTest Biotec S.L)
3	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
4	Plasma	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega) + CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
5	Plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Tabla 1. Método (flujo de trabajo) de matriz-extracción-amplificación validado con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Una vez que los CMV q Quantitative Standards han sido resuspendidos, son estables a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para dispensar una placa de 96 pocillos, pero deberían guardarse a 4° C (hasta 5 meses), o a -20° C o menos períodos de tiempo prolongados. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad de los Estándares Cuantitativos tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial CMV q Reaction-Mix ha sido reconstituido, puede mantenerse a 25°C $\pm$ 5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y

separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- No utilizar reactivos si el desecante no está presente o está roto dentro de los sobres del reactivo.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-CMV113L y VS-CMV113H). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- **No mezclar CMV q Quantitative Standards de diferentes kits y / o lotes.** Cada set de estándares cuantitativos ha sido validado para cada lote de mezcla de reacción con la que es proporcionado.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.

- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Use micropipetas calibradas y puntas apropiadas con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit y siga el procedimiento del test recogido en estas instrucciones de uso. Un pipeteo impreciso o mala paxis que conlleve la dispensación de volúmenes inexactos puede resultar en una cuantificación errónea.
- La curva estándar debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas, y debería de generarse añadiendo cada CMV q Quantitative Standard por triplicado.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Si se utiliza el Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", tenga en cuenta que la estabilidad de este estándar puede verse afectada debido a determinadas prácticas. Por ello, se recomienda reconstituirlo y alícuotarlo manteniendo la cadena de frío. Además, las alícuotas deberían ser de un único uso, ya que los ciclos de congelación-descongelación afectan la integridad del material de referencia.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para "open format" con productos con control interno y el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection kit ha sido validado en muestras humanas de EDTA-plasma. Otros tipos de muestras diferentes deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados a temperatura ambiente hasta 2 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras

biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 2 horas, se recomienda realizar el envío a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse congeladas a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clinical Infectious Diseases, 67(6), e1-e94).

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection kit ha sido validado con muestras de EDTA-plasma extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y amplificadas con CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

No obstante, aunque no se consideren flujos de trabajo de referencia, también se han validado otros procedimientos de extracción-amplificación empleado muestras de EDTA-plasma (ver tabla 1 en sección 5).

8.3. Flujo de trabajo de referencia de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit para el cálculo del Factor de Conversión (FC)

Antes de proceder con la cuantificación de CMV en muestras clínicas, se debe decidir de antemano el procedimiento de extracción-amplificación (flujo de trabajo) a seguir y mantenerlo en los análisis posteriores. Debido a que la concentración de CMV debe expresarse en Unidades Internacionales (International Units – IU-) y que los resultados cuantitativos se obtienen en copias por mL tras la interpolación sobre la curva de calibración, es necesario el cálculo de un factor de conversión (FC) para transformar los datos obtenidos en copias/mL a IU/mL. **El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y de los procedimientos de extracción y amplificación empleados (flujo de trabajo).**

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit ha sido validado con muestras de EDTA-plasma extraídas con MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y amplificadas con CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El factor de conversión se calculó empleando el Estándar Internacional de la OMS “1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)”, estableciéndose en un valor de **1.263 IU/copias**.

$$\text{IU/mL} = \text{copias/mL} \times 1,263$$

Por ejemplo, una carga viral establecida a 10.000 copias/mL en una muestra se corresponde con 12.630 IU/mL.

Otros flujos de trabajo fueron validados con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit. El FC obtenido para cada uno se recoge en las tablas A1.5 y A2.4 (ver Anexos 1 y 2, respectivamente), pero tenga en cuenta que

estos valores FC son aplicables solo con muestras de EDTA-plasma como matriz. No obstante, **cada laboratorio debe establecer su propio factor de conversión.**

Si desea disponer de una guía rápida para calcular su valor FC y una plantilla (en formato Excel) para proceder con dicho cálculo, visite el sitio web www.certest.es.

NOTA: Se ha observado que la **estabilidad del Estándar Internacional de la OMS puede verse afectada debido a determinadas prácticas**. Por ello, se recomienda reconstituirlo y alícuotarlo manteniendo la cadena de frío. Además, las alícuotas deberían ser de un único uso, ya que los ciclos de congelación-descongelación afectan la integridad del material de referencia.

8.4. Preparación de la curva estándar para el ensayo cuantitativo

Este kit contiene 5 viales liofilizados (CMV1Q1 a CMV1Q5) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico de CMV (CMV *q* Quantitative Standards) para la cuantificación del DNA viral de CMV en muestras clínicas. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", y pueden usarse para generar una curva estándar con la que determinar la cantidad de DNA viral de CMV de una muestra en IU/mL. El panel liofilizado de CMV *q* Quantitative Standards de VIASURE CMV *q* Real Time PCR Detection Kit está listo para su uso tras reconstituirlo en agua libre de RNAsa/DNAsa.

Los CMV *q* Quantitative Standards tienen las siguientes concentraciones:

CMV <i>q</i> Quantitative Standard	Concentración (copias/mL)
CMV1Q1	5×10^6
CMV1Q2	5×10^5
CMV1Q3	5×10^4
CMV1Q4	5×10^3
CMV1Q5	5×10^2

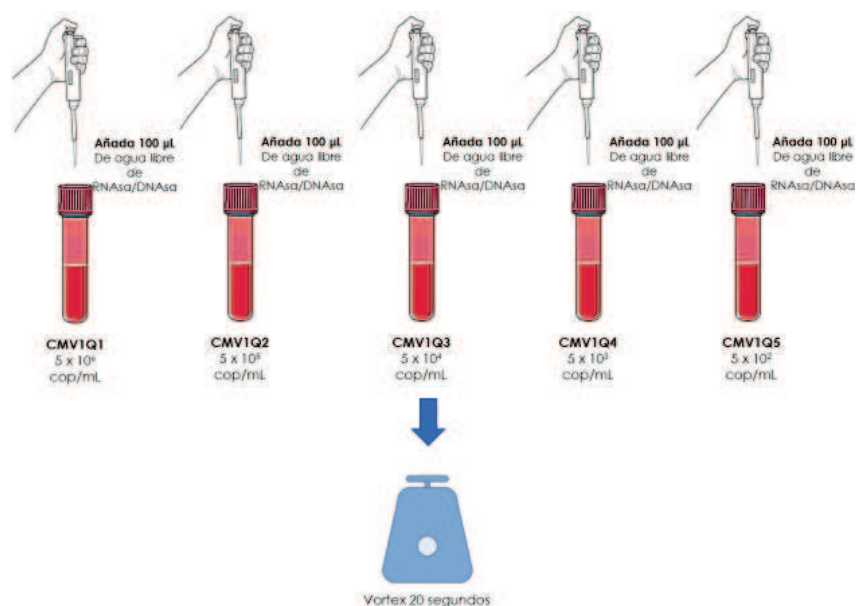
Tabla 2. CMV *q* Quantitative Standards y concentraciones.

Para la realización de un ensayo cuantitativo, coja el set de CMV *q* Quantitative Standards (sobres de aluminio, viales rojos), y prepare la curva estándar como se indica a continuación:

- Rehidrate el set de CMV *q* Quantitative Standards. Pipetee 100 µL de agua libre de RNAsa/DNAsa en cada CMV *q* Quantitative Standard liofilizado, cambiando la punta de la micropipeta entre viales.
- Agite cada vial en el vortex durante 20 segundos.

Los CMV *q* Quantitative Standards deben manipularse en un área del laboratorio separada del proceso de extracción, y se recomienda tenerlos rehidratados y vortexeados para cuando las muestras vayan a ser dispensadas.

Figura 1. Preparación del set de CMV q Quantitative Standard para el ensayo cuantitativo.



9. Interpretación de resultados

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de control interno endógeno (CIE) para verificar el correcto funcionamiento de la extracción y la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación de los CMV q Quantification Standards como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados de la muestra del paciente), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de los CMV q Quantitative Standards y del control negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal (es decir, exponencial) en los pocillos de los CMV q Quantitative Standards.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	CMV (FAM) ¹	Control Interno Endógeno (CIE) (HEX) ²	Interpretación de los controles
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	+	-	Válido
Control Negativo (CN)	-	-	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles.

¹ En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en los pocillos de los CMV q Quantitative Standards para el canal diana), todos los resultados se consideran "no válidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 Debido a que el gen *housekeeping* diana *RNAse P* está presente en células humanas nucleadas, no se espera que exista señal de amplificación para el control interno endógeno (CIE) en los CMV q Quantitative Standards.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los CMV q Quantitative Standards y control negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

La curva estándar puede generarse a partir de diluciones seriadas de los CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-5) empleando la fórmula:

$$Ct = m \log (Q) + b$$

Donde Ct = ciclo umbral; m = pendiente; Q = concentración; y b = intersección.

Las muestras positivas de concentración desconocida pueden cuantificarse interpolando su valor de Ct en la curva estándar siguiendo la fórmula:

$$Q = 10^{(Ct-b)/m}$$

Los resultados de cuantificación obtenidos se obtienen en las unidades de concentración del set de calibración.

NOTA: La curva estándar debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas, y debería de generarse añadiendo cada CMV q Quantitative Standard por triplicado.

Los resultados de la cuantificación son válidos si la curva estándar generada cumple con los siguientes parámetros de control:

- Eficiencia: 80-120%.
- $R^2: \geq 0,98$

La concentración de su "Muestra positiva" hace referencia a la concentración del DNA eluido tras la extracción, no de la muestra clínica original. **Para determinar la concentración de la muestra original, tenga en cuenta las diluciones correspondientes a la extracción y a la preparación de la PCR.**

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla si el flujo de trabajo utilizado ha sido el de referencia de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit (MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

CMV (FAM)	Control Interno Endógeno (HEX)	Interpretación para muestras de pacientes	
< 298.12 IU/mL	≤40 o sin señal ¹	Válido	Muestra CMV positiva no cuantificable
298.12 a 631.5 IU/mL	≤40 o sin señal ¹	Válido	Muestra CMV positiva cuantificable mediante extrapolación ²
631.5 a 631.5 x 10 ⁴ IU/mL	≤40 o sin señal ¹	Válido	Muestra CMV positiva cuantificable en el rango de cuantificación
> 631.5 x 10 ⁴ IU/mL	≤40 o sin señal ¹	Válido	Muestra CMV positiva cuantificable mediante extrapolación ³
No señal	≤ 35 ³	Válido	Diana no detectada
No señal	>35 o sin señal ³	No válido	Test Fallido – Repita el test ⁴

Tabla 3. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores, no señal = sin curva de amplificación.

1 El control interno endógeno (CIE) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 Un resultado positivo para el gen diana de CMV por debajo del rango de cuantificación permite una cuantificación de la carga viral de CMV mediante extrapolación de la curva estándar, pero los resultados pueden no ser precisos.

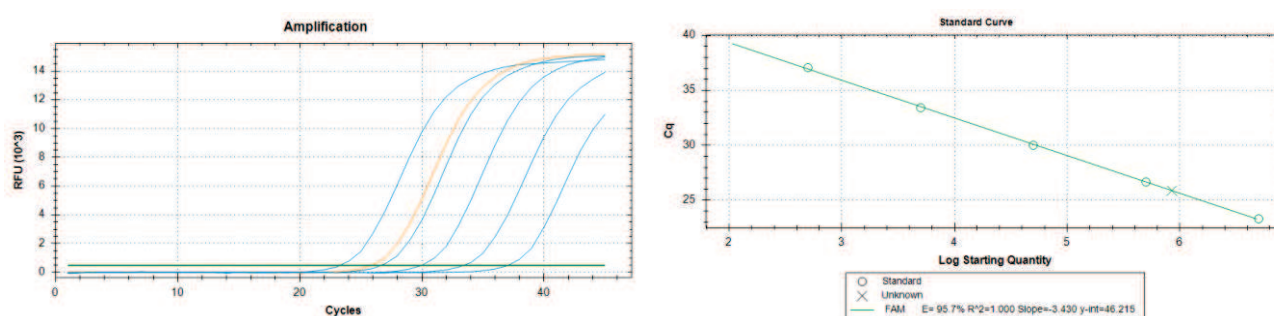
3 Un resultado positivo para el gen diana de CMV por encima del rango de cuantificación permite una cuantificación de la carga viral de CMV mediante extrapolación de la curva estándar, pero los resultados pueden no ser precisos. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100.

4 En el caso de que el gen diana de CMV resulte negativo, el CIE debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el control interno endógeno es un gen humano *housekeeping* que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o un valor de Ct >35 del control interno endógeno, el resultado se considera "no válido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el correcto rendimiento de cada etapa del flujo de trabajo, y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA asilado, o
- Volver a extraer y analizar otra alícuota de la misma muestra, o
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 2. Ejemplo de gráfica de curva estándar a partir de diluciones seriadas (azul) y cuantificación de una muestra positiva de concentración desconocida (naranja). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras de EDTA-plasma.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar niveles de copias molde diana por debajo del límite de cuantificación, pero los resultados pueden no ser cuantificables con precisión.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con CMV, ya sea por el gran número de copias de molde DNA que contiene cada vial de CMV q Quantitative Standard set, muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA viral durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de CMV.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones por CMV o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a valores imprecisos de DNA viral (pérdida de carga viral), incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Mantenimiento incorrecto de equipos usados comúnmente, especialmente micropipetas y sistemas de extracción/amplificación.
 - Uso de micropipetas no calibradas y /o puntas no apropiadas.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que estos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana virales.
- Resultados negativos no excluyen padecer la infección por CMV, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de

muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por CMV. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el/los patógeno/s.

- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades relacionadas con la inmunodepresión son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por CMV, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestras, tratamiento previo de la muestra etc... entre otros.
- El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y de los procedimientos de extracción y amplificación empleados (flujo de trabajo). Por ello, cada tipo de muestra-extracción-amplificación (flujo de trabajo) requiere del cálculo de su propio FC.

11. Control de calidad

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit contiene CMV q Quantitative Standards y un control negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar y cuantificar correctamente los resultados. Además, el control interno endógeno (CIE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La evaluación clínica de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit se realizó utilizando muestras de EDTA-plasma procedentes de pacientes que pasaron por un cribado universal para la infección por CMV, para el diagnóstico y gestión de CMV en pacientes trasplantados con órganos sólidos, y trasplantados con células madre, antes de un tratamiento antiviral. El estudio también incluyó pacientes que recibieron terapia anti-CMV.

Para determinar la precisión del diagnóstico clínico, se ha realizado una evaluación en colaboración con entidades nacionales e internacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de los sitios, el tipo de muestra y el flujo de trabajo. Los resultados fueron los siguientes:

	Lugar	Tipo de muestra	Proceso	Diana
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, España) en colaboración con Cerba Xpert (Saint Ouen L'Aumone, Francia)	EDTA-plasma	MagDEA® Dx SV Kit empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	CMV
2	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, España) en colaboración con Cerba Xpert (Saint Ouen L'Aumone, Francia)	EDTA-plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	CMV

Tabla 1. Resumen de los centros, tipos de muestras y flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas.

La correlación entre los métodos de extracción empleando VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit con ensayos comparadores se evaluó tal como se muestra en las siguientes figuras:

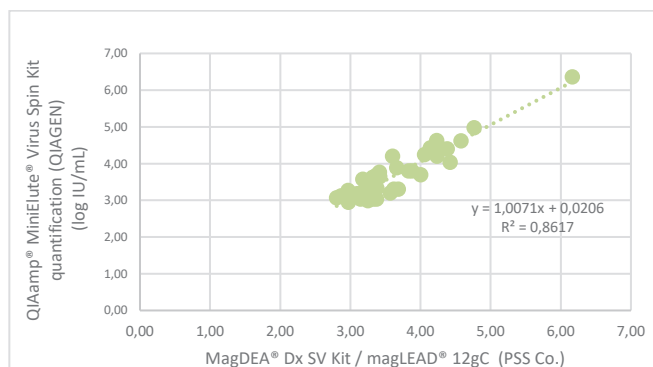


Figura 2. Correlación entre los resultados utilizando los métodos de extracción QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit y MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC empleando VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit.

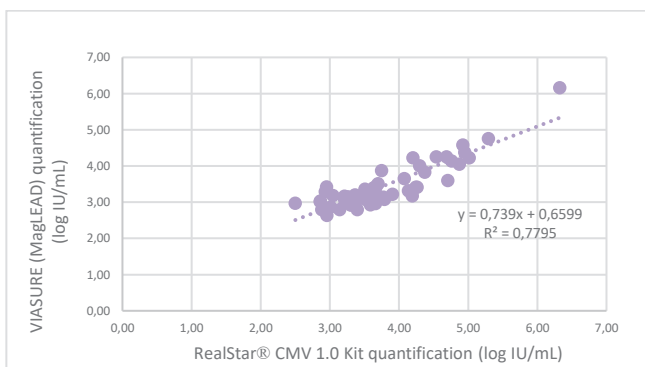


Figura 3. Correlación entre los resultados de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit y RealStar® CMV 1.0 Kit (Altona Diagnostics).

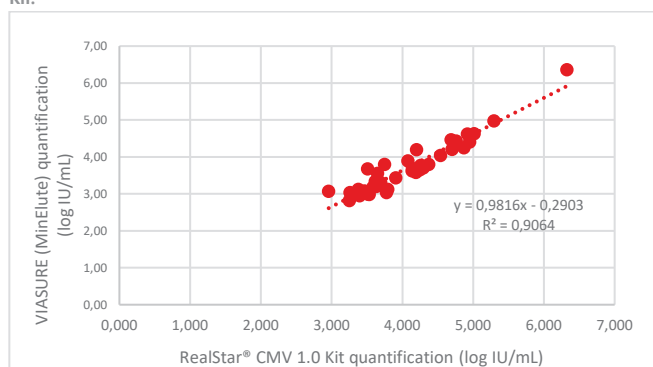


Figura 4. Correlación entre los resultados de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit y RealStar® CMV 1.0 Kit (Altona Diagnostics) empleando QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN).

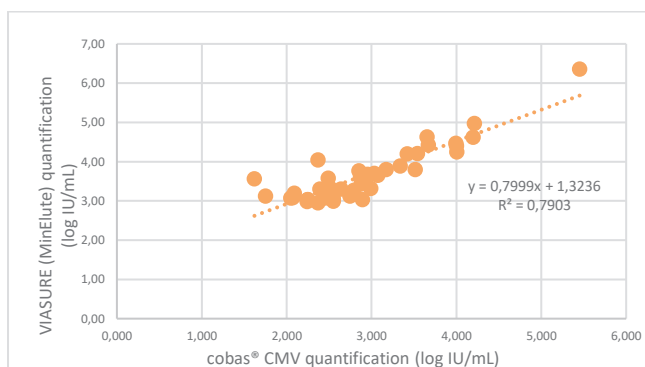


Figura 5. Correlación entre los resultados de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit y cobas® CMV (Roche Diagnostics) empleando QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN).

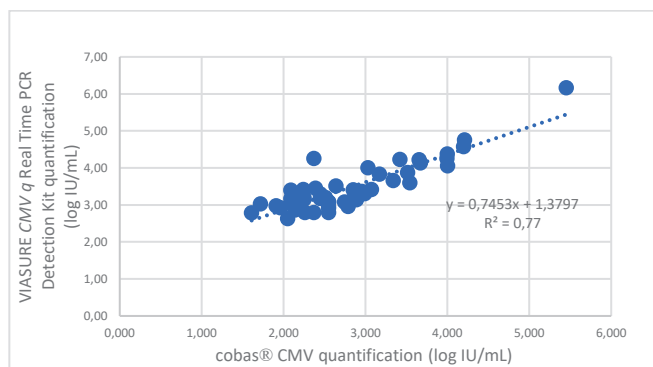


Figura 5. Correlación entre los resultados de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit y cobas® CMV (Roche Diagnostics) empleando MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC y muestras cuantificables.

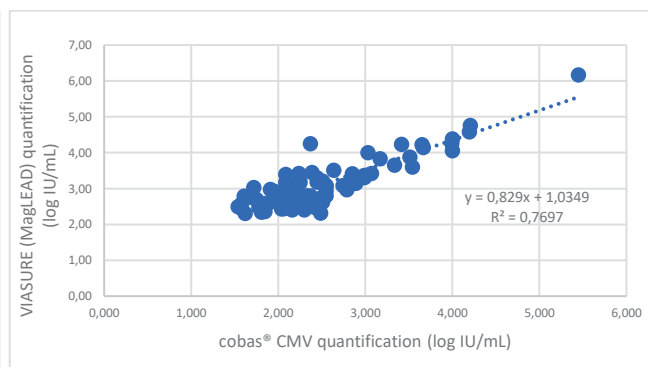


Figura 6. Correlación entre los resultados de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit y cobas® CMV (Roche Diagnostics) empleando MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC y muestras por encima del valor LoD de VIASURE (231 IU/mL).

Finalmente, la sensibilidad y la especificidad clínica de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit fue calculada, junto con los valores predictivos positivo y negativo (con un 95% de intervalo de confianza). Brevemente, cuando se observó una curva sigmoidea en una muestra clínica utilizando el ensayo VIASURE, este resultado se consideró positivo, mientras que aquellas muestras que no mostraron una curva de amplificación, se consideraron muestras negativas.

Lugar	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	cobas® CMV (Roche Diagnostics)	CMV	120	153	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.96-1)	1 (0.97-1)

Tabla 2. Valores verdadero positivo y negativo, valores falsos positivo y negativo, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, empleando MagDEA® Dx SV Kit / magLEAD® 12gC + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

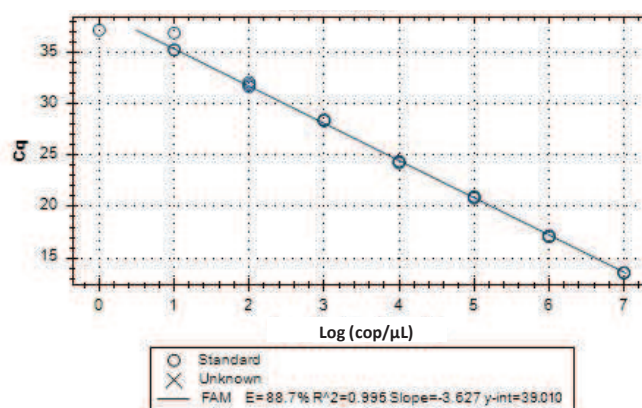
Los resultados muestran una alta concordancia para detectar y cuantificar CMV utilizando VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Rango lineal

La linealidad de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit se estableció empleando DNA sintético y específico de CMV, y posteriormente confirmada empleando material de referencia en muestras de plasma.

En primer lugar, se llevó a cabo la amplificación de diluciones seriadas 1:10 que contenían una concentración conocida (en el rango entre 10^7 a 10^1 copias/ μ L) de DNA específico de CMV (CMV1Q), obteniéndose los valores Ct de todas las diluciones testadas.

Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar de CMV (CMV1Q) (10^7 - 10^1 copias/ μ L). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).



Posteriormente, el rango lineal fue confirmado usando muestras negativas de plasma contaminadas con una concentración conocida de material de referencia de CMV ("1st WHO IS for human Cytomegalovirus NAT (NIBSC code 09/162)") y NATrol™ Cytomegalovirus Linearity Panel (Zeptometrix Corporation, Ref: NATCMV-LIN).

Con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit se obtuvieron amplificaciones en todas las diluciones testadas. El nivel de fluorescencia final se mantuvo, y no se observaron cruce de canales. El ensayo con el Estandar Internacional de la OMS ("1st WHO IS for human Cytomegalovirus") y con NATrol™ Cytomegalovirus Linearity Panel) mostraron resultados significativos.

Figura 8. Diluciones seriadas del estándar 1st WHO IS for human CMV NAT (5×10^6 - 2.29×10^3 IU/mL). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).

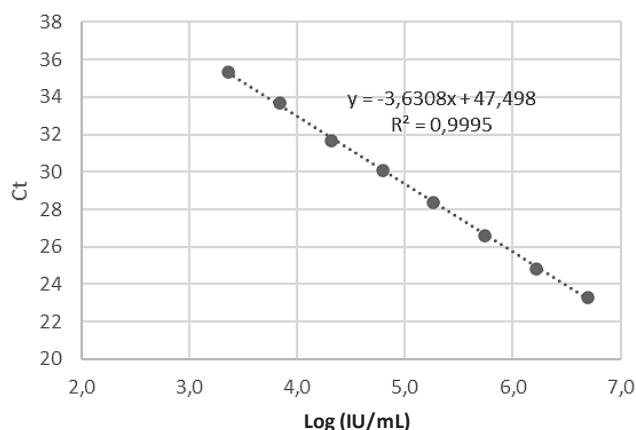
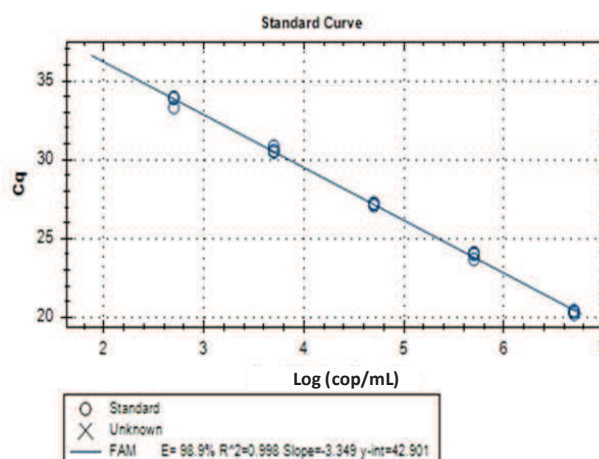


Figura 9. Diluciones seriadas del estándar NATrol™ Cytomegalovirus Linearity Panel (5×10^6 - 5×10^2 copias/mL). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).



12.3. Sensibilidad analítica

Para determinar el LoD del producto VIASURE, se realizaron diluciones seriadas del Estándar Internacional de la OMS ("1st WHO International Standard for human Cytomegalovirus NAT (NIBSC code: 09/162)") y se estableció una concentración LoD tentativa utilizando el material de referencia NATrol™ Cytomegalovirus Strain AD-169 (Zeptometrix, Ref: NATCMV-0002).

71 muestras por nivel de concentración preparadas con el Estándar Internacional de la OMS y 89 réplicas de la muestra preparada con el material de referencia de NATrol™ fueron extraídas con MagDEA Dx SV kit /

magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) y amplificadas en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit presentó un límite de detección de 236,04 copias/ mL, equivalente a 298,12 IU/mL para CMV, empleando el estándar internacional de la OMS y Probit Model para el análisis de los resultados, con una tasa de positividad $\geq 95\%$. Empleando el material de referencia de NATrol™ Cytomegalovirus Strain AD-169, VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit presentó un límite de detección de 100 copias/mL, equivalente a 504 IU/mL para CMV, con una tasa de positividad $\geq 95\%$.

Concentración CMV (copias/mL)	Concentración CMV (IU/mL)	Nº de réplicas	Nº de replicas positivas	Tasa de acierto (%)
500	631.5	71	71	100
400	505.2	71	71	100
300	378.9	71	70	98.6
200	252.6	71	63	88.7

Tabla 6. Sensibilidad analítica (límite de detección o LoD) analizado con muestras negativas de plasma contaminadas con el Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for human CMV NAT (NIBSC code 09/162)" y VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, (IU) = International Units.

Concentración CMV (copias/mL)	Concentración CMV (IU/mL)	Nº de réplicas	Nº de replicas positivas	Tasa de acierto (%)
100	504	89	85	95.5

Tabla 7. Sensibilidad analítica (límite de detección o LoD) analizado con muestras negativas de plasma contaminadas con NATrol™ Cytomegalovirus Strain AD-169 (Zeptomatrix, Ref: NATCMV-0002) y VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, (IU) = International Units.

12.4. Límite inferior de cuantificación (LLOQ)

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) es el valor de la concentración más baja a la que CMV se puede detectar y a la que el error total cumple el criterio de aceptación de ser menor del 40%. El LLOQ se estableció en 500 copias/mL, equivalente a 631,5 IU/mL, para CMV.

12.5. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos asociados trastornos comunes en los receptores de trasplantes o en los individuos inmunocomprometidos. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reactividad cruzada					
Adenovirus tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-	Virus Hepatitis A	-	<i>Plasmodium falciparum</i> cepa 3D7	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Herpes simplex virus 1 (HSV-1) cepa MacIntyre	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> tipo A1 y g885652	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Herpes simplex virus 2 (HSV-2) cepa MS	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human herpesvirus 6 (HHV6) cepa Z29 y tipos A y B	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
BK virus tipos 1b-2 y IV	-	JC virus tipos 1A y 2B	-	<i>Toxoplasma gondii</i> tipo II	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serotipo 1/2b y serovar 4b	-	<i>Varicella-Zoster Virus</i> cepa Ellen	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
Epstein-Barr virus	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	Parvovirus B19 genotipos 1, 2 y 3a	-
<i>Escherichia coli</i> cepa O.1285;O18:H7:K1	-				

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.6. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a DNA de Citomegalovirus, cepas Merlin y AD-169 (como referencias), mostrando un resultado positivo.

ANEXO 1

OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CMV106L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CMV106H
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CMV112L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CMV112H
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CMV113L
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CMV113H

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como control interno Endógeno (CIE) (gen *RNasa P* presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Además, este kit contiene 5 viales liofilizados (CMV1Q1 a CMV1Q5) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico de CMV (CMV q Quantitative Standards) para la cuantificación del DNA viral de CMV en muestras clínicas. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", asegurando así la calidad de los resultados y la comparativa con los procedentes de otros laboratorios.

Diana	Canal	Gen
CMV	FAM	<i>pp65</i> y <i>gB</i>
Control Interno Endógeno (CIE)	HEX, VIC o JOE *	<i>RNasa P</i> humana

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
CMV q 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	5 (1 vial por concentración)
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit con Ref.VS-CMV106L, VS-CMV106H, VS-CMV112L y VS-CMV112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
CMV q 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	5 (1 vial por concentración)
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CMV113L y VS-CMV113H.

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Protocolo para el Factor de Conversión

CMV q Quantitative Standards están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", y pueden usarse para generar una curva estándar con la que determinar la cantidad de DNA viral de CMV de una muestra en IU/mL. **El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y de los procedimientos de extracción y amplificación empleados (flujo de trabajo).** Por ello, se debe decidir y establecer de antemano el procedimiento de extracción-amplificación (flujo de trabajo) para el que se vaya a calcular dicho FC, y mantenerlo en los análisis posteriores.

El flujo de trabajo de referencia establecido a usar con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit es el que combina muestras de EDTA-plasma extraídas con **MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)** y **amplificadas con CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)**. Si se establece este flujo de trabajo, la concentración de las muestras en IU/mL puede calcularse empleando el valor FC igual a **1,263 IU/copias**, tal y como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{IU/mL} = \text{copias/mL} \times 1,263$$

Otros flujos de trabajo fueron validados con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit. El FC obtenido para cada uno se recoge en la tabla A1.5:

	Matriz	Flujo de trabajo	Factor de Conversión (FC) (IU/copias)
1 (recomendado)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.263
2	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L)	1.03
3	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	1.30
4	Plasma	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega) + CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	2.12
5	Plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.86

Tabla A1 5. Cálculo del Factor de Conversión (FC) con diferentes métodos de extracción-amplificación utilizando muestras de plasma contaminado con una concentración conocida del Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for human CMV NAT" (NIBSC 09/162). (IU) = International Units.

Si se establece otro flujo de trabajo, entonces el valor FC debe ser calculado por el usuario. Si desea disponer de una guía rápida para calcular su valor FC y una plantilla (en formato Excel) para proceder con dicho cálculo, visite el sitio web www.certest.es.

A1.3.2 Estándares cuantitativos liofilizado

CMV q Quantitative Standards contienen una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir los CMV q Quantitative Standards liofilizados (viales rojos) añadiendo a cada vial 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. Se requiere incluir al menos una réplica de cada CMV q Quantitative Standard y una réplica del control negativo en cada carrera para cada ensayo. Sin embargo, la curva estándar debería de generarse añadiendo cada CMV q Quantitative Standard por triplicado, al igual que debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas.

Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de cada CMV *q* Quantitative Standards reconstituido (CMV1Q1-5) (sobre de aluminio, vial rojo) y Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (CMV) y HEX, JOE o VIC (Control Interno Endógeno (CIE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CMV196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como control Interno Endógeno (CIE) (gen *RNasa P* presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Además, este kit contiene 5 viales liofilizados (CMV1Q1 a CMV1Q5) con diferentes concentraciones estandarizadas de DNA específico de CMV (CMV q Quantitative Standards) para la cuantificación del DNA viral de CMV en muestras clínicas. Estos estándares cuantitativos están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", asegurando así la calidad de los resultados y la comparativa con los procedentes de otros laboratorios.

Diana	Canal	Gen
CMV	FAM	<i>pp65</i> y <i>gB</i>
Control Interno Endógeno (CIE)	HEX, VIC o JOE *	<i>RNasa P</i> humana

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
CMV q Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
CMV q Quantitative Standards (CMV1Q1-CMV1Q5)	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	5 (1 vial por concentración)
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CMV196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Protocolo para el Factor de Conversión

CMV q Quantitative Standards están calibrados con respecto al Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC code: 09/162)", y pueden usarse para generar una curva estándar con la que determinar la cantidad de DNA viral de CMV de una muestra en IU/mL. **El factor de conversión (FC) es dependiente del tipo de muestra testada y de los procedimientos de extracción y amplificación empleados (flujo de trabajo).** Por ello, se debe decidir y establecer de antemano el procedimiento de extracción-amplificación (flujo de trabajo) para el que se vaya a calcular dicho FC, y mantenerlo en los análisis posteriores.

El flujo de trabajo de referencia establecido a usar con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit es el que combina muestras de EDTA-plasma extraídas con **MagDEA Dx SV Kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)** y **amplificadas con CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)**. Si se establece este flujo de trabajo, la concentración de las muestras en IU/mL puede calcularse empleando el valor FC igual a **1,263 IU/copias**, tal y como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{IU/mL} = \text{copias/mL} \times 1,263$$

Otros flujos de trabajo fueron validados con VIASURE CMV q Real Time PCR Detection Kit. El FC obtenido para cada uno se recoge en la tabla A2.4:

	Matriz	Flujo de trabajo	Factor de Conversión (FC) (IU/copias)
1 (recomendado)	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.263
2	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L)	1.03
3	Plasma	MagDEA Dx SV kit / magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	1.30
4	Plasma	Maxwell® RSC 16 Viral TNA/ Maxwell® RSC (Promega) + CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	2.12
5	Plasma	QIAamp® MiniElute® Virus Spin Kit (QIAGEN) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	1.86

Tabla A2 4. Cálculo del Factor de Conversión (FC) con diferentes métodos de extracción-amplificación utilizando muestras de plasma contaminado con una concentración conocida del Estándar Internacional de la OMS "1st WHO International Standard for human CMV NAT" (NIBSC 09/162). (IU) = International Units.

Si se establece otro flujo de trabajo, entonces el valor FC debe ser calculado por el usuario. Si desea disponer de una guía rápida para calcular su valor FC y una plantilla (en formato Excel) para proceder con dicho cálculo, visite el sitio web www.certest.es.

A2.3.2 Estándares cuantitativos liofilizados

CMV q Quantitative Standards contienen una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir los CMV q Quantitative Standards liofilizados (viales rojos) añadiendo a cada vial 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir al menos una réplica de cada CMV q Quantitative Standard y una réplica del control negativo en cada carrera). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.4 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. Se requiere incluir al menos una réplica de cada CMV q Quantitative Standard y una réplica del control negativo en cada carrera para cada ensayo. Sin embargo, la curva estándar debería de generarse añadiendo cada CMV q Quantitative Standard por triplicado, al igual que debería incluirse en la misma carrera que las muestras a ser cuantificadas.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de CMV q Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de cada CMV q Quantitative Standards reconstituido (CMV1Q1-5) (sobre de aluminio, vial rojo) y Negative Control (vial morado), y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (CMV) y HEX, JOE o VIC (Control Interno Endógeno (CIE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

1. CMV Infection Laboratory Testing | CDC. (n.d.). Retrieved April 6, 2022, from <https://www.cdc.gov/cmvp/clinical/lab-tests.html>
2. Gupta, M., & Shorman, M. (2021). Cytomegalovirus. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459185/>
3. Plotkin, S. A., & Boppana, S. B. (2019). Vaccination against the human cytomegalovirus. *Vaccine*, 37, 7437–7442. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.089>
4. Stockdale, L., Nash, S., Nalwoga, A., Painter, H., Asiki, G., Fletcher, H., & Newton, R. (2018). Human cytomegalovirus epidemiology and relationship to tuberculosis and cardiovascular disease risk factors in a rural Ugandan cohort. *PLoS ONE*, 13(2), e0192086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192086>
5. MM6-A Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline CLSI.
6. EP05-A Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline CLSI — Second Edition.
7. EP17-A Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; Approved Guideline CLSI
8. WHO manual for the preparation of secondary reference materials for in vitro diagnostic assays designed for infectious disease nucleic acid or antigen detection: calibration to WHO International Standards, Annex 6, TRS No 1004

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Unique Device Identification Identificación única de dispositivo		Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Control de Cambios / Change Control		
Versión /Version nº	Cambios /Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	18/04/2022

Table A 3. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 18th April 2022.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01

