

GeneProof Cytomegalovirus (CMV) PCR Kit


Producto médico para diagnóstico in vitro

Este kit ha sido fabricado de conformidad con la Directiva 98/79/CE como producto médico para diagnóstico in vitro y ha sido diseñado para su uso profesional en laboratorios clínicos y de investigación especializados.

CONTENIDO DEL KIT

REF	Versión ISIN CI incluido en MasterMix			Versión ISEX CI suministrado en un tubo separado Control de extracción y de inhibición de la PCR		
	CMV/ISIN/025 25 rxn	CMV/ISIN/050 50 rxn	CMV/ISIN/100 100 rxn	CMV/ISEX/025 25 rxn	CMV/ISEX/050 50 rxn	CMV/ISEX/100 100 rxn
MasterMix						
CMV	1x750 µl	2x750 µl	4x750 µl	1x750 µl	2x750 µl	4x750 µl
Calibrator CMV 10 ⁴ cp/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Calibrator CMV 10 ³ cp/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Calibrator CMV 10 ² cp/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Calibrator CMV 10 ¹ cp/µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl	1x200 µl
Internal Standard						
CMV	-	-	-	1x1000 µl	1x1000 µl	2x1000 µl

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

Este kit puede ser transportado a una temperatura inferior -20 °C. El kit permanecerá estable al menos hasta la fecha de caducidad impresa en el paquete, si la temperatura de almacenamiento se mantiene entre (-20 ± 5 ° C). Los componentes son estables durante un máximo de 5 ciclos repetidos de congelación/descongelación después del primer uso de un vial en particular. El componente debe usarse antes de la fecha de caducidad o 30 días después del primer uso de un vial en particular (lo que ocurra primero).

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Secuencia diana	Región de ADN específica, conservada de un gen de copia única codificante del antígeno 4 IE
Especificidad analítica	Citomegalovirus humano (CMV), 100 %
Sensibilidad analítica (LoD) (probabilidad del 95 %)	Hasta 122,594 IU/ml (para CMV NIBSC 09/162 mediante extracción manual utilizando GeneProof PathogenFree ADN Isolation Kit), hasta 165,237 IU/ml (para CMV NIBSC 09/162 mediante extracción automatizada con croBEE NA16 Nucleic Acid Extraction System)
Especificidad diagnóstica	90,67% (CI _{95%} : 81,15% - 95,85%)
Sensibilidad diagnóstica	92,86% (CI _{95%} : 64,17% - 99,63%)
Rango lineal	10 ¹⁰ cp/ml - 10 ^{2,5} cp/ml con una exactitud de ± 0,5 log (extracción manual utilizando GeneProof PathogenFree DNA Isolation Kit o extracción automatizada con croBEE NA16 Nucleic Acid Extraction System)
Rango dinámico	10 ¹⁰ - 122,594 cp/ml (extracción manual utilizando GeneProof PathogenFree DNA Isolation Kit) 10 ¹⁰ - 165,237 cp/ml (extracción automatizada con croBEE NA16 Nucleic Acid Extraction System)
Tipos de muestras validadas	Orina*, plasma, sangre entera, suero
Evaluación externa de calidad	Pruebas realizadas con regularidad en paneles de evaluación externa de calidad QCMD e Instand e.V
Estatuto regulador	CE ₁₀₂₃ IVD

El sistema de gestión de calidad está certificado de conformidad con los requisitos de la norma ČSN EN ISO 13485 ed.2:2016

* validado solamente mediante extracción manual utilizando GeneProof PathogenFree ADN Isolation Kit

INTERFERENCIA

Las pruebas de interferencias se realizaron utilizando plasma, suero y orina negativos con un nivel establecido de marcadores bioquímicos que podrían ser posibles interferencias endógenas.

Las muestras clínicas negativas se enriquecieron con control positivo de CMV a 3x LoD (límite de detección). Niveles elevados de bilirrubina (342 µmol/L), albúmina (60g/L), hemoglobina (2g/L), urea (42.9mmol/L), ácido úrico (1.4 mmol/L) y D-glucosa (55 mmol/L) han sido probados en presencia y ausencia de ADN de CMV en muestras de plasma y suero.

Diferentes niveles de bilirrubina, urea, ácido úrico, albúmina, pH bajo, alto nivel de pH y D-glucosa se han probado en la presencia y ausencia de ADN de CMV en muestras de orina. La evaluación y la configuración de los valores patológicos para las pruebas de interferencia se realizaron de acuerdo con las directrices EP7-A2 de CLSI, las recomendaciones y directrices del hospital (http://www.southend.nhs.uk/media/180421/pf_biochemistry_reference_intervals.pdf) y las recomendaciones de la Sociedad Checa de bioquímica clínica.

PLASMA

Sustancia probada	Concentración probada	Inhibición observada	Sustancia probada	Concentración probada	Inhibición observada
Albúmina	60 g/L	Parcial	Hemoglobina	2 g/L	Ninguna
Bilirrubina	342 µmol/L	Parcial	Urea	42,9 mmol/L	Ninguna
Glucosa	55 mmol/L	Ninguna	Ácido úrico	1,4 mmol/L	Ninguna

SUERO

Sustancia probada	Concentración probada	Inhibición observada	Sustancia probada	Concentración probada	Inhibición observada
Albúmina	60 g/L	Parcial	Hemoglobina	2 g/L	Ninguna
Bilirrubina	342 µmol/L	Ninguna	Urea	42,9 mmol/L	Ninguna
Glucosa	55 mmol/L	Ninguna	Ácido úrico	1,4 mmol/L	Ninguna

ORINA

Sustancia probada	Concentración probada	Inhibición observada	Sustancia probada	Concentración probada	Inhibición observada
Albúmina	5 %	Ninguna	pH	Ambiente ácido (pH 4)	Parcial
Bilirrubina	1 % (w/v)	Ninguna	pH	Ambiente alcalino (pH 9)	Ninguna
Glucosa	0.1% (w/v); 1% (w/v)	Parcial	Ácido úrico	5 mmol/L	Ninguna
Urea	300 mM; 600 mM	Ninguna			

Los niveles probados de las sustancias endógenas interferentes no influyen de manera significativa en la sensibilidad de la detección de CMV realizada con el kit GeneProof CMV PCR.

PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El kit de PCR está destinado a la detección del citomegalovirus humano (CMV) mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. La detección del CMV se basa en el principio de la amplificación de la secuencia conservada específica de ADN del gen de copia única para el antígeno 4 IE y en la medición del crecimiento de la fluorescencia. La presencia del CMV se indica por el crecimiento de fluorescencia del fluoróforo FAM. En la mezcla maestra está incorporado el control interno (CI) que controla la posible inhibición de PCR (versión ISIN), o al ser suministrado por separado, controla también la calidad del aislamiento de ADN (versión ISEX). La amplificación positiva del CI se detecta en el canal fluorescente para el fluoróforo HEX. El kit de detección utiliza la tecnología "hot start" que minimiza las reacciones no específicas y garantiza una sensibilidad máxima. La mezcla maestra lista para usar, contiene uracilo-ADN-glicosilasa (UDG), eliminando la posible contaminación de la PCR por productos de amplificación. El kit está diseñado para el diagnóstico in vitro y proporciona una detección cualitativa y cuantitativa.

Versión ISIN

En esta versión del kit, el control interno (CI) está incluido en el tubo de MasterMix. Esta versión del kit facilita el control efectivo de la inhibición de la reacción de PCR.

Versión ISEX

En esta versión del kit, el control interno (CI) se proporciona como elemento independiente dentro del kit. Esta versión del kit se puede utilizar tanto para controlar la inhibición de la reacción de PCR como para el control de la eficacia del aislamiento de los ácidos nucleicos.

PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

La toma de todos los tipos de muestras, excepto de sangre, deben ser realizadas en un tubo de ensayo estéril sin medio de transporte y transportarlas en un plazo de 12 horas a una temperatura entre +2°C y +8 °C. Es necesario tomar muestras de hasta 2 ml en caso de fluidos corporales (sangre entera, plasma, suero, orina); Muestreo de sangre: una muestra de sangre periférica incoagulable debe tomarse como muestra en EDTA y transportarse al laboratorio a una temperatura entre +2°C y +8°C en un plazo de 24 horas; Se analizan muestras de orina en caso de síntomas de glomerulonefritis. En caso de almacenamiento prolongado, mantenga todas las muestras congeladas a una temperatura inferior a -10 ° C.

ASLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ácidos nucleicos debe realizarse mediante kits de extracción disponibles en el mercado, de acuerdo con los protocolos para la extracción de material clínico en particular. El fabricante recomienda los siguientes kits de extracción:

GeneProof PathogenFree DNA Isolation Kit
croBEE NA16 Nucleic Acid Extraction System

Al usar las versiones ISEX de los kits de, el CI debe agregarse directamente a la muestra al comienzo del proceso de aislamiento, de modo que 1 µl del volumen final de elución resultante contenga 0,1 µl del CI:

Volumen de elución	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Control Interno	2.5 µl	5 µl	10 µl	20 µl

PREPARACIÓN DE LA PCR

1. Agite suavemente y centrifugue brevemente los tubos conteniendo la MasterMix y los Calibradores.
2. Adicione 30 µl de la muestra maestra en los tubos de PCR.
3. Agregue 10 µl de la muestra de ácido nucleico extraído o 10 µl del calibrador en los tubos de PCR individuales. El volumen final de la mezcla de reacción será de 40 µl. Es necesario mantener todos los componentes a +2 ° C a +8 ° C durante la preparación de la PCR. El cliente tiene que usar su propio control negativo en forma de agua, tampón o aislamiento de material clínico negativo en cada prueba. Los 4 calibradores deben usarse para configurar la curva estándar para la detección cuantitativa.
4. Cierre los tubos, centrifugue brevemente, insértelos en el dispositivo y deje que ocurra la amplificación de acuerdo con el siguiente perfil de PCR. ¡Tenga mucho cuidado al manipular los calibradores o el material clínico; un manejo incorrecto puede provocar contaminación y consecuente deterioro de los componentes del kit! El fabricante no es responsable por el deterioro del kit debido a un manejo o almacenamiento incorrectos.

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Paso	Temperatura	Tiempo	Dato recopilado	Ciclos
Hold	37 °C	2 min		1
Hold	95 °C	10 min		1
	95 °C	5 s		
PCR	60 °C	40 s	FAM + HEX	45
	72 °C	20 s		

INSTRUMENTOS

El Kit GeneProof Cytomegalovirus (CMV) PCR está diseñado para su uso en dispositivos de PCR en tiempo real de varios fabricantes:

croBEE Real-Time PCR System

Applied Biosystems 7300 / 7500 Real-Time PCR System

AriaMx Real-Time PCR System

CFX Connect™ / CFX96™/ Dx Real-Time PCR Detection System

LightCycler® 2.0 / 480

LineGene 9600 / 9600 Plus

Mic qPCR Cycler

QuantStudio™ 3/5 Real-Time PCR System

Rotor-Gene 3000 / 6000 / Q

SLAN® Real-Time PCR System

StepOne™/StepOne Plus™ Real-Time PCR System

Canales requeridos: FAM, HEX

La compañía GeneProof comprueba regularmente los kits de diagnóstico en distintos tipos de instrumentos. La lista actualizada está disponible en www.geneproof.com o puede solicitarla escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico: support@geneproof.com.

EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Canal FAM	Canal HEX	Resultado	Interpretación
		Válido	CMV Positivo
		Válido	CMV Positivo
		Válido	CMV Negativo
		No válido	

EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA DETECCIÓN

Utilice la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración del virus en copias/ml, tomando en cuenta la cantidad del material extraído:

$$cp/ml = \frac{SC \times EV}{IV}$$

SC - Concentración de la muestra (cp/μl)
 EV - Volumen de elución (μl)
 IV - Volumen de extracción (ml)

$$IU/ml = \frac{SC \times EV \times 1}{IV}$$

Puede usar la calculadora para la conversión de la concentración de patógenos en www.geneproof.com para facilitar el cálculo.

ADVERTENCIA

El único Manual de uso válido para cada kit forma parte del embalaje; el fabricante dispone de un manual para cada lote de producción que entrega a petición. Una vez utilizado el kit, se recomienda desecharlo según la legislación vigente, teniendo en cuenta que el kit no contiene sustancias peligrosas, infecciosas o tóxicas que estén sometidas a normas de seguridad especiales, y que el embalaje está fabricado de papel y de polipropileno. En caso de cualquier duda contacte con nuestro departamento de atención al cliente.

Atención al cliente y soporte técnico

Tel.: +420543211679
 email: support@geneproof.com

Pedidos

Tel.: +420543211679
 email: sales@geneproof.com

