

Gebrauchsinformation Instruction Manual

virellaCMV

real time PCR Kit TM

Für den *in vitro* Nachweis von Zytomegalievirus-DNA in klinischem Probenmaterial.

NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE.

For the *in vitro* detection of Cytomegalovirus DNA in clinical specimens.
FOR RESEARCH USE ONLY.



G01077-96

G01077-32



96

32



gerbion® GmbH & Co. KG

Remsstr. 1

D-70806 Kornwestheim

Germany

phone: +49 (0)7154 806 20 0

fax: + 49 (0)7154 806 20 29

e-mail: info@gerbion.com

www.gerbion.com

Inhaltsverzeichnis

Komponenten	3
Abkürzungen	3
Transport und Lagerung	3
Anwendungszweck	3
Art und Beschaffenheit des Probenmaterials	4
Qualitätskontrolle	4
Produktgewährleistung	4
Einleitung	4
Testprinzip	5
Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	6
Wichtige Hinweise	6
Probenvorbereitung	7
Kontroll-DNA	7
Real time PCR	8
Interpretation der Ergebnisse	10
Troubleshooting	12

Komponenten

Die Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 bzw. 32 Nachweisreaktionen.

	Bezeichnung	Deckel- farbe	Inhalt	
			96	32
K1	Reaction Mix	gelb	2 x 770 µl	1 x 515 µl
K2	Positive Control	rot	1 x 100 µl	1 x 50 µl
K3	Negative Control	grün	1 x 100 µl	1 x 50 µl
K4	Control DNA	rot	2 x 240 µl	1 x 160 µl

Abkürzungen

DNA Desoxyribonukleinsäure

PCR Polymerase-Ketten-Reaktion

Transport und Lagerung

Der Transport des **virellaCMV** real time PCR Kit TM erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten des **virellaCMV** real time PCR Kit TM sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -18 °C zu lagern.

Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden! Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal 6 Monate verwendbar. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren (> zweimal) der Reagenzien vermeiden, da dadurch die Sensitivität verringert werden kann. Gegebenenfalls sollten die Kit-Komponenten aliquotiert werden.

Anwendungszweck

Der **virellaCMV** real time PCR Kit TM dient dem Nachweis von Zytomegalievirus-DNA in klinischem Probenmaterial mittels real time PCR in offenen real time PCR-Systemen (z.B. Eco, RotorGene, etc.).

Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist CMV-DNA, die aus klinischem Probenmaterial (z.B. Urin, Fruchtwasser, Blut, Proben aus dem Respirationstrakt) isoliert wurde.

Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem der gerbion GmbH & Co. KG wird jede Charge des **virellaCMV** real time PCR Kit TM gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

Produktgewährleistung

Diese Gebrauchsinformation gilt als vollständig und richtig zum Zeitpunkt ihrer Veröffentlichung. Die gerbion GmbH & Co. KG haftet keinesfalls für Neben- oder Folgeschäden, die sich im Zusammenhang mit oder in der Folge der Benutzung dieser Gebrauchsinformation ergeben. gerbion garantiert die volle Funktionsfähigkeit, wenn das Produkt entsprechend der in der Gebrauchsinformation angegebenen Anleitung erfolgt.

Der Käufer muss selbst bestimmen, ob das Produkt für seine spezielle Anwendung geeignet ist. gerbion behält sich vor, Produkte jederzeit zu modifizieren, um die Funktionalität oder das Design zu verbessern.

Einleitung

Das Zytomegalievirus (CMV) gehört zur Gruppe der humanpathogenen Herpesviren. Herpesviren besitzen eine lipidhaltige Hülle, in deren Inneren ein ikosaederförmiges Kapsid die doppelsträngige DNA umgibt.

Die Übertragung der Zytomegalieviren kann als Tröpfchen- oder Schmierinfektion, beim Stillen oder bei einer Bluttransfusion erfolgen. Grundsätzlich wird zwischen Primärinfektion und Reaktivierung einer latenten Infektion unterschieden.

Die Inkubationszeit beträgt bei Primärinfektion zwischen 4 und 12 Wochen. Charakteristisch für die Zytomegalie ist hohes, manchmal wochenlang anhaltendes Fieber mit erhöhten Leberwerten. In 99% der Fälle verläuft die Primärinfektion jedoch symptomlos oder mit nur geringen Krankheitssymptomen. Lebensbedrohende Komplikationen wie eine Myokarditis, Thrombozytopenie oder Pneumonie sind beim Immunkompetenten selten, sodass keine antivirale Therapie begonnen werden muss. Jedoch ist eine Zytomegalie während der Schwangerschaft vor

Röteln und Toxoplasmose die häufigste Ursache von embryo-fetalen Schädigungen.

Außerdem kann eine CMV-Neuinfektion oder eine CMV-Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten zu schwerwiegenden Problemen führen. Es kann zu einer CMV-assoziierten Kolitis mit Diarrhoen kommen, bei transplantierten Menschen (z.B. Nieren- oder Knochenmarktransplantiert) kann eine manifeste CMV-Reaktivierung zu einer Funktionsverschlechterung und womöglich sogar zum Verlust des Transplantates führen. Bei 30 % der AIDS-Patienten, die keine hochaktive antiretrovirale Therapie erhalten, befällt das Virus die Netzhaut und führt zum Erblinden.

Testprinzip

Der **virellaCMV** real time PCR Kit TM enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden, sowie zusätzliches Material für den Nachweis von CMV-DNA in klinischem Probenmaterial (z.B. Urin, Fruchtwasser, Blut, Proben aus dem Respirationstrakt).

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der CMV-spezifischen Fluoreszenzsonden. Die Detektion erfolgt im FAM-Kanal.

Zusätzlich verfügt der **virellaCMV** real time PCR Kit TM über eine Kontroll-DNA (K4), die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum einen das Aufdecken von Fehlern bei der DNA-Extraktion, zum anderen kann eine mögliche Inhibition der PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der DNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal.

Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- DNA Extraktionskit
- sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortexer
- real time PCR Gerät (z.B. Eco™ Real-Time PCR System, Illumina)
- optische PCR Gefäße mit Verschluss
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

Wichtige Hinweise

- Die **virellaCMV** real time PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der Good Laboratory Practice (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

Allgemeine Hinweise

- Die Anweisungen der Gebrauchsinformation sind einzuhalten.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Komponenten verschiedener Chargen des **virellaCMV** real time PCR Kit TM dürfen nicht zusammen verwendet werden.

Probenvorbereitung

Die **virellaCMV** real time PCR ist geeignet für den Nachweis von CMV-DNA, die zuvor mit Hilfe von geeigneten Methoden aus klinischem Probenmaterial isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur DNA-Isolierung verwendet werden, z.B.:

- NukEx Pure RNA/DNA (gerbion, Art. Nr. G05004)

Weitere Informationen zur Isolierung von DNA erhalten Sie in der Gebrauchsinformation des Extraktionskits oder vom technischen Service des Extraktionskit Herstellers.

Wichtig:

Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

Beachten Sie bitte auch den Abschnitt „Kontroll-DNA“, Seite 7.

Falls die real time PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die DNA-Extrakte entsprechend der Angaben des Extraktionskit Herstellers aufbewahrt werden.

Kontroll-DNA

Der **viarellaCMV** real time PCR Kit TM enthält eine Kontroll-DNA (K4), die zum einen als Kontrolle der DNA-Extraktion dient, zum anderen als Interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der PCR aufzeigt.

Verwendung als Extraktionskontrolle:

Die **viarellaCMV** Kontroll-DNA (K4) wird jeder Probe vor der eigentlichen Extraktion beigemischt. Dazu das für eine Extraktion benötigte Puffer-
volumen mit der Anzahl (N) der durchzuführenden Extraktionen multiplizieren und zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit einen zusätzlichen Ansatz berechnen. Von der Kontroll-DNA 5 µl pro Extraktion (also 5 µl x (N+1)) hinzupipettieren.

Wichtig: Ist im Extraktionsprotokoll eine Inkubation der Probe im ersten Puffer vorgesehen, so wird die Kontroll-DNA (K4) erst nach der Inkubation zu jeder Probe einzeln pipettiert.

Verwendung als Interne Kontrolle:

Sollte keine Kontrolle der DNA-Extraktion gewünscht sein, wohl aber eine Kontrolle der PCR, so kann die Kontroll-DNA (K4) erst beim Ansetzen der PCR zugegeben werden.

In diesem Fall ist die real time PCR nach Protokoll B anzusetzen.

Real time PCR

- Beachten Sie bitte die „Wichtigen Hinweise“ auf Seite 6.
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem real time PCR Gerät vertraut. Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR Lauf mindestens eine Positivkontrolle (K2) und eine Negativkontrolle (K3) enthalten sein sollten.
- Alle Reagenzien, müssen komplett aufgetaut, gevortext (den Reaktions-Mix (K1) NICHT vortexen) und kurz abzentrifugiert werden. Halten Sie die Reagenzien stetig gekühlt auf Eis oder in einem Kühlblock (+2 bis +8°C).

Durchführung:

Falls die Kontroll-DNA (K4) als Extraktionskontrolle verwendet werden soll, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-DNA (K4) nur zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

Protokoll A

Die Kontroll-DNA (K4) wurde zur DNA-Extraktion bereits zugegeben (siehe „Kontroll-DNA“, Seite 7). Der Reaktions-Mix (K1) enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe.

Die PCR wird wie folgt angesetzt:

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock stellen.
- **16 µl** des Reaktions-Mix (K1) in jedes Gefäß pipettieren.
- **4 µl** der DNA-Eluate (inklusive der Eluate der Wasserkontrolle), der Positivkontrolle (K2) und der Negativkontrolle (K3) in die entsprechenden Gefäße hinzupipettieren.
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Protokoll B

Die Kontroll-DNA wird ausschließlich zur Kontrolle der PCR verwendet (siehe „Kontroll-DNA“, Seite 7). In diesem Fall wird ein Master-Mix in einem Kühlblock bei +2 bis +8 °C oder auf Eis gemäß Tabelle 1 angesetzt. Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 1: Herstellung des Master-Mix (die Kontroll-DNA wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix Volumen
16,0 µl Reaktions-Mix (K1)	16,0 µl x (N+1)
0,5 µl Kontroll-DNA (K4)*	0,5 µl x (N+1)*

*Die durch Zugabe der Kontroll-DNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock stellen.
- **16 µl** des Master-Mixes in jedes Gefäß pipettieren.
- **4 µl** der DNA-Eluate (inklusive der Eluate der Wasserkontrolle), der Positivkontrolle (K2) und der Negativkontrolle (K3) in die entsprechenden Gefäße hinzupipettieren.
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

PCR Temperaturprofil

Für die real time PCR das in Tabelle 2 beschriebene Temperaturprofil benutzen.

Tabelle 2: real time PCR Temperaturprofil

1. Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
2. Amplifikation der DNA		
Anzahl der Zyklen	45	
Denaturierung	10 sec	95 °C
Annealing/Extension	30 sec	60 °C
	(Messung am Ende dieses Schrittes)	

Interpretation der Ergebnisse

Die CMV-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-DNA wird im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

- **Im FAM-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält CMV-DNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal nicht notwendig, da eine hohe CMV-DNA-Konzentration zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der Kontroll-DNA führen kann (Kompetition).

- **Im FAM-Kanal wird kein Signal detektiert, jedoch im VIC®/HEX/JOE™/TET:**

Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine CMV-DNA.

Das detektierte Signal der Kontroll-DNA schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften DNA-Extraktion bzw. einer PCR-Inhibition aus.

- **Weder im FAM- noch im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Es kann keine diagnostische Aussage gemacht werden.

Die real time PCR wurde inhibiert oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf.

Abbildung 1 und **Abbildung 2** zeigen Beispiele für positive und negative PCR Ergebnisse.

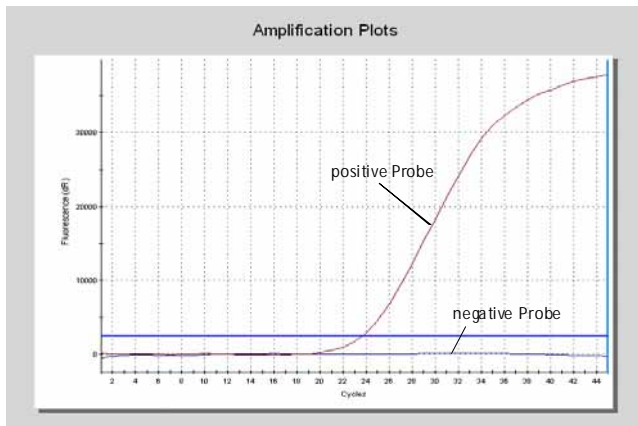


Abb 1: Die positive Probe zeigt eine Amplifikation im CMV-spezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

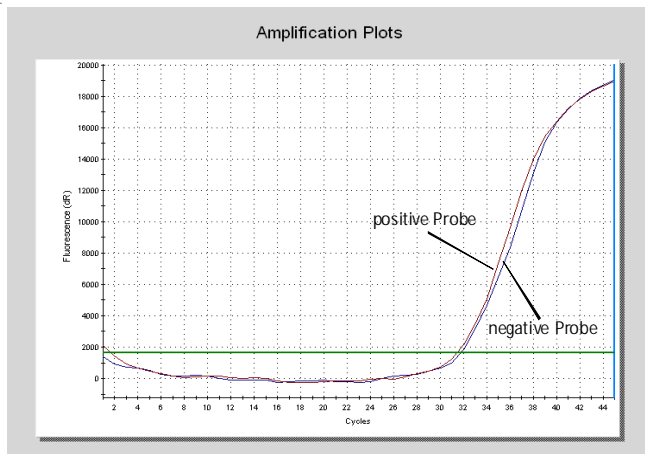


Abb. 2: Im VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal zeigen die positive und die negative Probe ein Signal auf. In diesem Fall liegt keine Inhibition der real time PCR vor, auch verlief die Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

Troubleshooting

Der folgende Troubleshooting Guide soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der real time PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an unsere Wissenschaftler unter info@gerbion.com.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle (K2)

- **Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen**
Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der CMV-spezifischen Amplifikation und den VIC®/HEX/JOE™/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-DNA (K4).
- **Fehlerhaftes Ansetzen der real time PCR**
Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den in „Durchführung“ auf den Seiten 8-9 beschriebenen Arbeitsschritten.
- **Fehlerhaftes real time PCR Temperaturprofil**
Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 2, Seite 9).
- **Falsche Lagerbedingungen des Kit oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum**
Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie auf Seite 3 unter „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-DNA (K4) und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal

- **Die real time PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein.**
Überprüfen Sie die real time PCR-Bedingungen (Seite 9).
- **real time PCR Inhibition**
Stellen Sie sicher, dass Sie eine der empfohlenen Extraktionsmethoden benutzen (siehe „Probenvorbereitung“, Seite 7) und beachten Sie die Herstellerangaben.

Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der DNA-Elution wird empfohlen).

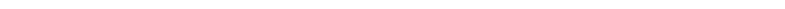
- **Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses**
Falls die Kontroll-DNA (K4) als Extraktionskontrolle eingesetzt wurde kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte DNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden. Kommerziell erhältliche Kits werden empfohlen. Halten Sie sich an das Herstellerprotokoll.
- **Falsche Lagerbedingungen des Kit oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum**
Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie auf Seite 3 unter „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM-Kanal der Negativkontrolle (K3)

- **Kontamination des real time PCR-Ansatzes**
Wiederholen Sie die real time PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der PCR Gefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle (K2) zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Gefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben.
Falls die Negativkontrolle (K3) in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die PCR mit einem neuen Kit.

Index

Components	2
Abbreviations	2
Transport and Storage	2
Intended Use	2
Sample Material	2
Quality Control	3
Product Warranty	3
Introduction	3
Principle of the Test	4
Equipment and Reagents to be Supplied by User	4
Important Notes	5
Preparation of Samples	5
Control DNA	6
Real time PCR	6
Data Analysis	9
Troubleshooting	11



Components

The reagents supplied are sufficient for 96 or 32 reactions.

	Labelling	Lid Colour	Content	
			96	32
K1	Reaction Mix	yellow	2 x 770 µl	1 x 515 µl
K2	Positive Control	red	1 x 100 µl	1 x 50 µl
K3	Negative Control	green	1 x 100 µl	1 x 50 µl
K4	Control DNA	red	2 x 240 µl	1 x 160 µl

Abbreviations

DNA Desoxyribonucleic Acid

PCR Polymerase Chain Reaction

Transport and Storage

The **virellaCMV** real time PCR Kit TM is shipped on dry ice. All components must be stored at -18°C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package. After initial usage, reagents are stable for up to six months. Avoid repeated thawing/freezing of the reagents, if necessary, aliquot kit components K1, K2, and K4.

Intended Use

The **virellaCMV** real time PCR Kit TM is a screening assay for the detection of Cytomegalovirus DNA using real time PCR microplate systems (such as Eco, RotorGene, etc.).

Sample Material

Starting material for the **virellaCMV** real time PCR is DNA isolated from clinical specimens (such as urine, amniotic fluid, blood, respiratory specimens etc.).

Quality Control

In accordance with gerbion's ISO-certified Quality Management System, each lot of the **virellaCMV** real time PCR Kit TM is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Product Warranty

gerbion guarantees the performance of all products when used according to the instructions given in the Instruction Manual. The purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Should any product fail to perform satisfactorily due to any reason other than misuse, gerbion will replace it free of charge or refund the price. We reserve the right to change, alter, or modify any product to enhance its performance and design.

Introduction

The human Cytomegalovirus (CMV) belongs to the family of *Herpesviridae*. Herpesviruses consist of a lipid envelope in which an icosahedral capsid encloses the double stranded DNA.

CMV can be transmitted by droplet or smear infection, during breast feeding and blood transfusion.

In general it can be differentiated between primary infection and reactivation of a latent infection.

Incubation time of the primary infection is between 4 to 12 weeks. Characteristic symptoms are high fever which can last for several weeks, often accompanied by raised liver values. However, in 99% of all cases the primary infection remains without or with weak symptoms. Life threatening complications such as myocarditis, thrombocytopaenia, or pneumonia only seldom occur in immunocompetent persons, therefore, antiviral therapy is not needed in most cases. However, cytomegaly during pregnancy is the main cause for embryo-foetal damages.

In immunosuppressed persons infection with CMV or reactivation of a latent infection can lead to severe problems such as CMV-associated colitis with diarrhoea. In patients with transplants (i.e. kidneys or bone marrow) reactivation of CMV infection can deteriorate the transplant's function or even lead to loss of the transplant. In 30 % of AIDS patients who do not receive highly active antiretroviral therapy, the Cytomegalovirus infects the retina causing blindness.

Principle of the Test

The **virellaCMV** real time PCR Kit TM contains specific primers and hydrolysis probes for the analysis of Cytomegalovirus DNA isolated from clinical specimens (such as urine, amniotic fluid, blood, respiratory specimens etc.).

The detection of the amplification is carried out in real time via hybridization and subsequent hydrolysis of the CMV-specific fluorescent probes. The emitted fluorescence is measured in the FAM channel.

Furthermore, **virellaCMV** real time PCR Kit TM contains a Control DNA (K4), which is detected in a second heterologous amplification system. Added during the extraction, the Control DNA (K4) allows not only the detection of PCR inhibition but also the detection of possible mistakes during DNA extraction. This greatly reduce the risk of false-negative results.

The fluorescence of the Control DNA (K4) is measured in the VIC®/HEX/JOE™/TET channel.

Equipment and Reagents to be Supplied by User

- DNA isolation kit
- sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortexer
- real time PCR instrument (z.B. Eco™ Real-Time PCR System, Illumina)
- optical PCR reaction tube with lid
- optional: Liquid handling systems for automation

Important Notes

- The **virellaCMV** real time PCR Kit TM must be performed in adequate laboratories by qualified personnel.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

General precautions

- Stick to the protocol described in the instruction manual.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other material must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with alcohol-free decontaminant.
- Do not combine **virellaCMV** real time PCR Kit TM components of different lot numbers.

Preparation of Samples

The **virellaCMV** real time PCR Kit TM is suitable for the detection of CMV DNA isolated from clinical specimens and environmental samples with appropriate methods.

Commercially available kits for DNA isolation are recommended:

- NukEx Pure RNA/DNA (gerbion, Cat. No. G05004)

Further information about DNA isolation are to be found in extraction kit manual or from the extraction kit manufacturer's technical service.

Important: In addition to the samples always run a 'water control' in your extraction, possible contaminations during DNA extraction will be detectable. Treat this water control analogous to a sample.

Please pay attention to the chapter 'Control DNA (K4)' on page 6.

If the real time PCR is not performed immediately, store extracted DNA according to the instructions given by the DNA extraction kit manufacturer.

Control DNA (K4)

A Control DNA (K4) is supplied to be used as extraction control. This allows the user to control the DNA isolation procedure and to check for possible real time PCR inhibition.

Control DNA (K4) used as extraction control:

virellaCMV Control DNA (K4) is added to each sample prior to extraction. To this end, multiply the buffer volume needed per extraction with the number of samples (including at least one water control) (N) plus 1 to compensate for inaccuracies in pipetting (N+1). Add 5 µl Control DNA (K4) per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the DNA isolation according to the manufacturer's instructions.

Important: In case the extraction protocol includes an incubation of the sample in the first buffer, add the Control DNA (K4) after the incubation to each sample separately.

Control DNA (K4) used as internal control:

If no control of the DNA extraction is desired, but a control of the PCR, the Control DNA (K4) can be added directly to the PCR Master Mix. In this case prepare the real time PCR according to protocol B.

Real time PCR

Important Points before Starting:

- Please pay attention to the 'Important Notes' on page 5.
- Before setting up the PCR familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run at least one Positive Control (K2) and one Negative Control (K3) should be included.
- Prior to each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, briefly vortexed (Do NOT vortex the Reaction Mix (K1) but mix thoroughly by pipetting up and down), and centrifuged very briefly. Afterwards place all reagents on ice or on a cooling block (+2 to +8°C).

Procedure

If the Control DNA (K4) is used as an extraction control, please follow protocol A. If the Control DNA (K4) is used only to detect possible inhibition/failure of the real time PCR, please follow protocol B.

Protocol A

The Control DNA (K4) was added during DNA extraction (see ,Control DNA (K4)', page 6). The Reaction Mix contains all of the components needed for PCR except the sample.

Real time PCR set up

- Put the number of optical PCR reaction tubes into the cooling block.
- Pipet **16 µl** of the Reaction Mix into each optical PCR reaction tube.
- Add **4 µl** of the eluates from the DNA isolation (including the eluate of the water control), the Positive Control (K2) and the Negative Control (K3) to the corresponding optical PCR reaction tube.
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Protocol B

The Control DNA (K4) is used exclusively for the control of the real time PCR (see ,Control DNA (K4)', page 6). In this case, prepare a Master Mix on ice or in a cooling block (+2 to +8°C).

The Master Mix contains all of the components needed for PCR except the sample. Prepare a volume of Master Mix for at least one sample more than required in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 1: Preparation of the Master Mix (Control DNA (K4) is added directly to the Master Mix)

Reaction Volume	Master Mix Volume
16.0 µl Reaction Mix (K1)	16.0 µl x (N+1)
0.5 µl Control DNA (K4)*	0,5 µl x (N+1)*

*The increase in volume caused by adding the Control DNA (K4) is not taken into account when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

- Put the number of optical PCR reaction tubes into the cooling block.
- Pipet **16 µl** of the Master Mix into each optical PCR reaction tube.
- Add **4 µl** of the eluates from the DNA isolation (including the eluate of the water control), the Positive Control (K2), and the Negative Control (K3) to the corresponding optical PCR reaction tube
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Real time PCR Temperature Profile

For the real time PCR and the following analysis use the thermal profile shown in Table 2.

Table 2: real time RT-PCR thermal profile

1. Initial Denaturation	5 min	95°C
2. Amplification of DNA		
Number of cycles	45	
Denaturation	10 sec	95°C
Annealing	30 sec	60°C
	(acquire at the end of this step)	

Data Analysis

The Cytomegalovirus-specific amplification is measured in the FAM channel. The amplification of the Control DNA (K4) is measured in the VIC®/HEX/JOE™/TET channel.

Following results can occur:

A signal in the FAM-channel is detected:

- **The result is positive, the sample contains CMV DNA.**
In this case, detection of a signal of Control DNA (K4) in the VIC®/HEX/JOE™/TET channel is inessential, as high concentrations of CMV DNA may reduce or completely inhibit amplification of the Control DNA (K4).

No signal in the FAM channel but a signal in the VIC®/HEX/JOE™/TET channel is detected:

- **The result is negative, the sample does not contain CMV DNA.**
In case of using the Control DNA (K4) as an extraction control, the signal of the Control DNA (K4) excludes the possibilities of DNA isolation failure and/or PCR inhibition.

Neither in the FAM channel nor in the VIC®/HEX/JOE™/TET channel a signal is detected:

- **A diagnostic statement cannot be made.**
The DNA isolation was not successful or an inhibition of the PCR has occurred. In case the Control DNA (K4) was added during DNA isolation and not directly to the PCR Master Mix, the Negative Control (K3) is negative in both channels.

Figure 1 and Figure 2 show examples for positive and negative real time PCR results.

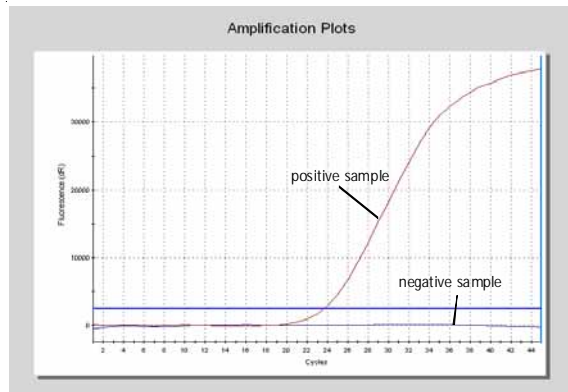


Figure 1: The positive sample shows CMV-specific amplification in the FAM channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

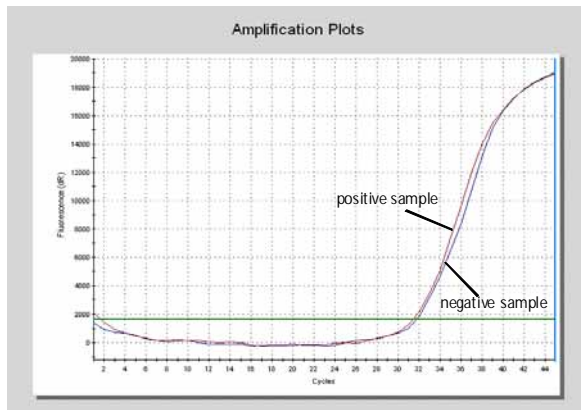


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample shows a signal in the Control DNA (K4) specific VIC®/HEX/JOE™/TET channel. The amplification signal of the Control DNA (K4) in the negative sample shows, that the missing signal in the CMV-specific FAM channel is not due to PCR inhibition or failure of DNA isolation, but that the sample is a true negative.

Troubleshooting

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on info@gerbion.com.

No fluorescence signal in the FAM-channel of the Positive Control

- **The selected channel for analysis does not comply with the protocol**
Select the FAM-channel for analysis of the CMV-specific amplification and the VIC®/HEX/JOE™/TET channel for the amplification of the Control DNA (K4).
- **Incorrect configuration of the real time PCR**
Check your work steps and compare with 'Procedure' on pages 7-8.
- **The programming of the thermal profile is incorrect**
Compare the thermal profile with the protocol (Table 2, page 8)
- **Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired**
Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in 'Transport and Storage', page 2.

Weak or no signal of the Control DNA (K4) and simultaneous absence of a signal in the CMV-specific FAM channel

- **real time PCR conditions do not comply with the protocol**
Check the PCR conditions (page 8).
- **real time PCR inhibited**
Make sure that you use an appropriate isolation method (see 'Preparation of Samples', page 5) and follow the manufacturer's instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the DNA.

- **DNA loss during isolation process**

In case the Control DNA (K4) was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the DNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer's protocol.

- **Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired**

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in 'Transport and Storage', page 2.

Detection of a fluorescence signal in the FAM channel with the Negative Control (K3)

- **Contamination during preparation of the real time PCR**

Repeat the real time PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the Positive Control (K2) last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time PCR.