

Instructions for use

Pneumocystis ELITe MGB® Kit

Reactivos para la PCR de ADN en tiempo real



REF RTS150ING

UDI 08033891486723



HISTORIAL DE CAMBIOS

| Revisión | Información del cambio | Fecha (dd/mm/aaaa) |
|----------|--|--------------------|
| 02 | Ampliación del uso del producto cuando se utiliza el instrumento ELITE BeGenius® (REF INT040) y una matriz de esputo. Actualización de las CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO: - Actualización del valor de ULoQ para la matriz de esputo - Actualización del intervalo de medición lineal para muestras de esputo realizada en una matriz en lugar de en solución tamponada con fosfato. Nuevo diseño de los gráficos y del contenido de las instrucciones de uso | 25/07/2024 |
| 01 | Ampliación del uso del producto cuando se utiliza el instrumento ELITE BeGenius® (REF INT040) y una matriz de LBA. Actualización del valor de ULoQ/LLoQ calculado en la matriz de LBA. Descripción del valor de corte del IC | 15/05/2023 |
| 00 | Desarrollo de un nuevo producto | 09/11/2019 |

NOTA!

La revisión de estas instrucciones de uso también es compatible con las versiones anteriores del kit.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1 USO PREVISTO | 4 |
| 2 PRINCIPIO DEL ENSAYO | 4 |
| 3 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO..... | 4 |
| 4 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO..... | 5 |
| 5 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO | 6 |
| 6 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS | 6 |
| 7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES..... | 7 |
| 8 MUESTRAS Y CONTROLES | 8 |
| 9 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius..... | 10 |
| 10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius | 17 |
| 11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO | 23 |
| 12 BIBLIOGRAFÍA | 32 |
| 13 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO..... | 32 |
| 14 PROBLEMAS Y SOLUCIONES | 33 |
| 15 SÍMBOLOS..... | 35 |
| 16 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA | 36 |
| Appendix A QUICK START GUIDE..... | 37 |

1 USO PREVISTO

El producto **Pneumocystis ELITE MGB Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* destinado al uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cuantitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la **detección y la cuantificación de ADN genómico de *Pneumocystis jirovecii* (PJ)** en muestras de ADN extraídas de muestras clínicas.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELITE InGenius®** y **ELITE BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de resultados utilizando muestras de lavados broncoalveolares (LBA), aspirados bronquiales (AB) y muestras licuadas de esputo.

Este producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico *in vitro* y el seguimiento de infecciones por *Pneumocystis jirovecii*.

Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

2 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este es un ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real para la detección de ADN de *Pneumocystis jirovecii* (**PJ**), aislado de muestras y amplificado utilizando el reactivo de ensayo **PJ PCR Mix**, que contiene cebadores y sondas con la tecnología ELITE MGB®.

Las sondas ELITE MGB se activan cuando se hibridan con los productos de PCR relacionados. El **ELITE InGenius** y el **ELITE BeGenius** controlan el aumento de fluorescencia y calculan los ciclos umbral (Ct) y las temperaturas de fusión (Tm). La cantidad de ADN de PJ se calcula basándose en una curva de calibración almacenada.

Las sondas ELITE MGB y los fluoróforos se inactivan en el estado de espiral aleatoria («random-coiled») y monocatenario de la sonda. Los fluoróforos están activos en el dúplex de sonda/amplicón, pues el inhibidor se encuentra separado espacialmente del fluoróforo. Cabe reseñar además que el fluoróforo no se escinde durante la PCR y puede utilizarse para el análisis de la disociación y para calcular la temperatura de fusión.

3 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **Pneumocystis ELITE MGB Kit** incluye el reactivo de ensayo **PJ PCR Mix**, que es una mezcla de PCR optimizada y estabilizada que contiene los cebadores y las sondas específicos para:

- La **subunidad mitocondrial grande del gen del ARNr (mtLSU)** de PJ, detectada en el canal **PJ**; la sonda se estabiliza mediante la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher® y se marca con el colorante FAM.
- El Internal Control (IC), secuencia artificial **IC2**, detectado en el canal **IC**; la sonda se estabiliza con la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher y se marca con el tinte AquaPhluor 525 (AP525).

La mezcla **PJ PCR Mix** también contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot-start»).

El producto **Pneumocystis ELITE MGB Kit** contiene suficientes reactivos para realizar 96 análisis en los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius (12 análisis en cada probeta)**, cuando se utilizan 20 µL en cada reacción.

El producto **Pneumocystis ELITE MGB Kit** también puede utilizarse con instrumentos equivalentes.

4 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Tabla 1

| Componente | Descripción | Cantidad | Clasificación de peligros |
|---------------------------------------|---|------------|---------------------------|
| Mezcla de PCR de PJ ref. RTS150ING | Mezcla de reactivos para PCR en tiempo real en una probeta con tapón blanco | 8 × 280 µL | - |

5 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 5000 rpm).
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 13.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (0,5–10 µL, 2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Probetas estériles de 2,0 mL con tapón roscado (Sarstedt, Alemania, ref. 72.694.005).
- Agua de calidad para biología molecular.

6 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Este producto **no** incluye los reactivos para la extracción del ADN de la muestra, ni tampoco el Internal Control de extracción e inhibición, el Positive Control y el Negative Control de amplificación, los calibradores de ADN ni los consumibles.

Para la extracción automática de ácidos nucleicos, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras, es necesario utilizar los siguientes productos:

Tabla 2

| Instrumentos y software | Productos y reactivos |
|--|--|
| ELiTe InGenius (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030) ELiTe InGenius Software versión 1.3.0.19 (o posterior) PJ ELiTe_STD , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores PJ ELiTe_PC , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control PJ ELiTe_NC , Assay Protocol (protocolo de ensayo) para el análisis del Negative Control PJ ELiTe_BAL_200_100 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de LBA/AB PJ ELiTe_SP_200_100 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de esputo | ELiTe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS) ELiTe InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR), ELiTe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000) 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S), solo con el InGenius 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Suiza, ref. 30180118), solo con el ELiTe BeGenius Pneumocystis - ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR150PLD). Pneumocystis ELiTe Standard (EG SpA, ref. STD150PLD) CPE - Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE). |
| ELiTe BeGenius (EG SpA ref. INT040) ELiTe BeGenius Software versión 2.2.1. (o posterior) PJ ELiTe_Be_STD , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores PJ ELiTe_Be_PC , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control PJ ELiTe_Be_NC , Assay Protocol (protocolo de ensayo) para el análisis del Negative Control PJ ELiTe_Be_BAL_200_100 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de LBA/AB PJ ELiTe_Be_SP_200_100 , Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de esputo | |

7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado exclusivamente para uso in vitro.

7.1 Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Las probetas, las puntas y el resto de materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse con hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % durante al menos 30 minutos, o bien procesarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de su eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. Evitar salpicaduras o pulverizaciones. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material desechable combustible debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de eliminarlos. Evitar que los reactivos de extracción entren en contacto con hipoclorito de sodio (lejía).

- Utilizar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.
- No pipetear ninguna solución con la boca.
- No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.
- Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.
- Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.
- Leer atentamente todas las instrucciones incluidas antes de realizar el ensayo.
- Durante la realización del ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.
- No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.
- Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el producto y los recomendados por el fabricante.
- No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.
- No utilizar reactivos de otros fabricantes.

7.2 Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de la PCR, para los procedimientos de biología molecular se requiere personal debidamente formado y cualificado.

No llevar nunca batas de laboratorio, guantes ni herramientas del área asignada a la amplificación/detección de productos de amplificación al área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos específicos para las sesiones de trabajo.

Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Los reactivos deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de extracción deben manipularse de manera que se reduzca al mínimo la dispersión hacia el entorno.

Los cartuchos PCR Cassette deben manipularse con cuidado y no deben abrirse nunca para evitar la dispersión del producto de PCR hacia el entorno, así como la contaminación de muestras y reactivos.

7.3 Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

Tabla 3

| Componente | Temperatura de almacenamiento | Uso a partir de la primera apertura | Ciclos de congelación y descongelación | Estabilidad con carga (ELITE InGenius y ELITE BeGenius) |
|--------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|---|
| PJ - PCR Mix | -20 °C o menos (protegido de la luz) | un mes | Siete como máximo | Hasta siete sesiones independientes* de tres horas cada una o hasta 7 horas consecutivas (2 sesiones de 3 horas cada una y el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión) |

*Con congelación intermedia

8 MUESTRAS Y CONTROLES

8.1 Muestras

Este producto está concebido para utilizarlo en uno de los instrumentos **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con las siguientes muestras clínicas, identificadas y manipuladas conforme a las directrices para laboratorios y obtenidas, transportadas y conservadas en las condiciones siguientes:

Tabla 4

| Muestra | Requisitos de obtención | Condiciones transporte/almacenamiento | | |
|---|--|---------------------------------------|---------------|---------------|
| | | de +2 °C a +8 °C | -20 °C ±10 °C | -70 °C ±15 °C |
| Lavados broncoalveolares (LBA)/aspirados bronquiales (AB) | en solución fisiológica estéril o solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS*) | ≤1 semana | ≤30 días | ≤1 año |
| Espudo (ESP) | | ≤1 semana | ≤30 días | Período largo |

*PBS: solución tamponada con fosfato

Si las muestras de LBA/AB tienen un contenido de mucosa especialmente alto, pueden licuarse con reactivos que contengan ditiotreitól (como Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las directrices para laboratorios.

Las muestras de esputo deben licuarse con reactivos que contengan ditiotreitól (como Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las directivas para laboratorios.

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Para realizar el análisis de las muestras en el **ELITE InGenius** o el **ELITE BeGenius**, es necesario utilizar los siguientes Assay Protocols (protocolos de ensayo). Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los productos ELITE MGB Kit y los instrumentos **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius** con las matrices indicadas.

Tabla 5 Protocolos de ensayo para el producto Pneumocystis ELiTe MGB Kit

| Muestra | Instrumento | Nombre del Assay Protocol (Protocolo de ensayo) | Informe | Características |
|--|----------------|---|-----------|---|
| Lavados broncoalveolares (LBA)/ aspirados bronquiales (AB) | ELiTe InGenius | «PJ ELiTe_BAL_200_100» | copias/mL | Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL |
| | ELiTe BeGenius | PJ ELiTe_Be_BAL_200_100 | | |
| Espudo (ESP) | ELiTe InGenius | «PJ ELiTe_SP_200_100» | copias/mL | Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL |
| | ELiTe BeGenius | «PJ ELiTe_Be_SP_200_100» | | |

Para todos los protocolos, es preciso verter 200 µL de muestra en la «Extraction Tube» (Tubo de extracción), en el caso del ELiTe InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del ELiTe BeGenius.

NOTA!

el pipeteado de las muestras en el **Extraction tube** (Tubo de extracción) o en la **probeta Sarstedt de 2 mL** puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en el apartado «Advertencias y precauciones».

Los ácidos nucleicos purificados pueden dejarse a temperatura ambiente durante 16 horas o conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior durante un máximo de un mes.

Consultar «Sustancias potencialmente interferentes» en la sección «Características de rendimiento» para comprobar los datos relativos a tales sustancias.

Las cantidades de ADN genómico humano superiores a 1 µg extraídas de la muestra pueden inhibir la amplificación en tiempo real.

8.2 Calibradores y controles de PCR

La curva de calibración debe generarse y aprobarse para cada lote de reactivo de reactivo de PCR.

- Para la curva de calibración, utilizar los cuatro niveles del producto **Pneumocystis ELiTe Standard** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **PJ ELiTe_STD** o **PJ ELiTe_Be_STD**.

NOTA!

Las concentraciones de los calibradores Q-PCR Standard se expresan en copias/reacción (10^5 copias/reacción, 10^4 copias/reacción, 10^3 copias/reacción, 10^2 copias/reacción).

Los resultados del control de la PCR deben generarse y aprobarse para cada lote de reactivo de reactivo de PCR.

- Para el Positive Control, utilizar el producto **Pneumocystis - ELITE Positive Control** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **PJ ELITE_PC** o **PJ ELITE_Be_PC**.
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit), junto con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **PJ ELITE_NC** o **PJ ELITE_Be_NC**.

NOTA!

El **ELITE InGenius** y el **ELITE BeGenius** permiten generar y guardar la curva de calibración y la validación del control de PCR para cada lote de reactivos de PCR.

Las curvas de calibración caducan **a los 60 días**, después de los cuales es necesario volver a realizar la calibración.

Los resultados del control de la PCR caducan **a los 15 días**, después de los cuales es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control.

Los calibradores y los controles de PCR deben volver a procesarse si se produce alguna de las siguientes circunstancias:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos.
- Los resultados del análisis de control de calidad (consultar el apartado siguiente) están fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en uno de el instrumento **ELITE InGenius** o **ELITE BeGenius**.

8.3 Controles de calidad

Se recomienda verificar la extracción y el procedimiento de PCR. Se pueden utilizar muestras archivadas o material de referencia certificado. Deben realizarse controles externos de acuerdo con las disposiciones de los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda.

9 PROCEDIMIENTO CON EL ELITE InGenius

El procedimiento para utilizar el producto **Pneumocystis ELITE MGB Kit** con el **ELITE InGenius** comprende tres pasos:

Tabla 6

| | | |
|--------|---|---|
| PASO 1 | Verificación de la disponibilidad del sistema | |
| PASO 2 | Configuración de la sesión | A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). |
| | | B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). |
| | | C) Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
| | | D) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
| PASO 3 | Evaluación y aprobación de los resultados | 1) Validación de la curva de calibración |
| | | 2) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control |
| | | 3) Validación de los resultados de las muestras |
| | | 4) Generación del informe de los resultados de la muestra |

9.1 PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas:

- Encender el **ELiTe InGenius** e iniciar sesión en el modo **«CLOSED»**.
- En el menú «Calibration» (Calibración) de la pantalla «Home» (Inicio), verificar que los calibradores (**Q - PCR Standard**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de calibradores válidos para el lote de mezcla **PCR Mix**, realizar la calibración tal como se describe en los apartados siguientes.
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**Positive Control** y **Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de PCR Mix que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **PCR Mix**, procesar los controles de la PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «[Muestras y controles](#)»).

Si el Assay Protocol (protocolo de ensayo) deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELiTechGroup más cercano.

9.2 PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** puede utilizarse con el instrumento **ELiTe InGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- C. Sesión de calibración en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Todos los parámetros necesarios están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se cargan automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

NOTA!

El **ELiTe InGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite descargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **12 análisis** en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

Conservar **PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

Para configurar uno de los cuatro tipos de sesión, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

| | A. Sesión de la muestra (Extract + PCR). | B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
|----|--|--|
| 1 | <p>Identificar las muestras y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente, mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. En caso necesario, verter 200 µL de muestra en un «Extraction Tube» (Tubo de extracción) previamente etiquetada.</p> <p>Descongelar las probetas de CPE necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.</p> | <p>Descongelar la «Elution Tube» (Tubo de elución) que contiene los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.</p> |
| 2 | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). |
| 3 | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. |
| 4 | Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras. | Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras. |
| 5 | Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». | Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». |
| 6 | Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» (Protocolo) sea «Extract + PCR» (Extracción + PCR). | Seleccionar «PCR Only» (Solo PCR) en la columna «Protocol» (Protocolo). |
| 7 | En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar la posición de carga «Extraction Tube» (Tubo de extracción) para la muestra. Asegurarse de que la opción «Dilution factor» (Factor de dilución) esté configurada a «1». | Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]). Asegurarse de que la opción «Dilution factor» (Factor de dilución) esté configurada a «1». |
| 8 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 9 | Cargar el CPE y la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote del CPE y de la mezcla PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta. | Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta. |
| 10 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 11 | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. |
| 12 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 13 | Cargar el PCR Cassette, los cartuchos de extracción ELITE InGenius SP 200, así como todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse. | Cargar el PCR Cassette y las «Elution Tube» (Tubo de elución) con las muestras extraídas. |
| 14 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |

| | A. Sesión de la muestra (Extract + PCR). | B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
|----|---|---|
| 15 | Cerrar la puerta del instrumento. | Cerrar la puerta del instrumento. |
| 16 | Pulsar «Start» (Inicio). | Pulsar «Start» (Inicio). |
| | C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) | D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
| 1 | Descongelar las probetas de calibrador Q-PCR Standard tubes (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. | Descongelar las probetas de Positive Control a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Preparar el Negative Control vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en el tubo de elución («Elution Tube») que se incluye con el ELITE InGenius SP 200 Consumable Set. |
| 2 | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). |
| 3 | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. |
| 4 | Para el calibrador Q-PCR, asignar el carril («Track»), seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo) y, después, rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de los reactivos. | Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». Introducir el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control y del agua para biología molecular. |
| 5 | En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR). | En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR). |
| 6 | Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]). | Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]). |
| 7 | Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta. | Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta. |
| 8 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 9 | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. |
| 10 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 11 | Cargar el PCR Cassette y las probetas de Q-PCR Standard. | Cargar el PCR Cassette, el Positive Control y el Negative Control. |
| 12 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 13 | Cerrar la puerta del instrumento. | Cerrar la puerta del instrumento. |
| 14 | Pulsar «Start» (Inicio). | Pulsar «Start» (Inicio). |

Una vez finalizada la sesión, el **ELiTe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en la «**Elution Tube**» (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 ± 10 °C durante un máximo de un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 horas (2 sesiones de 3 horas cada una y el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del calibrador **Q-PCR Standard** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el calibrador Q - PCR Standard.

NOTA!

El calibrador **Q-PCR-Standard** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 2 horas cada una.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del **Positive Control** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el Positive Control. La parte que queda del **Negative Control** debe eliminarse.

NOTA!

El producto **Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

NOTA!

Al finalizar la sesión, el **PCR Cassette** y el resto de consumibles deben eliminarse siguiendo las normativas gubernamentales y medioambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

9.3 PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

El **ELiTe InGenius** supervisa las señales de fluorescencia de la diana y del Internal Control para cada reacción y aplica automáticamente los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) para generar curvas de PCR que, después, se convierten en resultados.

At the end of the run, the "Results Display" screen is automatically shown. En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

NOTA!

El **ELiTe InGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite cargar los resultados de la sesión en el centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El instrumento **ELiTe InGenius** genera los resultados con el producto **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

1. Validación de la curva de calibración
2. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control

3. Validación de los resultados de las muestras.
4. Generación del informe de los resultados de la muestra.

9.3.1 A. Validación de la curva de calibración

El **ELiTe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del calibrador utilizando los parámetros del Assay Protocol (Protocolo de ensayo) **ELiTe_STD**. La relación Ct a concentración resultante da lugar a la curva de calibración.

Las curvas de calibración, específicas del lote de reactivos de PCR, se registran en la base de datos («Calibration»). Los usuarios cualificados como administrador («Administrator») o analista («Analyst») pueden consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

La curva de calibración caduca **a los 60 días**.

NOTA!

Si la curva de calibración no cumple los criterios de aceptación, en el menú «Calibration» (Calibración) aparece el mensaje «Failed» (Error). En este caso, los resultados no pueden aprobarse y es necesario repetir las reacciones de amplificación del calibrador. Además, si se incluyeron muestras en la sesión, estas no se cuantifican, por lo que también deberán repetirse para generar resultados cuantitativos.

9.3.2 Validación de los resultados del Positive Control y Negative Control de la amplificación

El **ELiTe InGenius software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros de los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **ELiTe_PC** y **ELiTe_NC**. Los valores de Ct resultantes se convierten en concentraciones y se utilizan para verificar el sistema (lote de reactivos e instrumento).

Los resultados del Positive Control y del Negative Control, específicos del lote de reactivos de PCR, se registran en la base de datos («Controls»). Los usuarios cualificados como administrador («Administrator») o analista («Analyst») pueden consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Los resultados del Positive Control y del Negative Control caducan **a los 15 días**.

El **ELiTe InGenius software** procesa los resultados del Positive Control y del Negative Control y genera los gráficos de control («Control Charts»). Para configurar el gráfico de control inicial, se utilizan cuatro resultados aprobados del Positive Control y del Negative Control. Para los controles siguientes, el software analiza los resultados para garantizar que el rendimiento del sistema se encuentre dentro de los criterios de aceptación que se muestran en los gráficos de control («Control Charts»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

NOTA!

Si el resultado del Positive Control y del Negative Control no cumple los criterios de aceptación, en la pantalla «Controls» (Controles) aparece el mensaje «Failed» (Error). En este caso, los resultados no pueden aprobarse y es necesario repetir el procesamiento del Positive Control y del Negative Control.

NOTA!

Si el resultado del Positive Control o del Negative Control no es válido y se incluyeron muestras en la misma sesión, las muestras pueden aprobarse, pero los resultados no se validan. En este caso, es necesario repetir el procesamiento del control o los controles que han producido un error y el de todas las muestras.

9.3.3 C. Validación de los resultados de las muestras

El **ELiTe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana (canal **PJ**) y el Internal Control (canal **IC**) con los parámetros de los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **PJ ELiTe_BAL_200_100** y **PJ ELiTe_SP_200_100**. Los valores resultantes del Ct de la diana se convierten en concentración.

Los resultados se muestran en la pantalla «Results Display».

Los resultados de la muestra pueden aprobarse cuando se cumplen las tres condiciones que se indican en la tabla siguiente.

| 1) Curva de calibración | Estado |
|-------------------------|----------|
| Q-PCR Standard de PJ | APROBADO |
| 2) Positive Control | Estado |
| PJ Positive Control | APROBADO |
| 3) Negative Control | Estado |
| PJ Negative Control | APROBADO |

El **ELITE InGenius Software** interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo).

En la tabla siguiente se muestran los posibles mensajes de los resultados.

Para cada muestra el sistema indica una combinación de los mensajes siguientes y especifica si se ha detectado o no el ADN de los patógenos.

| Resultado de la sesión de la muestra | Interpretación |
|---|--|
| PJ: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL (PJ:ADN detectado, cantidad igual a "XXX" copias/mL) | Se ha detectado ADN de PJ en la muestra dentro del rango de medición del ensayo y se indica su concentración. |
| PJ: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL (PJ:ADN detectado, cantidad por debajo de "LLoQ" copias/mL) | Se ha detectado ADN de PJ en la muestra, pero su concentración se encuentra por debajo del límite inferior de cuantificación del ensayo. |
| PJ: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL (PJ:ADN detectado, cantidad de "ULoQ" copias/mL) | Se ha detectado ADN de PJ en la muestra, pero su concentración se encuentra por encima del límite superior de cuantificación del ensayo. |
| PJ: DNA Not detected or below LoD copies / mL (PJ:ADN no detectado o por debajo de "LoD" copias/mL) | No se ha detectado ADN de PJ en la muestra. La muestra es negativa para el ADN diana, o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo. |
| Invalid-Retest Sample (No válido-Volver a probar muestra) | Resultado no válido del ensayo causado por un fallo en el Internal Control (p. ej., debido a una extracción incorrecta o al arrastre de inhibidores). Es necesario repetir la prueba. |

Las muestras que se notifican como «Invalid: Retest Sample» (No válido-Volver a probar muestra) indican que el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente, probablemente debido a problemas en los pasos de recogida de la muestra, extracción o PCR (p. ej., obtención incorrecta de la muestra, degradación o pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si queda un volumen de eluido suficiente, dicho eluido puede volver a analizarse (tal cual o diluido) con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de la extracción de una nueva muestra utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR); consultar [14 «Problemas y soluciones» page 33](#).

Las muestras que se notifican como «PJ: DNA Not Detected or below the "LoD" copies/mL » (PJ: ADN no detectado o por debajo de "LoD" copias/mL) son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ADN de PJ. En este caso, puede que la muestra sea negativa para ADN de PJ, o que haya ADN de PJ a una concentración inferior al límite de detección del ensayo (ver sección [11 «Características de rendimiento» page 23](#)).

Si se detectan muestras positivas para ARN de PJ a una concentración inferior al límite de detección (y al límite inferior de cuantificación) del ensayo, estas se notifican como «PJ:DNA Detected, quantity below “LLOQ” copies/mL (PJ:ADN detectado, cantidad por debajo de “LLOQ” copias/mL)»; consultar la sección 11 «Características de rendimiento» page 23.

Las muestras positivas para ADN de PJ dentro del rango de medición lineal se detectan y notifican como «PJ:DNA Detected, quantity equal to “XXX” copies / mL» (PJ:ADN detectado, cantidad igual a “XXX” copias/mL); consultar la sección 11 «Características de rendimiento» page 23.

Las muestras positivas para ADN de PJ que superan el límite superior de cuantificación se notifican como «PJ:DNA Detected, quantity beyond “ULOQ” copies/mL» (PJ:ADN detectado, cantidad alé de “ULOQ” copias/mL) y no son aptas para la cuantificación. En caso necesario, es posible diluir la muestra antes de la extracción o de la PCR y volver a analizarla para obtener resultados dentro del rango de medición lineal del ensayo (consultar 11 «Características de rendimiento» page 23).

NOTA!

Los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados en la pantalla «Results Display» (Presentación de resultados) por personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst»), siguiendo las instrucciones de la interfaz. La pantalla «Results Display» (Presentación de resultados) permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

9.3.4 Generación del informe de los resultados de la muestra

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y los informes pueden exportarse como «Sample Report» y como «Track Report».

El «Sample Report» muestra los detalles de los resultados ordenados por la muestra seleccionada (SID).

El «Track Report» muestra los detalles de los resultados ordenados por el carril seleccionado.

El personal autorizado puede imprimir y firmar el «Sample Report» y el «Track Report».

10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITE BeGenius

El procedimiento para utilizar el producto **Pneumocystis ELITE MGB Kit** con el **ELITE BeGenius** comprende tres pasos:

Tabla 7

| | | |
|--------|---|---|
| PASO 1 | Verificación de la disponibilidad del sistema | |
| PASO 2 | Configuración de la sesión | A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). |
| | | B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
| | | C) Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
| | | D) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
| PASO 3 | Evaluación y aprobación de los resultados | 1) Validación de la curva de calibración |
| | | 2) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control |
| | | 3) Validación de los resultados de las muestras |
| | | 4) Generación del informe de los resultados de la muestra |

10.1 PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes iniciar la sesión, es necesario realizar las siguientes tareas:

- Encender el **ELITE BeGenius** e iniciar sesión en el modo «**CLOSED**».
- En el menú «Calibration» (Calibración) de la pantalla «Home» (Inicio), verificar que los calibradores (**Q - PCR Standard**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de calibradores válidos para el lote de mezcla **PCR Mix**, realizar la calibración tal como se describe en los apartados siguientes.
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**Positive Control, EV Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de mezcla **PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **PCR Mix**, procesar los controles de la PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «Muestras y controles»).

Si el Assay Protocol (protocolo de ensayo) deseado no está cargado en el sistema, contactar con el servicio de atención al cliente de ELITechGroup más cercano.

10.2 PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **Pneumocystis ELITE MGB Kit** puede utilizarse con el instrumento **ELITE BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- C. Sesión de calibración en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Todos los parámetros necesarios están incluidos en el Assay Protocol (protocolo de ensayo) disponible en el instrumento y se cargan automáticamente al seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo).

NOTA!

El **ELITE BeGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite descargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **12 análisis** en condiciones óptimas de uso, es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

Conservar la **PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

Para configurar uno de los cuatro tipos de sesión, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

| | A. Sesión de la muestra (Extract + PCR). | B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
|----|---|--|
| 1 | <p>Identificar las muestras y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente, mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.</p> <p>Descongelar las probetas de CPE necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.</p> | <p>En caso necesario, descongelar las «Elution Tubes» (Tubos de elución) que contienen los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.</p> |
| 2 | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). |
| 3 | Extraer todas las gradillas de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación. | Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la tabla de preparación. |
| 4 | Seleccionar el «Run Mode»: «Extract + PCR» (Extracción + PCR). | Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR). |
| 5 | Cargar las muestras en la «Sample Rack» (rack de muestras). Cuando se cargan probetas secundarias «2 mL Tube», utilizar los adaptadores azules para la «Sample Rack» (rack de muestras). | Cargar las muestras en la «Elution Rack» (rejilla de elución). |
| 6 | Insertar la «Sample Rack» (rack de muestras) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 5 (L5). En caso necesario, insertar el ID de la muestra para cada posición utilizada. Si se cargan probetas secundarias, marcar la probeta de 2 mL como «2 mL Tube». Si las probetas secundarias no tienen códigos de barras, introducir manualmente el ID de las muestras. | Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position», introducir el «SID» (ID de la muestra), la «Sample matrix» (matriz de la muestra), el «Extraction kit» (kit de extracción) y el «Extracted Eluate Volume» (volumen de elución extraído). |
| 7 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 8 | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. |
| 9 | Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». | Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». |
| 10 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 11 | si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6. | si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6. |
| 12 | Cargar los «Elution Tubes» (Tubos de elución) en la «Elution Rack» (rejilla de elución); las probetas de elución pueden etiquetarse con un código de barras para mejorar la rastreabilidad. | No aplicable |
| 13 | Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). Si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento utilizando el «Lane 2» (L2). | No aplicable |
| 14 | No aplicable | No aplicable |
| 15 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | No aplicable |
| 16 | Cargar el CPE y la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución). | Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución). |

| | A. Sesión de la muestra (Extract + PCR). | B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
|----|---|---|
| 17 | Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix o CPE, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones). | Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones). |
| 18 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 19 | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. |
| 20 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 21 | Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario). | Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario). |
| 22 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 23 | Cargar la «Extraction Rack» (gradilla de extracción) con los cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 200 y los consumibles de extracción necesarios. | No aplicable |
| 24 | Cerrar la puerta del instrumento. | Cerrar la puerta del instrumento. |
| 25 | Pulsar «Start» (Inicio). | Pulsar «Start» (Inicio). |

| | C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) | D. Sesión del Positive Control y del Negative Control modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
|---|---|---|
| 1 | Descongelar las probetas de calibrador Q-PCR Standard tubes (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. | Descongelar las probetas de Positive Control a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Preparar el Negative Control vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en el tubo de elución («Elution Tube») que se incluye con el ELITe InGenius SP 200 Consumable Set. |
| 2 | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). | Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio). |
| 3 | Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la tabla de preparación. | Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la tabla de preparación. |
| 4 | Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). | Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR). |
| 5 | Cargar las probetas de Q-PCR Standard en la «Elution Rack» (rejilla de elución). | Cargar las probetas de Positive Control y de Negative Control en la «Elution Rack» (rejilla de elución). |

| | C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) | D. Sesión del Positive Control y del Negative Control modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR) |
|----|--|--|
| 6 | Insertar la « Elution Rack » (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» (Posición) introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo), el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones) | Insertar la « Elution Rack » (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» (Posición) introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo), el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones) |
| 7 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 8 | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. | Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL. |
| 9 | Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». | Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». |
| 10 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 11 | Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución). | Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución). |
| 12 | Insertar la « Reagent/Elution Rack » (rejilla de reactivos/elución) en la «Cooler Unit», en el Lane 2 (L2). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones). | Insertar la « Reagent/Elution Rack » (rejilla de reactivos/elución) en la «Cooler Unit», en el Lane 2 (L2). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones). |
| 13 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 14 | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. | Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda. |
| 15 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 16 | Cargar la « PCR Rack » con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario). | Cargar la « PCR Rack » con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario). |
| 17 | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. | Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar. |
| 18 | Cerrar la puerta del instrumento. | Cerrar la puerta del instrumento. |
| 19 | Pulsar «Start» (Inicio). | Pulsar «Start» (Inicio). |

Una vez finalizada la sesión, el **ELiTe BeGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en la «**Elution Tube**» (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 ± 10 °C durante un máximo de un mes. Evitar cualquier derrame de la muestra extraída.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 horas (2 sesiones de 3 horas cada una y el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del calibrador **Q-PCR Standard** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el calibrador Q - PCR Standard.

NOTA!

El calibrador **Q-PCR-Standard** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 2 horas cada una.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda del **Positive Control** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el **Positive Control**. La parte que queda del **Negative Control** debe eliminarse.

NOTA!

El producto **Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

NOTA!

Al finalizar la sesión, el **PCR Cassette** y el resto de consumibles deben eliminarse siguiendo las normativas gubernamentales y medioambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

10.3 PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

El **ELiTe BeGenius** supervisa las señales de fluorescencia de la diana y del Internal Control para cada reacción y aplica automáticamente los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) para generar curvas de PCR que, después, se convierten en resultados.

At the end of the run, the "Results Display" screen is automatically shown. En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

NOTA!

El **ELiTe BeGenius** puede conectarse al «Laboratory Information System» (sistema de información de laboratorios, LIS), que permite cargar los resultados de la sesión en el centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El instrumento **ELiTe BeGenius** genera los resultados con el producto **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

1. Validación de la curva de calibración
2. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
3. Validación de los resultados de las muestras.
4. Generación del informe de los resultados de la muestra.

NOTA!

Consultar el mismo apartado del **procedimiento con el ELiTe InGenius** para obtener más información.

11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

11.1 Sensibilidad analítica: Límite de detección (LoD)

La sensibilidad analítica del producto Pneumocystis ELITE MGB Kit, expresada como el límite de detección (LoD), se definió utilizando muestras de LBA con el sistema **ELITE InGenius**.

El límite de detección (LoD) se calculó analizando un panel de muestras negativas de LBA/AB enriquecidas con material de referencia certificado de *Pneumocystis jirovecii* (PJ) a un título conocido (Qnostics). El límite de detección se obtuvo mediante el análisis de regresión Probit de los datos como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8 Límite de detección con el ELITE InGenius en el caso de LBA/AB

| Límite de detección | Intervalo de confianza del 95 % | |
|---------------------|---------------------------------|-----------------|
| | Límite inferior | Límite superior |
| 97 copias/mL | 60 copias/mL | 275 copias/mL |

El valor calculado del LoD se verificó para cada matriz analizando en el **Elite InGenius** y en el **ELITE BeGenius** un panel de una matriz enriquecida con material de referencia de *Pneumocystis* a la concentración declarada.

Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana del producto Pneumocystis ELITE MGB Kit, tanto en el ELITE InGenius como en el ELITE BeGenius para cada matriz.

11.2 Rango de medición lineal

El rango de medición lineal se determinó utilizando cada matriz en el **ELITE InGenius** y el **ELITE BeGenius** con un panel de diluciones de ADN diana de PJ (enriquecidas con un ADN plasmídico cuantificado que contenía un amplicón de la mtLSU) en una matriz negativa para ADN de PJ.

En los apartados siguientes se muestran los resultados de cada matriz.

Espuito:

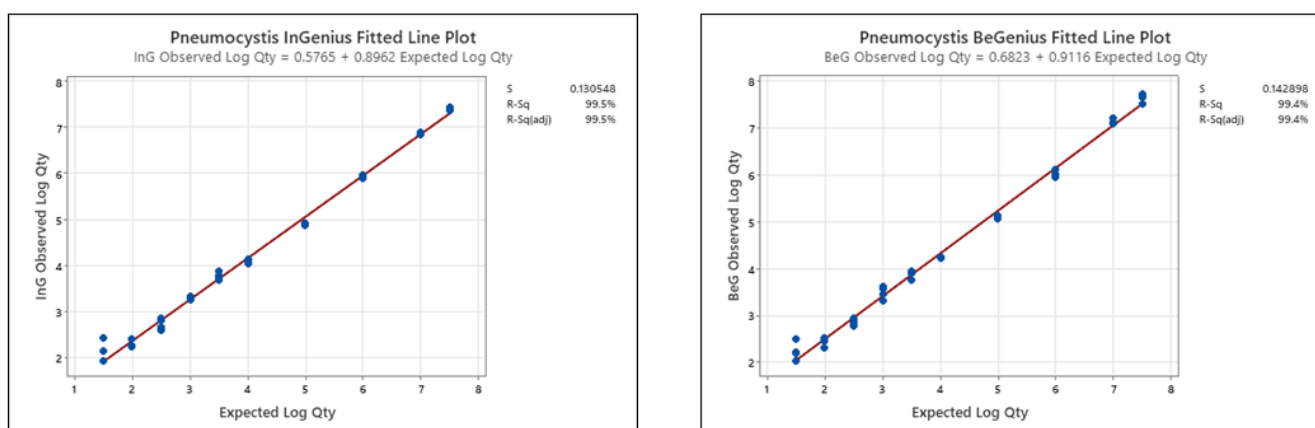


Fig. 1

Los resultados obtenidos con el ELITE InGenius y el ELITE BeGenius se analizaron mediante regresión ortogonal y lineal con el fin de calcular la relación entre los métodos.

Los resultados se resumen en la figura siguiente.

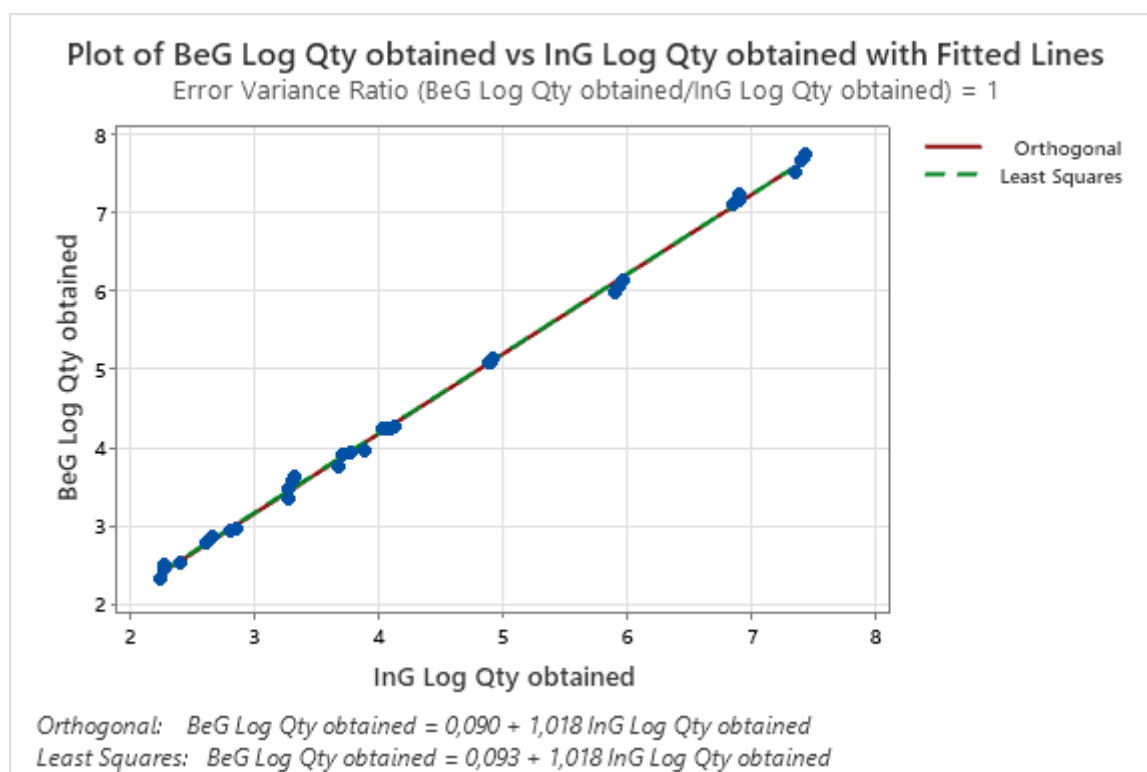


Fig. 2

El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de 0,090 (CI del 95 %: 0,0291; 0,1509) y una pendiente de 1,018 (IC del 95 %: 1,0059; 1,0308).

LBA/AB:

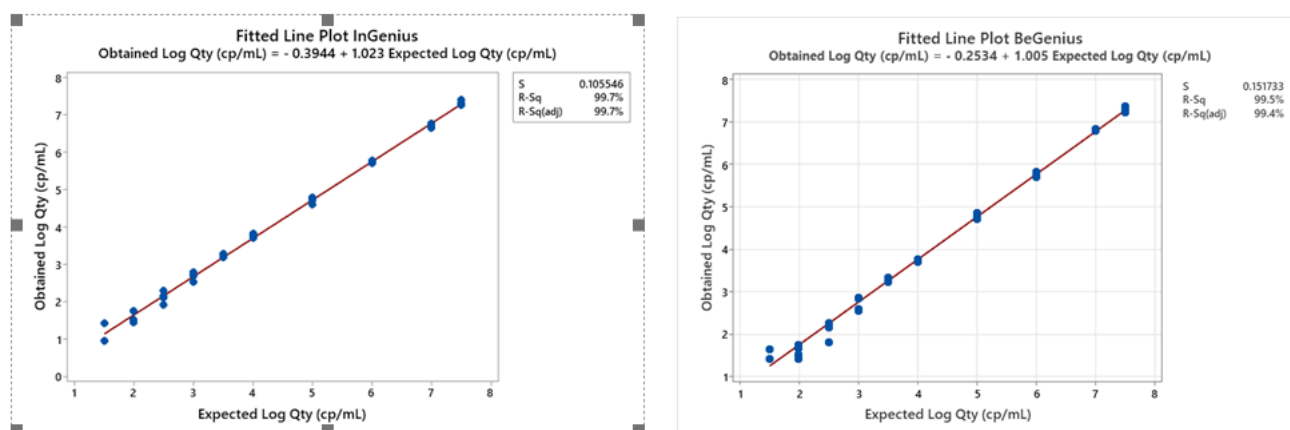


Fig. 3

Los resultados obtenidos con el ELITE InGenius y el ELITE BeGenius se analizaron mediante regresión ortogonal y lineal con el fin de calcular la relación entre los métodos.

Los resultados se resumen en la figura siguiente.

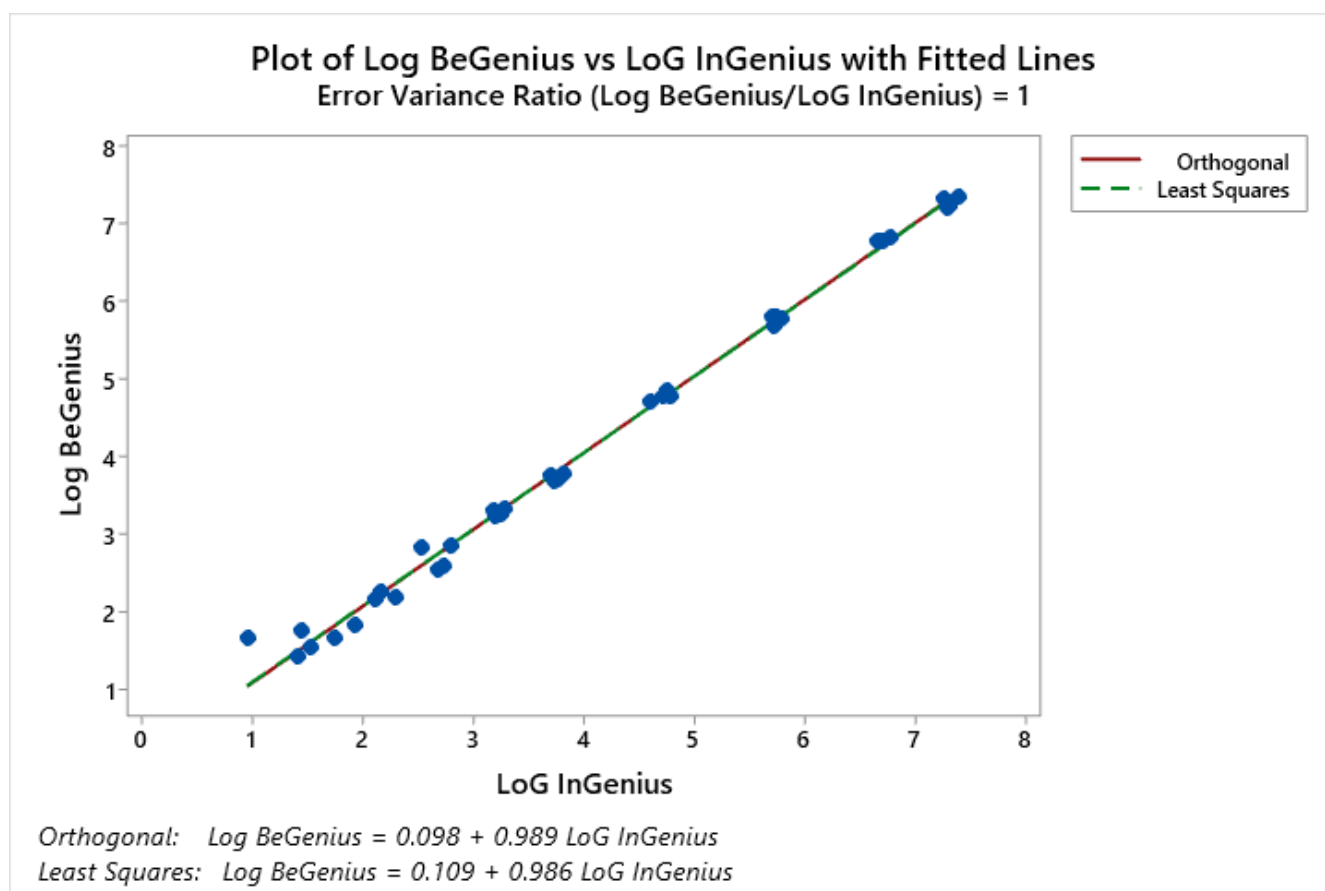


Fig. 4

El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de 0,098 (CI del 95 %: -0,0134; 0,2099) y una pendiente de 0,989 (IC del 95 %: 0,9647; 1,0137).

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 9 Rango de medición lineal para muestras de esputo y de LBA/AB en los instrumentos ELite InGenius y ELite BeGenius

| Límite inferior | Límite superior |
|-----------------|----------------------|
| 97 copias/mL | 31.622.777 copias/mL |

11.3 Inclusividad: Eficacia de detección y cuantificación en distintos genotipos

La eficiencia de detección para distintos genotipos se evaluó comparando las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos EBI ENA.

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para la región del gen mtLSU de PJ demostró su conservación y la ausencia de mutaciones reseñables.

La inclusividad del ensayo, expresada como la eficacia de detección de diferentes colonias aisladas de *Pneumocystis*, se evaluó analizando el «QCMD 2018 *Pneumocystis jirovecii pneumonia* EQA Panel» (Qnostics), formado por 6 colonias aisladas clínicas diferentes.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10

| Material de referencia | | | | Pneumocystis Resultados del ELITE MGB Kit | |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------|--|------------------|
| Muestras | Descripción de la muestra | Frecuencia de detección | Muestra Estado | Ct de PJ | Copias de PJ/ mL |
| PCPDNA18S-01 | P. jirovecii (clínica) | Detectada | Principal | 33,60 | 1.771 |
| | | | | 33,69 | 2.704 |
| PCPDNA18S-02 | P. jirovecii (j888023) | Detectada con frecuencia | Principal | 32,19 | 4.805 |
| | | | | 32,56 | 5.706 |
| PCPDNA18S-03 | P. jirovecii (j888023) | Detectada con frecuencia | Principal | 30,11 | 20.904 |
| | | | | 30,28 | 25.449 |
| PCPDNA18S-04 | P. jirovecii (tipo A1) | Detectada con frecuencia | Principal | 33,83 | 1.507 |
| | | | | 33,57 | 2.933 |
| PCPDNA18S-05 | P. jirovecii (clínica) | Detectada | Principal | 34,06 | 1.280 |
| | | | | 34,81 | 1.298 |
| PCPDNA18S-06 | P. jirovecii (g885652) | Detectada con frecuencia | Principal | 35,60 | 432 |
| | | | | 37,69 | 196 |
| PCPDNA18S-07 | P. jirovecii (j888023) | Detectada | Didáctica | 37,55 | 109 |
| | | | | 37,14 | 280 |
| PCPDNA18S-08 | P. jirovecii Negativas | Negativas | Principal | Indet. | Indet. |
| | | | | Indet. | Indet. |
| PCPDNA18S-09 | P. jirovecii (tipo A1) | Detectada | Didáctica | 37,11 | 149 |
| | | | | 36,91 | 326 |
| PCPDNA18S-10 | P. jirovecii (j888023) | Detectada con frecuencia | Principal | 31,75 | 6.547 |
| | | | | 33,27 | 3.565 |

Las 9 muestras positivas se detectaron correctamente cuando el producto Pneumocystis ELITE MGB Kit se utilizó con el instrumento ELITE InGenius.

La inclusividad del ensayo, expresada como la eficacia de detección de diferentes colonias aisladas de *Pneumocystis*, se evaluó analizando muestras clínicas positivas de LBA/AB y esputo analizadas con un método de referencia de diagnóstico *in vitro* con marcado CE.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 11

| Muestras | N | positivas | negativas | no válido |
|--------------------------|----|-----------|-----------|-----------|
| LBA/AB positivas para PJ | 15 | 15 | 0 | 0 |
| Esputo positivo para PJ | 8 | 8 | 0 | 0 |

Las 23 muestras clínicas positivas presentaron un resultado positivo cuando el producto Pneumocystis ELITE MGB Kit se utilizó con el instrumento ELITE InGenius.

11.4 Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La reactividad cruzada potencial con otros microorganismos no deseados del producto Pneumocystis ELITE MGB Kit se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos EBI ENA. El análisis no presentó ninguna homología reseñable con otros microorganismos imprevistos (otros microorganismos, inclusive otros hongos).

La ausencia de reactividad cruzada con otros microorganismos potencialmente interferentes que puede encontrarse en muestras clínicas de LBA/AB también se verificó analizando un panel de materiales de referencia certificados (ATCC) a un título alto.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12 Marcadores con reactividad cruzada potencial

| Microorganismo | Cepa | Resultado |
|-----------------------------------|------------------|-------------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 118 | Sin reactividad cruzada |
| <i>Candida albicans</i> | 3147 | Sin reactividad cruzada |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Rosenbach | Sin reactividad cruzada |
| <i>Escherichia coli</i> | H10407 | Sin reactividad cruzada |
| <i>Bordetella pertussis</i> | - | Sin reactividad cruzada |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | - | Sin reactividad cruzada |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Rd | Sin reactividad cruzada |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | R6 | Sin reactividad cruzada |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Philadelphia-1 | Sin reactividad cruzada |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | FH | Sin reactividad cruzada |
| <i>Chlamydomonas pneumoniae</i> | AR-39 | Sin reactividad cruzada |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | - | Sin reactividad cruzada |
| CMV | AD-169 | Sin reactividad cruzada |
| Enterovirus | Enterovirus 71 | Sin reactividad cruzada |
| Adenovirus | Adenoid 6 | Sin reactividad cruzada |
| Virus de la gripe A | A/PR/8/34 | Sin reactividad cruzada |
| Virus de la gripe B | B/Florida/4/2006 | Sin reactividad cruzada |
| VRS | A2 | Sin reactividad cruzada |

Todos los microorganismos con reactividad cruzada potencial resultaron ser negativos para la diana cuando se analizaron con el producto Pneumocystis ELITE MGB Kit.

11.5 Marcadores potencialmente interferentes: inhibición

La ausencia de interferencias en la amplificación de la diana mediante otros microorganismos que pueden encontrarse en las muestras clínicas de LBA/AB se verificó analizando el panel de materiales certificados. El ADN o ARN genómico de diferentes microorganismos con reactividad cruzada potencial (ATCC) se enriqueció con ADN plasmídico que contenía el amplicón del mtLSU a baja concentración (aproximadamente 10 copias/reacción).

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13 Marcadores potencialmente interferentes

| Microorganismo | Cepa | Resultado |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 118 | Sin interferencia |
| <i>Candida albicans</i> | 3147 | Sin interferencia |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Rosenbach | Sin interferencia |
| <i>Escherichia coli</i> | H10407 | Sin interferencia |
| <i>Bordetella pertussis</i> | - | Sin interferencia |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | - | Sin interferencia |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Rd | Sin interferencia |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | R6 | Sin interferencia |
| <i>Legionella pneumophila</i> | Philadelphia-1 | Sin interferencia |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | FH | Sin interferencia |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | AR-39 | Sin interferencia |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | - | Sin interferencia |
| CMV | AD-169 | Sin interferencia |
| Enterovirus | Enterovirus 71 | Sin interferencia |
| Adenovirus | Adenoid 6 | Sin interferencia |
| Virus de la gripe A | A/PR/8/34 | Sin interferencia |
| Virus de la gripe B | B/Florida/4/2006 | Sin interferencia |
| VRS | A2 | Sin interferencia |

Ninguno de los microorganismos potencialmente interferentes afectó negativamente a la amplificación de la diana cuando se analizaron con el producto Pneumocystis ELITE MGB Kit.

11.6 Sustancias potencialmente interferentes

El posible efecto de sustancias interferentes se evaluó con muestras que contenían sustancias endógenas: sangre entera, mucina, antibióticos, corticoides y antihistamínicos.

Las muestras de LBA/AB se enriquecieron con material de referencia de PJ (Qnostics) a una concentración de 3 veces el LoD y con las sustancias potencialmente interferentes.

Los valores Ct de la diana y del control interno (muestras de referencia y de prueba) se utilizaron para calcular el porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV) para evaluar la posible interferencia.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 14 Sustancias potencialmente interferentes

| Muestra | Pos./Dup. | %CV de Ct de PJ | %CV de Ct del IC |
|--|-----------|-----------------|------------------|
| 5 % de sangre entera | 3/3 | 1,41 | 0,94 |
| 1 % de mucina | 3/3 | 0,29 | 0,91 |
| 6 µg/mL de hidrocortisone de ambroxol | 3/3 | 0,60 | 0,53 |
| 160 µg/mL de sulfametoxazol + 32 µg/mL de trimetoprima | 3/3 | 1,35 | 0,54 |
| 200 µg/mL de ampicilina | 3/3 | 1,72 | 0,60 |
| 40 ng/ml de beclometasona | 3/3 | 1,28 | 0,71 |
| 4 µg/mL de ebastina | 3/3 | 0,64 | 0,81 |

Todas las muestras resultaron ser positivas para la diana de interés, tal como se esperaba. El coeficiente de variación porcentual (%CV) de los valores de Ct fue inferior al 2 %. Ninguna de las sustancias analizadas a las concentraciones analizadas interfirió en la detección de la diana con el producto Pneumocystis ELITe MGB Kit.

11.7 Repetibilidad

La repetibilidad del ensayo se evaluó en los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** analizando un panel de muestras de LBA/AB, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con ADN de PJ.

En las siguientes tablas se muestran los resultados.

Tabla 15 Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe InGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|---|----------|------|------|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 8 | N/A | N/A | N/A | 100 % |
| 3×LoD | 8 | 37,08 | 0,42 | 1,13 | 100 % |
| 10×LoD | 8 | 35,04 | 0,48 | 1,37 | 100 % |

Tabla 16 Repetibilidad entre sesiones con el ELITe InGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|----|----------|------|------|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 16 | N/A | N/A | N/A | 100 % |
| 3×LoD | 16 | 37,23 | 0,72 | 1,93 | 100 % |
| 10×LoD | 16 | 35,28 | 0,46 | 1,30 | 100 % |

Tabla 17 Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe BeGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|---|----------|-----|-----|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 8 | N/A | N/A | N/A | 100 % |

Tabla 17 Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE BeGenius (continued)

| | | | | | |
|--------|---|-------|------|------|-------|
| 3×LoD | 8 | 37,45 | 0,32 | 0,86 | 100 % |
| 10×LoD | 8 | 35,37 | 0,44 | 1,25 | 100 % |

Tabla 18 Repetibilidad entre sesiones con el ELITE BeGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|----|----------|------|------|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 16 | N/A | N/A | N/A | 100 % |
| 3×LoD | 16 | 37,98 | 1,05 | 2,76 | 100 % |
| 10×LoD | 16 | 35,79 | 0,63 | 1,76 | 100 % |

En el ensayo de repetibilidad, el producto Pneumocystis ELITE MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variabilidad máxima de los valores Ct de la diana inferior al 5 %.

11.8 Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo se evaluó en los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** analizando un panel de muestras de LBA/AB, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con ADN de PJ.

En las tablas siguientes se incluye un resumen de la reproducibilidad entre instrumentos.

Tabla 19 Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITE InGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|---|----------|------|------|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 8 | N/A | N/A | N/A | 100 % |
| 3×LoD | 8 | 36,63 | 0,63 | 1,72 | 100 % |
| 10×LoD | 8 | 34,42 | 0,48 | 1,39 | 100 % |

Tabla 20 Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITE BeGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|---|----------|------|------|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 8 | N/A | N/A | N/A | 100 % |
| 3×LoD | 8 | 37,26 | 0,41 | 1,11 | 100 % |
| 10×LoD | 8 | 34,92 | 0,40 | 1,16 | 100 % |

Tabla 21 Reproducibilidad entre lotes con el ELITE InGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|---|----------|-----|-----|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 8 | N/A | N/A | N/A | 100 % |

Tabla 21 Reproducibilidad entre lotes con el ELITE InGenius (continued)

| | | | | | |
|--------|---|-------|------|------|-------|
| 3×LoD | 8 | 36,99 | 0,48 | 1,29 | 100 % |
| 10×LoD | 8 | 35,03 | 0,44 | 1,25 | 100 % |

Tabla 22 Reproducibilidad entre lotes con el ELITE BeGenius

| Muestra | N | PJ | | | |
|-----------|---|----------|------|------|-------------------|
| | | Ct medio | DE | %CV | % de concordancia |
| Negativas | 8 | N/A | N/A | N/A | 100 % |
| 3×LoD | 8 | 37,59 | 0,38 | 1,02 | 100 % |
| 10×LoD | 8 | 35,70 | 0,59 | 1,65 | 100 % |

En el ensayo de reproducibilidad, el producto Pneumocystis ELITE MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variabilidad máxima de los valores Ct de la diana inferior al 5 %.

11.9 Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó en el **ELITE InGenius** analizando muestras de LBA/AB y de esputo que eran negativas para ADN de PJ, que se habían analizado con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real. Como el **ELITE BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITE InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la especificidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITE InGenius** también es aplicable al **ELITE BeGenius**.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

| Muestras | N | Positivas | Negativas | % de especificidad diagnóstica |
|-------------------------|----|-----------|-----------|--------------------------------|
| LBA/AB negativo para PJ | 58 | 2 | 56 | 96,6 |
| Esputo negativo para PJ | 35 | 1 | 34 | 97,10 |

Todas las muestras de plasma fueron válidas para el análisis.

El valor de corte de Ct del Internal Control Ct (Ct del IC) se ha establecido a 34 con el **ELITE InGenius** y a 35 con el **ELITE BeGenius** en el caso de muestras de LBA/AB.

El valor de corte para el Ct del Internal Control (Ct del IC) se ha establecido a 37 en el caso de muestras de esputo con el **ELITE InGenius** y el **ELITE BeGenius**.

11.10 Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó en el **ELITE InGenius** analizando muestras clínicas de LBA/AB y muestras de esputo positivas para ADN de PJ, que se habían analizado con un kit de PCR en tiempo real para diagnóstico *in vitro* con marcado CE, o enriquecidas con material de referencia de PJ. Como el **ELITE BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITE InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITE InGenius** también es aplicable al **ELITE BeGenius**.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

| Muestras | N | Positivas | Negativas | % de sensibilidad diagnóstica |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------------------|
| LBA/AB positivas para PJ | 13 | 13 | 0 | 100 |
| LBA/AB enriquecidas con PJ | 30 | 30 | 0 | 100 |
| Total de muestras de LBA/AB | 43 | 43 | 0 | 100 |
| Esputo positivo para PJ | 8 | 8 | 0 | 100 |
| Esputo enriquecido con PJ | 30 | 24 | 6 | 80 |
| Muestras de esputo totales | 38 | 32 | 6 | 84,2 |

NOTA!

Los datos y resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y el instrumento se incluyen en la documentación técnica del producto PJ ELiTe MGB Kit, FTP150ING.

12 BIBLIOGRAFÍA

C. Valero *et al.* (2016) *Front. Microbiol.* 7:1413

M. Maillet *et al.* (2014) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33(3):331-6

E. A. Lukhtanov *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

K. Linnet *et al.* (2004) *Clin. Chem.* 50: 732 - 740

13 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con las siguientes muestras clínicas: LBA/AB, esputo licuado.

En la actualidad, no se dispone de datos acerca del rendimiento de este producto con otras muestras clínicas.

No utilizar este producto con muestras que contengan una cantidad excesiva de mucina, pues las muestras con una alta viscosidad inhiben la reacción de amplificación de ácidos nucleicos y pueden dar lugar a resultados no válidos.

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: hisopados respiratorios.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, es necesario prestar especial atención durante estos pasos y seguir estrictamente las instrucciones incluidas con los productos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de PCR en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación con las muestras clínicas positivas, los controles positivos y los propios productos de la PCR. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto está diseñado para limitar la posibilidad de una contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

Para utilizar este producto y con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, se requiere personal cualificado y con la formación necesaria para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario y otras personas, este producto requiere el uso de un equipo de protección individual y áreas que sean adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de un equipo de protección individual e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate.

Con el fin de evitar resultados incorrectos, este producto debe ser manipulado por profesionales debidamente formados y cualificados en técnicas de biología molecular, como la extracción, la PCR y la detección de ácidos nucleicos.

Debido a las diferencias inherentes que existen entre las distintas tecnologías, se recomienda a los usuarios realizar estudios de relación entre los diversos métodos para evaluar dichas diferencias antes de pasar a una nueva tecnología.

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN de la diana no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de la diana presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden ser no válidos debido a un error del Internal Control. En este caso, la muestra debe volver a analizarse, comenzando por la extracción, lo que puede implicar retrasos en la obtención de los resultados finales.

Asimismo, la existencia de posibles polimorfismos, inserciones o eliminaciones en la región del ADN a la que se dirigen los cebadores y las sondas del producto puede afectar negativamente a la detección y la cuantificación del ADN diana.

Como con cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse en combinación con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, este producto presenta un riesgo residual de obtener resultados no válidos o erróneos. Este riesgo residual no se puede eliminar ni reducir aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

No obstante, este riesgo residual asociado al uso previsto del producto se ha ponderado con los beneficios potenciales para el paciente y se ha evaluado como aceptable.

14 PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Tabla 23

| Reacción no válida del calibrador Q-PCR-Standard o del Positive Control | |
|---|--|
| Posibles causas | Soluciones |
| Error de configuración del instrumento. | Comprobar la posición de la PCR Mix, de los Q-PCR Standards y del Positive Control. Comprobar los volúmenes de la PCR Mix, de los Q-PCR Standards y del Positive Control. |
| Degradación de la PCR Mix. | No utilizar la PCR Mix durante más de 7 sesiones independientes: 3 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la PCR Mix durante más de tres sesiones consecutivas: 7 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix. |
| Degradación de los Q-PCR Standards o del Positive Control. | No utilizar el Q-PCR Standard para más de 4 sesiones independientes: 2 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit». No utilizar el Positive Control para más de 4 sesiones independientes: 3 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit». Utilizar nuevas alícuotas de Q-PCR Standards o de Positive Control. |
| Error del instrumento. | Contactar con el servicio técnico de ELiTechGroup. |

Tabla 24

| Reacción no válida del Negative Control | |
|--|--|
| Posibles causas | Soluciones |
| Error de configuración del instrumento. | Comprobar la posición de la PCR Mix y del Negative Control. Comprobar los volúmenes de la PCR Mix y del Negative Control. |
| Contaminación del PCR Mix. | Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix. |
| Contaminación del Negative Control. | No utilizar el Negative Control para más de una sesión. Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular. |
| Contaminación del área de extracción, de las gradillas o del «Inventory Block» (administrador de inventarios). | Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir los probetas y las puntas que se hayan utilizado. |
| Error del instrumento. | Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup. |

Tabla 25

| Reacción no válida de la muestra | |
|---|---|
| Posibles causas | Soluciones |
| Error de configuración del instrumento. | Comprobar la posición de la PCR Mix, del Internal Control y de la muestra. Comprobar los volúmenes de la PCR Mix, del Internal Control y de la muestra. |
| Degradación de la PCR Mix. | No utilizar la PCR Mix para más de 7 sesiones independientes: 3 horas cada una en la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la PCR Mix durante más de tres sesiones consecutivas: 7 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix. |
| Degradación de la plantilla del Internal Control. | Utilizar una nueva alícuota de la Internal Control. |
| Inhibición debida a la presencia de sustancias interferentes en la muestra. | Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Repetir la extracción con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). |
| Error del instrumento. | Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup. |

Tabla 26

| Curva de disociación anómala | |
|--|--|
| Posibles causas | Soluciones |
| Ausencia de un valor máximo definido. Pico definido, pero Tm diferente de la de otras muestras y de la presentada por los calibradores o el Positive Control. | Verificar que el Ct de la diana sea inferior a 30. Una alta cantidad de producto de amplificación al final de la reacción puede interferir con el análisis de la curva de fusión. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia de la diana con una posible mutación. La diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación. |

Tabla 27

| Error en el cálculo del Ct | |
|--|---|
| Posibles causas | Soluciones |
| Concentración demasiado alta de la diana en la muestra con una señal de fluorescencia anómala. | <p>Si se observa una amplificación importante en el gráfico de la PCR, seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como positivo.</p> <p>Si no se observa ninguna amplificación en el gráfico de la PCR, seleccionar el carril («Track») relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como negativo, o bien dejarlo como no válido.</p> <p>Si se requiere un valor Ct:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Repetir la amplificación de la muestra eluida con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). O - Repetir la extracción de la muestra con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). |

Tabla 28

| Tasa anormalmente alta de resultados positivos dentro de la misma sesión (reacciones con valores de Ct tardíos similares) | |
|---|---|
| Posibles causas | Soluciones |
| Contaminación entre muestras durante los pasos preanalíticos. | <p>Limpiar la micropipeta con una solución reciente de hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % o un limpiador de ADN/ARN después de pipetear cada muestra.</p> <p>No utilizar pipetas de Pasteur. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Introducir las muestras en las últimas posiciones de los instrumentos, tal como se indica en la interfaz. Seguir la secuencia de carga indicada por el software.</p> |
| Contaminación medioambiental en el laboratorio | <p>Limpiar todas las superficies que están en contacto con el operador y las muestras (inclusive las pipetas) con solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN.</p> <p>Realizar un ciclo de descontaminación con radiación UV.</p> <p>Utilizar una nueva probeta de la PCR Mix o de CPE.</p> |

15 SÍMBOLOS



Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.



Código de lote.



Fecha de caducidad (último día del mes).



Producto sanitario para diagnóstico in vitro.



Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.



Identificador único del producto



Contenido suficiente para «N» análisis.



Atención: Consultar las instrucciones de uso.



Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante.

16 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto contiene reactivos fabricados por Thermo Fisher Scientific, que se venden conforme a acuerdos de licencia entre ELiTechGroup S.p.A. y sus afiliadas y Thermo Fisher Scientific. El precio de compra de este producto incluye derechos limitados y no transferibles para utilizar únicamente esta cantidad de producto exclusivamente para las actividades del comprador directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre cómo adquirir una licencia para este producto con fines distintos de los indicados anteriormente, contactar con el departamento de licencias de Thermo Fisher Scientific. Correo electrónico: outlicensing@thermofisher.com.

ELiTe MGB® detection reagents are covered by one or more of U. S. Patent numbers 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, and EP patent numbers 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 as well as applications that are currently pending.

ELiTe InGenius® y las tecnologías ELiTe BeGenius® están cubiertos por patentes y solicitudes de patentes.

Esta licencia limitada permite a la persona o a la entidad a la que se ha suministrado este producto utilizar este y los datos generados con el uso del producto exclusivamente para diagnóstico humano. Ni ELiTechGroup S.p.A. ni sus licenciarios conceden ninguna otra licencia, ni expresa ni implícita, para ningún otro propósito.

Appendix A Pneumocystis ELiTe MGB Kit utilizado junto con las plataformas de la serie Genius®



ATENCIÓN

Este documento es una versión simplificada de las instrucciones de uso oficiales. Consulte el documento completo antes de utilizar el producto visitando el enlace www.elitech-group.com.

USO PREVISTO

El producto **Pneumocystis ELiTe MGB Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* destinado al uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cuantitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la **detección y la cuantificación de ADN genómico** de *Pneumocystis jirovecii* (**PJ**) en muestras de ADN extraídas de muestras clínicas.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELiTe InGenius®** y **ELiTe BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de resultados utilizando muestras de lavados broncoalveolares (LBA), aspirados bronquiales (AB) y muestras licuadas de esputo.

Este producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico *in vitro* y el seguimiento de infecciones por *Pneumocystis jirovecii*.

Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.


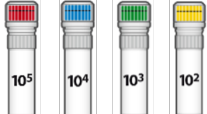

Secuencia amplificada

| Secuencia | Gen | Fluoróforo | Canal |
|------------------|----------------------------|------------|-------|
| Diana | mtLSU | FAM | PJ |
| Internal Control | Secuencia artificial (IC2) | AP525 | CI |

Matrices validadas

- LBA/AB
- Muestras de esputo licuadas

Contenido del kit y productos relacionados

| Pneumocystis ELiTe MGB Kit | Pneumocystis ELiTe Standard | Pneumocystis - ELiTe Positive Control |
|--|---|---|
|  X 8 |  X 2 |  X 3 |
| PCR Mix lista para el uso 8 probetas de 280 µL 96 reacciones por kit 7 ciclos de congelación/ descongelación | 4 niveles listos para el uso: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 2 conjuntos de 4 probetas de 200 µL 4 ciclos de congelación/descongelación | PC listo para el uso 3 probetas de 160 µL 12 reacciones por kit 4 ciclos de congelación/ descongelación |

Período de estabilidad máximo: **24 meses**

Temperatura de almacenamiento:
-20 °C

Otros productos necesarios no proporcionados con el kit

| | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> Instrumento ELiTe InGenius: INT030. Instrumento ELiTe BeGenius: INT040. ELiTe InGenius SP 200: INT032SP200. ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set: INT032CS. ELiTe InGenius PCR Cassette: INT035PCR. ELiTe InGenius Waste Box: F2102-000. | <ul style="list-style-type: none"> CPE - Internal Control: CTRCPE 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S. 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118. |
|---|--|

Protocolos ELiTe InGenius y ELiTe BeGenius

Tabla 29

| | | | |
|--------------------------------------|--------|-----------------------------------|-----------|
| › Volumen de la muestra | 200 µL | › Volumen de R/MG PCR Mix | 20 µL |
| › Volumen del CPE | 10 µL | › Frecuencia de los controles | 15 días |
| › Volumen total de elución: | 100 µL | › Frecuencia de la calibración | 60 días |
| › Volumen de carga de PCR del eluido | 20 µL | Unidad del resultado cuantitativo | copias/mL |

Rendimiento del ELiTe InGenius y de ELiTe BeGenius

| Matriz | Límite de detección | Rango de linealidad | Sensibilidad diagnóstica | Especificidad diagnóstica |
|---------|---------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| LBA | 97 cp/mL | 97–31622777 | 100 % 43/43* | 96,6 % 56/58* |
| Espuito | 97 cp/mL | 97–31622777 | 84,2 % 32/38* | 97,1 % 34/35* |

*muestras confirmadas/muestras analizadas

Preparación de la muestra

Este producto está concebido para utilizarlo en uno de los instrumentos **ELiTe InGenius** o **ELiTe BeGenius** con las siguientes muestras clínicas, identificadas conforme a las directrices para laboratorios y obtenidas, transportadas y conservadas en las condiciones siguientes:

| Muestra | Requisitos de obtención | Condiciones transporte/almacenamiento | | | |
|---|--|--|------------------|------------------|------------------|
| | | de +16 °C a +26 °C (temperatura ambiente) | de +2 °C a +8 °C | -20 °C ±10 °C | -70 °C ±15 °C |
| Lavados broncoalveolares (LBA)/aspirados bronquiales (AB) | en solución fisiológica estéril o solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS*) | | ≤1 semana | ≤30 días | ≤1 año |
| Espuito (ESP) | | | ≤1 semana | ≤30 días | >30 días |

*PBS: solución tamponada con fosfato

Procedimientos con el ELiTe InGenius

La interfaz del ELiTe InGenius guía al usuario paso a paso durante la configuración de la sesión. Todos los pasos, a saber, la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados, se realizan automáticamente. Existen dos modos operativos, a saber, sesión completa «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y «PCR only» (Solo PCR).

Antes del análisis

| | | |
|--|---|--|
| 1. Encender el ELiTe InGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo « CLOSED » | 2. Verificar los controles: Positive Control y Negative Control en el menú «Controls» (Controles). Nota: los dos tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados. | 3. Descongelar las probetas de PCR Mix y de CTRCPE . Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos. |
|--|---|--|

Procedimiento 1. Serie completa: «Extract + PCR» (Extracción + PCR); p. ej., muestras

| | | |
|--|--|--|
| 1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil. | 2. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL»; «Elution» (Elución): «100 µL» | 3. Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra. |
| 4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay protocol»: PJ ELiTe_BAL_200_100 o PJ ELiTe_SP_200_100 o | 5. Seleccionar el método «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y la posición de la muestra: Probeta primaria o «Extraction Tube» (Tubo de extracción) | 6. Cargar la he PCR Mix y el Internal Control en el «Inventory Block» (administrador de inventarios). |
| 7. Cargar: Cargar el PCR Cassette, el cartucho de extracción, la «Elution Tube» (Tubo de elución), las puntas y las gradillas de muestras primarias. | 8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento. | 9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados. |

NOTA!

si necesita utilizar el modo de procesamiento «Extract Only» (Solo extracción) consulte las instrucciones de uso del instrumento para saber cómo realizar el procedimiento.

Procedimiento 2. «PCR Only» (Solo PCR); p. ej., eluidos, calibradores, controles

| | | |
|--|---|--|
| 1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil. | 2. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL»; «Elution» (Elución): «100 µL» | 3. Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra. |
| 4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol»: PJ ELiTe_PC y PJ ELiTe_NC | 5. Seleccionar el método «PCR Only» (Solo PCR) y establecer la posición de la muestra «Elution Tube» (Tubo de elución). | 6. Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios). |
| 7. Cargar: El PCR Cassette y la rejilla de la «Elution Tube» (Tubo de elución) con el ácido nucleico extraído. | 8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento. | 9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados. |

Procedimientos con el ELiTe BeGenius

La interfaz del ELiTe BeGenius guía al usuario paso a paso durante la configuración de la sesión. Todos los pasos, a saber, la extracción, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados, se realizan automáticamente. Existen dos modos operativos, a saber, sesión completa «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y «PCR only» (Solo PCR).

Antes del análisis

| | | |
|---|--|---|
| 1. Encender el ELiTe InGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo « CLOSED » | 2. Verificar los controles: Positive Control y Negative Control en el menú «Controls» (Controles). Nota: los dos tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados. | 3. Descongelar las probetas de PCR Mix y de CTRCPE . Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos. |
|---|--|---|

Procedimiento 1. Serie completa: «Extract + PCR» (Extracción + PCR); p. ej., muestras

| | | |
|--|--|--|
| 1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). | 2. Insertar la «Sample Rack» (Rack de muestras) con las muestras dotadas de códigos de barras en la «Cooling Unit» (unidad de refrigeración). El escaneo de códigos de barras ya está activo. | 3. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL», «Eluate» (Eluido): «100 µL» |
| 4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo). PJ ELiTe_Be_BAL_200_100 o PJ ELiTe_Be_SP_200_100 o Nota: Si es necesario llevar a cabo una segunda extracción, repetir los pasos del 2 al 4. | 5. Imprima las etiquetas para incluir el código de barras correspondiente en las probetas de elución vacías. Cargar las probetas en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit» | 6. Cargar el PCR Mix y el Internal Control en la «Reagent Rack/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) e insertarla en la «Cooler Unit». |
| 7. Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el «PCR Cassette» y la «Extraction Basket» (cesta de extracción), con los cartuchos de extracción «ELiTe InGenius SP 200» y los consumibles que se necesitan para la extracción. | 8. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento. | 9. Consultar, aprobar y almacenar los resultados. |

NOTA!

si necesita utilizar el modo de procesamiento «Extract Only» (Solo extracción) consulte las instrucciones de uso del instrumento para saber cómo realizar el procedimiento.

Procedimiento 2. «PCR Only» (Solo PCR); p. ej., eluidos, calibradores, controles

| | | |
|---|---|--|
| 1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). | 2. Cargar el ácido nucleico extraído o las probetas con códigos de barras de los controles en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit». | 3. Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL», «Eluate» (Eluido): «100 µL» |
| 4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo). (EV ELiTe_Be_PC and EV ELiTe_Be_NC or EV ELiTe_Be_STD) | 5. Load the complete reaction mixture in the Reagent/Elution Rack and insert it in the Cooler Unit | 6. Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el «PCR Cassette» |
| 7. Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento. | 8. Consultar, aprobar y almacenar los resultados. | |

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Turín, Italia
Teléfono: +39-011 976 191
Fax: +39-011 936 76 11

Correo electrónico: emd.support@elitechgroup.com
Página web: www.elitechgroup.com

