فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۲

۲. محتویات کیت ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ٤

۴. سایر موارد مورد نیاز ٤

۵. نکات قابل توجه ٤

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ٥

۷. عوامل مزاحم ۶

۸. استخراج DNA ۶

۹. کنترل داخلی ۶

۱۰. محاسبه تیتر ویروس ۷

۱۱. دستورکار PCR ۷

۱۲. تنظیم دستگاه RotorGene ۸

۱۳. تنظیم دستگاه StepOne ۹

۱۴. تنظیم سایر دستگاه ها ۹

۱۵. آنالیز نتایج RotorGene ۱۰

۱۶. آنالیز نتایج StepOne ۱۲

۱۷. محدوده خطی ۱٤

۱۸. میزان حساسیت ۱٤

کیت **CMV RQ** جهت کار با دستگاه های RotorGene 6000/Q و StepOne/StepOnePlus و به منظور تشخیص و کمیت سنجی DNA سیتومگالو ویروس انسانی در پلاسما می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

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

در حال حاضر روش Real-Time PCR در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیعترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلوئورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود. بر همین اساس می توان تعداد ویروس

را در نمونه مورد بررسی تعیین نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به این که در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر سیتومگالوویروس را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این کیت برای استفاده با دستگاه RotorGene 6000/Q (محصول شرکت Corbett Research/Qiagen) یا دستگاه StepOne/StepOnePlus (محصول شرکت Applied Biosystems) طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
CMV Mix	میکس آماده برای PCR (۱ تا ۴ عدد)	۳۷۵ میکرولیتر
CMV S1	استاندارد۱: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
CMV S2	استاندارد۲: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
CMV S3	استاندارد ۳: یک‌صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
CMV S4	استاندارد ۴: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا که باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس
- سمپلر متغیر
- کیت استخراج DNA
- تیوب یا استریپ مخصوص Real-Time PCR
- سر سمپلر بدون نوکلئاز و فیلتر دار
- دستکش لاتکس بدون پودر

۵. نکات قابل توجه

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

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای

آماده سازی مواد (برای تقسیم مواد داخل لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

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

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

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

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

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴.۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی کند.

۸. استخراج DNA

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

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

۹. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، کیت حاوی کنترل داخلی می باشد. کنترل داخلی به صورت مخلوط با میکس در کیت قرار دارد و در صورت موفق بودن PCR منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد

(VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه روتورژن و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می شود. در این حالت کنترل داخلی موفق بودن PCR را نشان می دهد.

۱۰. محاسبه تیتر ویروس

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

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

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

۱۱. دستورکار PCR

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

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از میکس CMV (PCR MIX) اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا استاندارد یا آب به هر لوله

اضافه کنید. درب لوله ها یا استریپ ها را بسته و شماره گذاری کنید. سپس آنها را مطابق شماره ها روی روتور RotorGene یا داخل بلوک StepOne قرار دهید.

در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی اسپین نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه RotorGene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه RotorGene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل CMV 0.2 (در صورت استفاده از لوله های ۰/۲ میلی لیتری) و یا CMV Strip (در صورت استفاده از لوله های ۰/۱ میلی لیتری) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و پس از انتخاب محل مورد نظر برای ذخیره فایل آزمایش، دکمه Save را بزنید تا دستگاه روشن شود.

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

۱۳.تنظیم دستگاه StepOne

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

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

۱۴.تنظیم سایر دستگاه ها

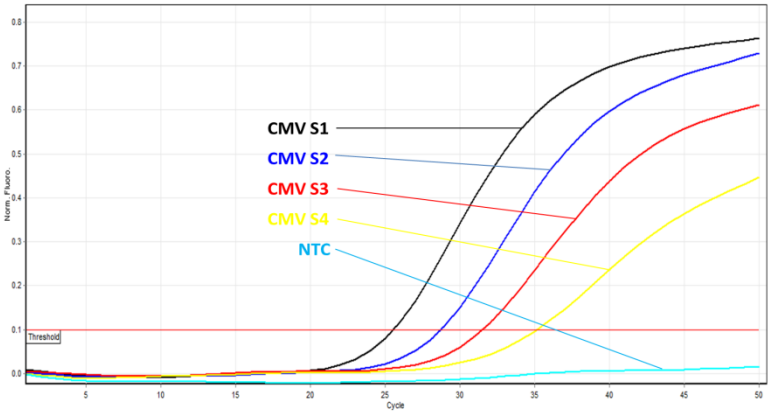
چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاههای Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	
1	**95C x 10 min**	1 cycle
2	**95C x 15 sec**	45 cycles
	58C x 60 sec	

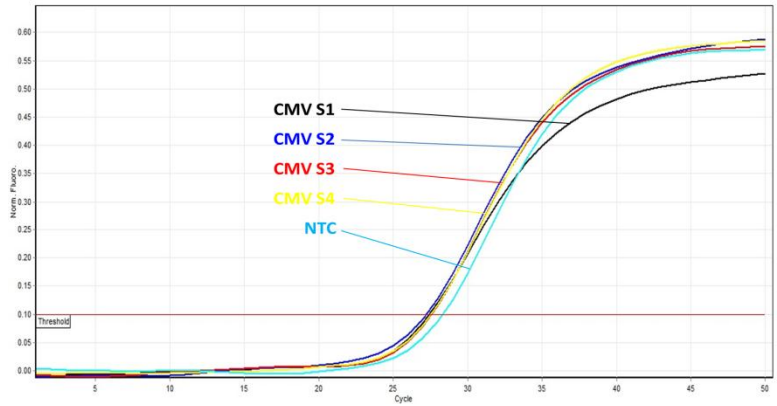
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۵۸ درجه و برای رنگ های FAM و VIC/HEX تنظیم شود.
CMV Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد.

۱۵.آنالیز نتایج RotorGene

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



تصویر یک: منحنی استانداردهای CMV در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر دو: منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

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

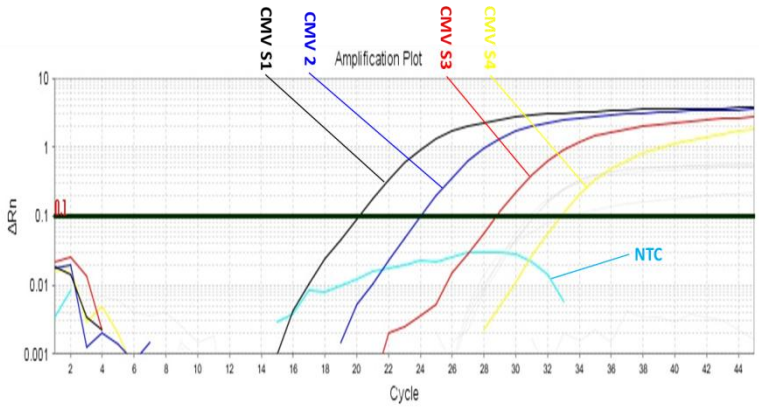
نکته بسیار مهم این که CT تنها در صورت مشاهده منحنی سیگموییدی و دارای فاز لگاریتمی مفهوم داشته و قابل تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی CT غیر قابل اعتماد بوده و منجر به تشخیص اشتباه می شود.

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

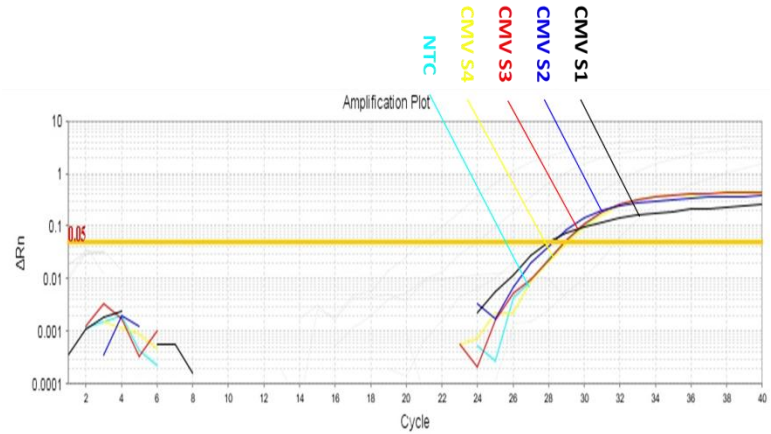
۱۶. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای CMV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



تصویر سه: منحنی استانداردهای CMV در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر چهار: منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

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

نکته بسیار مهم این که CT تنها در صورت مشاهده منحنی سیگموییدی و دارای فاز لگاریتمی مفهوم داشته و قابل تفسیر می باشد. در غیاب

منحنی سیگموییدی CT غیر قابل اعتماد بوده و منجر به تشخیص اشتباه می شود.

- در صورتی که نمونه برای CMV/FAM دارای نمودار سیگموییدو CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه IC/VIC می توان آن را مثبت تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه برای CMV/FAM فاقد منحنی سیگموییدباشد و برای IC/VIC دارای نمودار سیگموییدبا CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه منفی در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال CMV/FAM و IC/VIC فاقد منحنی سیگموییدباشد، آزمایش باید تکرار شود.

۱۷.محدوده خطی

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

۱۸.میزان حساسیت

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

Table of Contents:

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

CMV RQ kit is intended for use with Rotor Gene 6000/Q or StepOne/StepOnePlus instrument and for the quantitative detection of CMV-DNA extracted from plasma. This kit is for research use only.

1. Introduction

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

Currently the Real-Time PCR provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods. In this method application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis,

reducing the possibility of contamination with the PCR product. CMV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of cytomegalovirus with RotorGene 6000/Q (Corbett Research / Qiagen) or StepOne/StepOnePlus instrument (Applied Biosystems). The kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to identify possible PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with RotorGene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
CMV Mix	PCR Master mix	375 ul*
CMV S1	Standard 1: 10,000 copy/ul	150 ul
CMV S2	Standard 2: 1,000 copy/ul	150 ul
CMV S3	Standard 3: 100 copy/ul	150 ul
CMV S4	Standard 4: 10 copy/ul	150 ul
Water	PCR Grade Water	200 ul

* 2 tubes for 48 reaction and 4 tubes for 96 reaction kits.

3. Storage and Stability

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

4. General Precautions

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

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

5. Additionally Required Materials

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex mixer
- Adjustable pipetters
- DNA extraction kit
- Nuclease free filtered tips
- Tubes or strips and strip caps
- Disposable powder-free gloves

6. Specimen, Storage and Transport

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

7. Interfering Substances

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

8. DNA Isolation

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

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

9. Internal Control (IC)

To examine the possible PCR inhibition and to prevent false negative results, the kit contains an *Internal Control* (CMV IC) included in PCR Master Mix (CMV MIX). Internal control should generate a CT (Cycle Threshold) of 28-32 in Yellow Channel on RotorGene and a CT of 28-34 in VIC channel on StepOne (with threshold at 0.1).

10. Quantitation

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

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

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

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

11. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on pre-cooled (0-4°C) cooling block or loading block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

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

Cap the tubes/Strips and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine. Working with StepOne/StepOnePlus instrument, spin tubes/strips briefly before loading on the block. If using RotorGene attach the locking ring.

12. Programming of the RotorGene

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

Open the CD provided in the kit and double click on CMV Template 0.2 if you are using 0.2ml tubes. If you are using 0.1ml strip tubes, double click on CMV-strip. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

13. Programming of StepOne (/Plus)

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 4 standards

and 10 samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

14. Programming Other machines

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

Step	Temperature and time	
1	**95C x 10 min**	1 cycle
2	**95C x 15 sec**	45 cycles
	58C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 58C for FAM and VIC/HEX dyes.
The CMV Mix contains ROX.

15. Data Analysis: RotorGene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.
Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for CMV (Green channel) and

qualitative analysis for Internal Control (Yellow channel). Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green.
In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then click on OK.
Repeat the above for Cycling A. Yellow but cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1.
Figures 1 and 2 represent typical graphs for RotorGene machine.

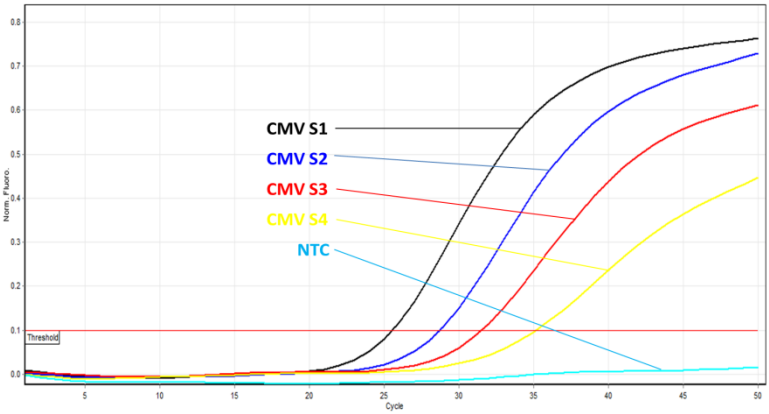


Figure 1. Typical CMV Graph in Green Channel for RotorGene

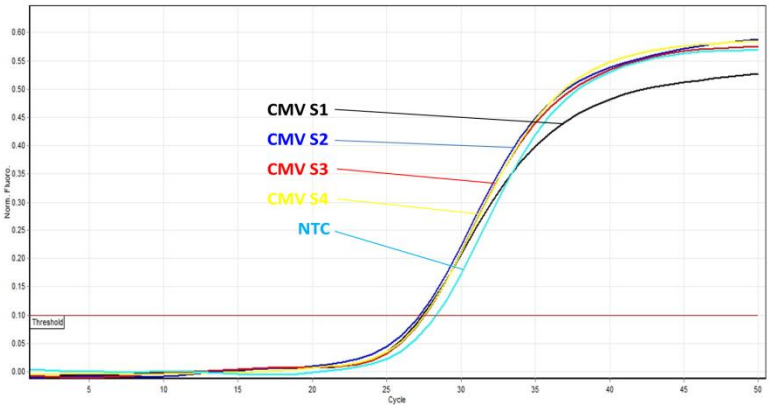


Figure 2. Typical IC Graph in Yellow Channel for RotorGene

Consider following points when analyzing:

Note that calculated CT is reliable only when there is a sigmoid graph with clear logarithmic phase. In the absence of sigmoid graph, CT must be ignored to prevent false results.

- A sample is **positive** if it generates a sigmoid graph in Green channel with a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **negative** if does not produce a sigmoid graph in Green channel (for CMV) while a sigmoid graph is detected for IC in Yellow channel with CT of 28-32.
- Results are **inconclusive** if no sigmoid graph is detected either in Green (CMV) or Yellow channel (for IC) and the test should be repeated.

16. Data Analysis: StepOne

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

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

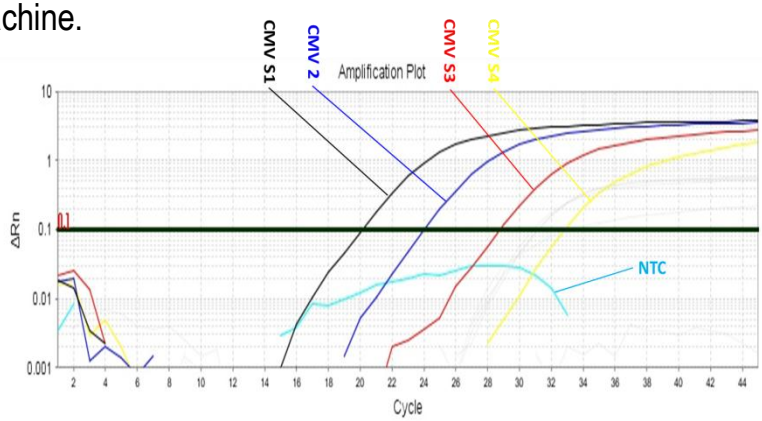


Figure 3. Typical CMV Graph in FAM Channel for StepOne

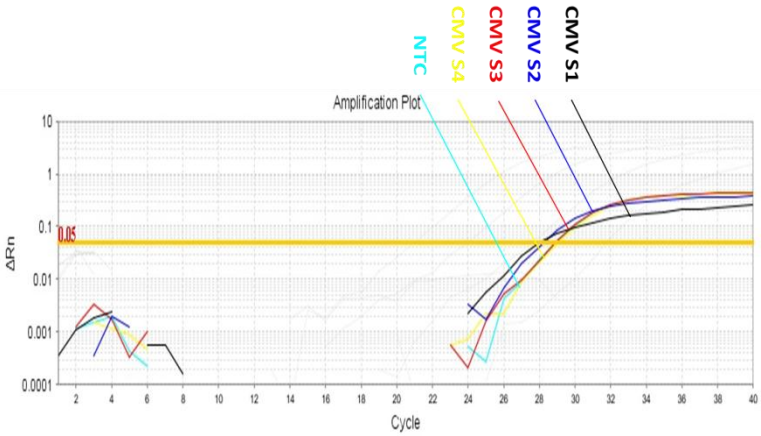


Figure 4. Typical IC Graph in VIC Channel for StepOne

Consider following points when analyzing:

Note that calculated CT is reliable only when there is a sigmoid graph with clear logarithmic phase. In the absence of sigmoid graph, CT must be ignored to prevent false results.

- A sample is **positive** for CMV if it generates a sigmoid graph in CMV/FAM channel with a CT of less than 40. The viral load or quantitaion results are considered valid.
- A sample is **negative** for CMV if it generates a sigmoid graph only for IC/VIC with CT of 28-34 but not for CMV/FAM.
- Results are **inconclusive** if no sigmoid graph is detected for either of CMV/FAM and IC/VIC.

17. Linear Range

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

18. Sensitivity

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