



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 08/06/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«CMV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTK015PLD

This new revision of the Instruction for Use (IFU) contains the following changes:

- *Extension of the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040), Plasma and Whole Blood*
- *Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS:*
 - *Change in Limit of Detection (LoD)*
 - *Change in Linear measuring range*
 - *Addition of Repeatability*
 - *Addition of Reproducibility*
- *Introduction of IC cut-off value*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT

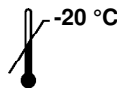


DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD



ÍNDICE

USO PREVISTO	pág. 2
PRINCIPIO DE LA PRUEBA	pág. 2
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO	pág. 3
MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO	pág. 3
MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO	pág. 3
OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS	pág. 3
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	pág. 5
ELITE INGENIUS®	pág. 6
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 6
ELITE INGENIUS® PROCEDIMIENTO	pág. 9
ELITE BEGENIUS®	pág. 16
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 16
ELITE BEGENIUS® PROCEDIMIENTO	pág. 18
CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES ELITE INGENIUS® y ELITE BEGENIUS®	pág. 22
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	pág. 36
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 36
PROCEDIMIENTO	pág. 38
CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES	pág. 48
Roche cobas z 480 analyzer	pág. 62
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 62
PROCEDIMIENTO	pág. 63
CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES	pág. 69
BIBLIOGRAFÍA	pág. 74
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	pág. 74
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	pág. 75
SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS	pág. 77
AVISO AL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	pág. 78

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

USO PREVISTO

El producto «**CMV ELITE MGB® Kit**» es una prueba cualitativa y cuantitativa de amplificación de los ácidos nucleicos para la **detección y cuantificación del ADN del Citomegalovirus humano (CMV)** en muestras de ADN extraído de sangre entera recolectada con EDTA, plasma extraído con EDTA, líquido cefalorraquídeo, orina, tampónes bucales y líquido amniótico.

El producto se utiliza para el diagnóstico y el monitoreo de la infección por CMV, junto con los datos clínicos del paciente y con los resultados de otros exámenes de laboratorio.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

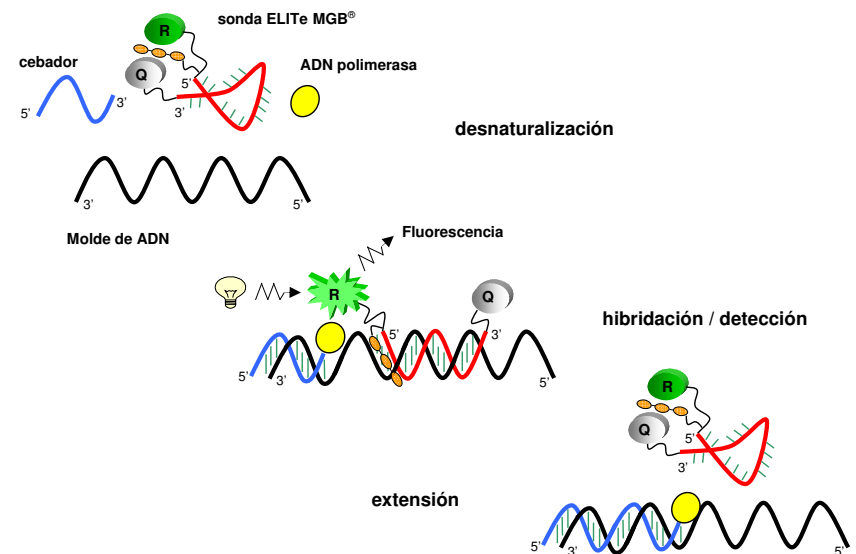
La prueba prevé la realización de una reacción de amplificación real time en microplaca con un termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia.

En cada pocillo se realizan dos reacciones de amplificación: una específica para una región del **exon 4 del gen MIEA de CMV** (major immediate early antigen, HCMVUL123) y una específica para la región del gen humano que codifica la **beta globina** (Control Interno de inhibición) utilizando el DNA extraído de las muestras en examen. La sonda con tecnología ELITE MGB® específica para CMV, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación para CMV. La sonda con tecnología ELITE MGB® específica para el Control Interno, marcada con el fluoróforo AP525 (equivalente a VIC), se activa cuando hibrida con el producto de la reacción de amplificación para el Control Interno. La emisión de la fluorescencia aumenta con el aumento de los productos específicos de la reacción de amplificación y es medida y registrada por el aparato. La elaboración de los datos permite detectar la presencia y el título del ADN de CMV en la muestra de partida.

Cuando finaliza una sesión, se puede analizar la curva de disociación (melting curve) y determinar la temperatura de disociación (melting temperature) para confirmar la presencia del target correcto o identificar la presencia de mutaciones.

El ensayo ha sido validado en los sistemas informados en este manual de instrucciones.

En la siguiente figura se resume el mecanismo de activación y emisión de la fluorescencia de la sonda con tecnología ELITE MGB®. Notar que la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación y, por lo tanto podrá, ser utilizada para realizar la curva de disociación.



PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**CMV ELITE MGB® Kit**» suministra una **mezcla de reacción completa y lista para usar** "CMV Q - PCR Mix" para la amplificación real time en una solución estabilizadora, **previamente dosificada en cuatro probetas**. Cada probeta contiene **540 µL** de solución, suficiente para **24 tests** (procesando al menos 2 muestras por sesión) utilizando el «**ELITE InGenius®**» y el «**ELITE BeGenius®**» y **25 tests** en asociación con otros sistemas.

Los oligonucleótidos cebadores y la sonda para CMV (estabilizada por el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo FAM e inactivada por el quencher no fluorescente) son específicos para una **región del exon 4 del gen MIEA de CMV** (major immediate early antigen, HCMVUL123).

Los oligonucleótidos cebadores y la sonda para el Control Interno (estabilizada por el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo AP525, equivalente a VIC, e inactivada por el quencher no fluorescente) son específicos para la **región promotora y 5' UTR del gen humano que codifica la beta Globina**.

La mezcla de reacción provee el sistema tampón, el cloruro de magnesio, los nucleótidos trifosfatos, el fluoróforo AP593 (usado en el lugar del ROX o del Cy5 como referencia pasiva para la normalización de la fluorescencia), la enzima Uracil-N-glicosidasa (UNG) para la inactivación de las contaminaciones por productos de amplificación y la enzima ADN polimerasa de activación térmica (hot start).

El kit permite efectuar **96 determinaciones en asociación con los sistemas «ELITE InGenius®»** y el «**ELITE BeGenius®**», estándares y controles incluidos.

El kit permite efectuar **100 determinaciones en asociación con otros sistemas**, estándares y controles incluidos.

MATERIAL PROVISTO EN EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de los peligros
CMV Q-PCR Mix	mezcla completa de reacción	4 x 540 µL	-

MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO EN EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin polvo descartables de nitrilo o similares.
- Mezclador vortex.
- Microcentrífuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas y tips estériles con filtro para aerosol o de dispensación positiva (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Agua de grado molecular para biología.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument calibrado según las indicaciones del fabricante.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia cobas z 480 analyzer calibrado según las indicaciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS

Los reactivos para la extracción de ADN de las muestras a analizar, el control de extracción positivo, el control de amplificación positivo, el ADN estándar en cantidades conocidas y los consumibles **no** están incluidos en este producto

Para la extracción manual del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar el producto genérico «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., código EXTB01), kit para la extracción de ADN a partir de muestras celulares y no celulares.

Para la ejecución automática de la extracción, amplificación e interpretación del ADN de los resultados de las muestras a analizar con el instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup SpA, código INT030), se requiere el uso de los siguientes productos genéricos: cartuchos extracción «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup SpA, código INT032SP200) o «**ELITE InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., código INT033SP1000), y consumibles para extracción y amplificación a partir de muestras biológicas «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup SpA, código INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup SpA, código F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup SpA, código INT035PCR) y «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, Código TF-350-L-R-S).

El instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup SpA, código INT030) y los siguientes protocolos específicos de Ensayo (ELITechGroup SpA) son necesarios para la ejecución automática de la extracción de ADN, la amplificación en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras a analizar:

- para el calibrador «**CMV ELITE STD**» o «**CMV ELITE STD_1000_100**»,
- para el control de amplificación positivo «**CMV ELITE_PC**» o «**CMV ELITE_PC_1000_100**»,
- para el control de amplificación negativo «**CMV ELITE_NC**» o «**CMV ELITE_NC_1000_100**»,
- para las muestras analizadas «**CMV ELITE_WB_200_100**», «**CMV ELITE_PL_200_100**», «**CMV ELITE_PL_1000_100**», «**CMV ELITE_CSF_200_100**», «**CMV ELITE_U_200_100**», «**CMV ELITE_BS_200_100**» y «**CMV ELITE_AF_200_100**» and «**CMV ELITE_BAL_200_100**».

Para el análisis automático de muestras con el instrumento «**ELITE BeGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040), se ha validado el uso de los siguientes productos genéricos: los cartuchos de extracción «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200) y los consumibles para la extracción y la amplificación de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR) y «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Suiza, ref. 30180118).

Para la extracción automática de ADN, la amplificación y la interpretación de los análisis de las muestras, es necesario utilizar el instrumento «**ELITE BeGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040) y los siguientes protocolos de ensayo específicos (ELITechGroup S.p.A.):

- para los calibradores, «**CMV ELITE_Be STD**»;
- para el control positivo de amplificación, «**CMV ELITE_Be_PC**»,
- para el control negativo de amplificación, «**CMV ELITE_Be_NC**»;
- para los análisis de muestras, «**CMV ELITE_Be_WB_200_100**» y «**CMV ELITE_Be_PL_200_100**».

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar el producto genérico «**ELITE STAR 200 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., código INT011EX), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el instrumento «**ELITE STAR**» (ELITechGroup S.p.A., código INT010).

«**ELITE STAR 200 Extraction Kit**» y «**ELITE STAR**» constituyen **ELITE STAR System**.

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja utilizar el producto genérico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., código INT021EX), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el instrumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., código INT020). El instrumento «**ELITE GALAXY**» También puede ejecutar la configuración de PCR.

«**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» y «**ELITE GALAXY**» constituyen **ELITE GALAXY System**.

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, también se aconseja utilizar el producto genérico «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, códigos 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, código 200111).

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja también el empleo del producto «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, código 931236), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el equipo «**QIASymphony® SP/AS**» (códigos 9001297, 9001301) y los relativos productos genéricos.

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar, se aconseja también el empleo del

CMV ELITE MGB® Kit

reactivo para la amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

producto «**MAGNA Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, código 07658036001), kit de extracción de los ácidos nucleicos de muestras biológicas, con el equipo «**MAGNA Pure 24 System**» (Roche, código 07290519001).

En caso que sea previsto el uso de un equipo 7300 Real-Time PCR System, se aconseja utilizar el producto genérico «**Q - PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC01) microplacas con pocillos de 0,2 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

En caso que sea previsto el uso de un equipo 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, se aconseja utilizar el producto genérico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., código RTSACC02) microplacas con pocillos de 0,1 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

En caso que sea previsto el uso de un equipo cobas z 480 analyzer, se aconseja utilizar el producto genérico «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, código 05232724001), microplacas con pocillos de 0,3 mL y láminas adhesivas para la amplificación real time.

En caso que sea necesario la detección de ADN de CMV para el análisis cualitativo se aconseja utilizar el producto **CMV - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A. código CTR015PLD) o del producto de ELITechGroup S.p.A. "**CMV - ELITE Positive Control RF**" (código CTR015PLD-R) específico para el uso con el instrumento analizador cobas z 480, control positivo de ADN de plásmido.

En caso que sea necesario la detección y la cuantificación de ADN de CMV para el análisis cuantitativo se aconseja utilizar el producto «**CMV ELITE Standard**» (ELITechGroup S.p.A., código STD015PLD), cuatro diluciones de ADN plasmídico en cantidad conocida para obtener la curva estándar.

Como control positivo de la extracción de los ácidos nucleicos a partir de muestras no celulares y como control de inhibición se requiere utilizar el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., código CTRCPE), una solución estabilizada que contiene ADN de dos plásmidos y el ARN genómico del fago MS2.

Un factor de conversión permite que los resultados cuantitativos se expresen en unidades internacionales de CMV del "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC, UK, código 09/162).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto es para uso exclusivo *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si pudiesen transmitir agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No producir salpicaduras ni aerosol. El material que está en contacto con las muestras biológicas debe ser tratado con hipoclorito de sodio al 3 % por al menos 30 minutos o bien, tratado en autoclave a 121 °C durante una hora antes de ser eliminado.

Manipular y eliminar todos los reactivos y todos los materiales utilizados para realizar la prueba como si fuesen potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No producir salpicaduras ni aerosol. Los residuos deben ser tratados y eliminados según normas de seguridad adecuadas. El material combustible monouso debe ser incinerado. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben ser neutralizados antes de la eliminación.

Usar indumentaria de protección y guantes adecuados, protegerse los ojos / la cara.

No pipetear con la boca ninguna solución.

No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el área de trabajo.

Lavarse bien las manos después del manejo de muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos según las normas vigentes.

Leer atentamente todas las instrucciones provistas en el producto antes de realizar la prueba.

Respetar las instrucciones provistas en el producto durante la ejecución de la prueba.

Respetar la fecha de caducidad del producto.

Utilizar sólo los reactivos presentes en el producto y los aconsejados por el fabricante.

No usar reactivos que provengan de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones en los procedimientos de biología molecular**CMV ELITE MGB® Kit**

reactivo para la amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, requieren personal competente e instruido para evitar el riesgo de resultados incorrectos, en particular a causa de la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o de la contaminación de las mismas por parte de productos de amplificación.

Para la preparación manual, es necesario disponer de áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación o para la amplificación / detección de los productos de amplificación. Nunca introducir un producto de amplificación en el área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.

Para la preparación manual, es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos destinados para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de productos de amplificación. Nunca transferir batas, guantes e instrumentos del área de amplificación / detección de productos de amplificación al área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación. Las muestras deben ser destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben ser manipuladas bajo una campana de flujo laminar. Las probetas que contengan muestras diferentes nunca deben ser abiertas al mismo tiempo. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosol. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los reactivos deben ser manipulados bajo campana de flujo laminar. Los reactivos necesarios para la amplificación deben ser preparados de manera tal que sean utilizados en una sola sesión. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas sólo a este uso. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o usar tips con filtro para aerosoles. Los tips utilizados deben ser estériles, sin la presencia de ADNasa y ARNasa, sin la presencia de ADN y ARN.

Los productos de amplificación deben ser manipulados en modo de limitar al máximo su dispersión en el ambiente para evitar contaminaciones. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben ser destinadas sólo a este uso.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes

La **CMV Q - PCR Mix** debe ser conservada en lugar oscuro a -20° C.

La **CMV Q - PCR Mix** puede ser congelado y descongelado por un máximo de **cinco veces**. Otros ciclos de congelación / descongelación pueden provocar una pérdida de las prestaciones del producto.

La **CMV Q - PCR Mix** puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una o puede mantenerse a bordo en el bloque refrigerado hasta 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una.

ELITE InGenius®**MUESTRAS Y CONTROLES****Muestras**

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA e identificarse de acuerdo con las prácticas para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

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

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de sangre se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius®** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITE WB 200 100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Cuando se utiliza la probeta primaria, el volumen de la muestra varía en función de la probeta que se haya cargado. Para obtener más información sobre cómo realizar la configuración y el procedimiento de

extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse de +2 °C a +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

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

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de plasma se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITE_PL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de plasma se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITE_PL_1000_100**, que procesa 1000 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

La probeta primaria no puede utilizarse con el protocolo de ensayo CMV ELITE_PL_1000_100.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) para la extracción del ADN deben extraerse de acuerdo con las directrices para laboratorios, evitando su contaminación con sangre del paciente, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cuatro horas; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

Antes de realizar el análisis con este producto, es necesario transferir 0,2 mL de la muestra a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de líquido cefalorraquídeo se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITE_CSF_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Orina

Para la extracción de ácidos nucleicos, es preciso recoger muestras de orina en recipientes sin conservantes conforme a las directrices para laboratorios, así como transportarlas y conservarlas a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) durante un máximo de cuatro horas; de lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

Antes de realizar el análisis con este producto, es necesario transferir 0,2 mL de la muestra a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

En la medida de lo posible, evitar congelar las muestras de la primera orina de la mañana, pues la congelación puede provocar la precipitación de inhibidores y la pérdida del título de ADN.

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir en alícuotas las muestras que van a congelarse.

Nota: Cuando la extracción del ADN de muestras de orina se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITE_U_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Exudado bucal

Las muestras de exudados bucales para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse con los sistemas de recogida y transporte (COPAN Italia S.p.A., ref. 480CE), así como identificarse conforme a las directrices para laboratorios y transportarse y conservarse a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) durante un máximo de cinco días; de lo contrario, deben conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de siete días; de lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de seis meses, o

a -70 °C durante períodos más largos.

Antes de realizar el análisis con este producto, es necesario transferir 0,2 mL de la muestra a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de exudados bucales se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITE_BS_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Líquido amniótico

Las muestras de líquido amniótico para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse conforme a las directrices para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cuatro horas; de lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

Antes de realizar el análisis con este producto, es necesario transferir 0,2 mL de la muestra a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

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

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de líquido amniótico se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITE_AF_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Lavados broncoalveolares (LBA) y aspirados bronquiales (AB)

Las muestras de LBA/AB concebidas para la extracción de ADN deben recogerse en una solución fisiológica estéril o en una solución tamponada con fosfato estéril de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse de +2 °C a +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de una semana. De lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C hasta un año, de acuerdo con las directrices para laboratorios.

Antes de realizar el análisis con este producto, es necesario transferir 0,2 mL de la muestra a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

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.

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.

Nota: Cuando la extracción del ADN a partir de muestras de LBA/AB se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de ensayo **CMV ELITE_BAL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Otras muestras:

No hay datos disponibles sobre el rendimiento del producto con el ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: suspensiones de leucocitos, suspensiones de granulocitos.

Sustancias interferentes

Con el fin de evitar problemas de inhibición y el riesgo de resultados no válidos frecuentes, el ADN extraído de la muestra no debe contener heparina, hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol ni 2-propanol.

Una alta cantidad de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra puede inhibir la reacción de amplificación.

No se dispone de datos sobre la inhibición provocada por fármacos antiviricos, antibióticos, quimioterápicos o inmunosupresores.

Calibradores de amplificación y controles de amplificación

Antes de analizar cualquier muestra, es indispensable preparar y aprobar la curva de calibración y validar los reactivos para cada lote de reactivos de amplificación:

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Como conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del **CMV ELITE Standard**, junto con el protocolo «**CMV ELITE Be STD**».

Como control positivo de amplificación, utilizar el producto «**CMV - ELITE Positive Control**» junto con el protocolo «**CMV ELITE Be PC**».

Como control negativo de amplificación, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro del kit) junto con el protocolo «**CMV ELITE Be NC**».

Nota: El **ELITE BeGenius** con el **software ELITE BeGenius** permite generar la curva de calibración y validar los controles de amplificación para cada uno de los lotes de reactivos de amplificación que se va a guardar en la base de datos.

Las curvas de calibración, aprobadas y guardadas en la base de datos, caducan **después de 60 días**. Se necesita una fecha de caducidad para volver a procesar el conjunto de calibradores.

Los resultados del control de validación de la amplificación, aprobados y guardados en la base de datos, caducan **después de 15 días**. Se necesita una fecha de caducidad para volver a procesar los controles positivo y negativo.

Los calibradores y los controles de la amplificación deben volver a analizarse si se presenta una de las siguientes circunstancias:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación.
- 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 el instrumento **ELITE BeGenius**.

Controles de calidad

Se deben realizar controles externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda. Ejemplos de controles externos disponibles comercialmente son los productos «**CMV Molecular Q Panel**» (ref. CMVMQP01 de Qnostics Ltd, Reino Unido) y «**AcroMetrix® CMV_v Panel**» (Acrometrix, Life Technologies, EE. UU.).

PROCEDIMIENTO

El procedimiento para utilizar el producto «**CMV - ELITE MGB® Kit**» con el sistema **ELITE InGenius** consta de tres fases:

- Verificación de que el sistema esté preparado
- Configuración de la sesión
- Examen y aprobación de los resultados

Verificación de que el sistema esté preparado

Antes de iniciar la sesión, consultar la documentación del instrumento para efectuar las siguientes tareas:

- encender **ELITE InGenius** y seleccionar el modo «**CLOSED**»;
- verificar (Calibration) que los calibradores (Q-PCR estándar) hayan sido ejecutados, aprobados y no estén vencidos (status). Estos controles se pueden ejecutar desde el menú "Calibration" de la "Home page";
- verificar (Controls) que los controles de amplificación (Positive Control, Negative Control) hayan sido ejecutados, aprobados y no estén vencidos (status). Estos controles se pueden ejecutar desde el menú "Control" de la "Home page";
- seleccionar el tipo de ciclo y configurarlo siguiendo las instrucciones para configurar la sesión, utilizando los protocolos de las pruebas suministrados por ELITechGroup. Estos protocolos IVD han sido validados específicamente con los kits ELITE MGB y el instrumento **ELITE InGenius**.

Los protocolos de la prueba disponible para el kit CMV ELITE MGB se describe en la siguiente tabla.

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Protocolo de la prueba para el kit CMV ELITE MGB			
Nombre	Matriz	Relación unitaria	Características
CMV ELITE_WB_200_100	Sangre Entera	gEq/mL o UI/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
CMV ELITE_PL_200_100	Plasma	gEq/mL o UI/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
CMV ELITE_PL_1000_100	Plasma	gEq/mL o UI/mL	Volumen de extracción inicial: 1000 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
CMV ELITE_CSF_200_100	Líquido cefalorraquídeo	gEq/mL o UI/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL

Protocolo de la prueba para el kit CMV ELITE MGB			
Nombre	Matriz	Relación unitaria	Características
CMV ELITE_U_200_100	Orina	gEq/mL o UI/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
CMV ELITE_BS_200_100	Tampones bucales	gEq/mL o UI/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
CMV ELITE_AF_200_100	Líquido amniótico	gEq/mL o UI/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL

CMV ELITe_BAL_200_100	BAL / BA	gEq/mL or IU/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Factor de dilución: 1 Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
------------------------------	----------	-----------------	--

Si el protocolo de la prueba buscado no se encuentra en el sistema, comunicarse con el Servicio al Cliente local de ELITechGroup.

Los protocolos para el análisis cualitativo están disponibles a pedido.

Configuración de la sesión

El **CMV ELITe MGB® kit** asociado con **ELITe InGenius®** se puede utilizar para ejecutar:

- Ciclo integrado (Extract + PCR),
- Ciclo de amplificación (PCR only),
- Calibración del ciclo (PCR only),
- Ciclo de amplificación para el control positivo y el control negativo (PCR only)

El perfil térmico de amplificación está incluido en el protocolo de la prueba disponible en el instrumento y se activa automáticamente cuando se selecciona el protocolo de dosificación.

Nota: el sistema **ELITe InGenius** se puede conectar al "Servidor de información de ubicación" (LIS) a través del cual se puede enviar la información de configuración de la sesión. Para información detallada, consulte el manual de instrucciones del instrumento.

Los siguientes son los principales pasos para configurar los cinco tipos de ciclos.

A Ciclo integrado

Para configurar el ciclo integrado atenerse a las siguientes indicaciones visualizadas en **SW Graphical User Interface (GUI)**:

- Descongelar los tubos de CMV Q - PCR Mix necesarios para la sesión. Cada probeta alcanza para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Descongelar los tubos de CPE necesarios para la sesión. Cada tubo es suficiente para 12 extracciones. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar "Perform Run" desde la pantalla "Home".
- Asegurarse de que el volumen de extracción inicial sea de 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 1000 µL de muestra y que el volumen del Eluato extraído sea de 100 µL.
- Para cada pista completar el "SampleID" (SID) ingresando o leyendo el código de barras de la muestra.
- Seleccionar el protocolo del test que se debe utilizar en la columna "Assay" (por ejemplo CMV ELITe_WB_200_100).
- Asegurarse de que el "Protocol" visualizado sea: "Extract + PCR".
- Seleccionar la posición de carga de la muestra en la columna "Sample Position":
 - si se utiliza un tubo primario, seleccionar "Primary Tube", el tubo primario solo puede usarse a partir de 200 µL de muestra;
 - si se utiliza un tubo secundario, seleccionar "Extraction Tube".
 Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
- Cargar el CPE y la Q-PCR Mix en el Inventory Block seleccionado, siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario. Consultar el manual de uso del instrumento para configurar el Inventory Block, si es necesario. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
- Cargar / controlar los Rack de puntas en la Inventory Area seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
- Cargar las muestras que se deben extraer en la posición indicada en el punto 8, los cartuchos de extracción, los cassette de PCR y todos los productos de consumo, siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.

- Cerrar la portezuela del instrumento.
- Presionar "Start" para iniciar el ciclo.

Al finalizar el procedimiento, el **ELITe InGenius** permite visualizar, aprobar, memorizar los resultados, imprimir y guardar el informe.

Cuando el sistema está inactivo, se puede abrir la portezuela (End of Run) y retirar del instrumento los materiales de consumo.

Nota: Al finalizar el ciclo se puede retirar la muestra primaria que quedó en el instrumento, tapanla, identificarla y conservarla a -20 °C. Evitar derramar la muestra mientras se la retira.

Nota: Al final del ciclo se deben retirar del instrumento los cassette PCR con los reactivos y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

B Ciclo de amplificación

Para configurar el ciclo de amplificación seguir las indicaciones que aparecen en la GUI:

- Descongelar los tubos de CMV Q - PCR Mix necesarios para la sesión. Cada probeta alcanza para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar "Perform Run" desde la pantalla "Home".
- Asegurarse de que el volumen de extracción inicial sea de 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 1000 µL de muestra y que el volumen del Eluato extraído sea de 100 µL.
- Para cada pista completar el "SampleID" (SID) ingresando o leyendo el código de barras de la muestra.
- Seleccionar el protocolo del test que se debe utilizar en la columna "Assay" (por ejemplo CMV ELITe_WB_200_100).
- Seleccionar "PCR Only" en la columna "Protocol".
- Asegurarse de cargar la muestra eluida en "ExtraTube (posición 1)" en la columna "Sample Position". Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
- Cargar la Q-PCR Mix en el Inventory Block seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
- Cargar / controlar los Rack de puntas en la Inventory Area seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
- Cargar las muestras de los ácidos nucleicos extraídos y el cassette PCR, siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario. Consultar el manual de uso del instrumento para configurar el Inventory Block, si es necesario. Hacer clic en el pulsador "Next" para continuar con el procedimiento.
- Cerrar la portezuela del instrumento.
- Presionar "Start" para iniciar el ciclo.

Al finalizar el procedimiento, el **ELITe InGenius** permite visualizar, aprobar, memorizar los resultados, imprimir y guardar el informe.

Nota: Al finalizar el ciclo se puede retirar la muestra que quedó en el instrumento, tapanla, identificarla y conservarla a -20 ° C. Evitar derramar la muestra mientras se la retira.

Nota: Al final del ciclo se deben retirar del instrumento los cassette PCR con los reactivos y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

C Ciclo de calibración

Para configurar el ciclo de calibración seguir las indicaciones que aparecen en la GUI:

1. Descongelar los tubos de CMV Q - PCR Mix necesarios para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar los tubos de CMV ELITe Standard (Cal1: CMV Q-PCR Standards 10², Cal2: CMV Q-PCR Standards 10³, Cal3: CMV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CMV Q-PCR Standards 10⁵). Cada tubo es suficiente para 4 extracciones. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar "Perform Run" desde la pantalla "Home".
4. Asegurarse de que el volumen de extracción inicial sea de 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 1000 µL de muestra y que el volumen del Eluato extraído sea de 100 µL.
5. A partir de la pista de interés, seleccionar el protocolo de dosificación que se debe utilizar en la columna "Assay" CMV ELITe_STD) y completar el número de lote y la fecha de vencimiento para el Q - PCR estándar. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
6. Cargar la Q-PCR Mix en el Inventory Block seleccionado siguiendo las instrucciones de la GUI. Consultar el manual de uso del instrumento para configurar el Inventory Block, si es necesario. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
7. Cargar / controlar los Rack de puntas en la Inventory Area seleccionada siguiendo las GUI. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
8. Cargar los tubos de calibración y el cassette PCR, siguiendo las instrucciones de la GUI. Consultar el manual de uso del instrumento para configurar el Inventory Block, si es necesario. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
9. Cerrar la portezuela del instrumento.
10. Presionar "Start" para iniciar el ciclo.

Al finalizar el procedimiento, el **ELITe InGenius** permite visualizar, aprobar, memorizar los resultados, imprimir y guardar el informe.

Nota: Al finalizar el ciclo se puede retirar el estándar que quedó en el instrumento, taparlo y conservarlo a -20 °C.

Nota: Al final del ciclo se deben retirar del instrumento los cassette PCR con los reactivos y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

D. Ciclo de amplificación para el Control Positivo y el Control Negativo

Para configurar el ciclo de amplificación del Control Positivo seguir las indicaciones que aparecen en la GUI:

1. Descongelar los tubos de CMV Q - PCR Mix necesarios para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar el producto CMV ELITe Positive Control para la amplificación del Control Positivo. Descongelar un tubo a temperatura ambiente. Cada tubo es suficiente para 2 extracciones. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter el agua de grado molecular para las sesiones en una probeta de elución, suministrada con ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Seleccionar "Perform Run" desde la pantalla "Home".
5. Seleccionar el "Extraction Input Volume": 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 1000 µL de muestra y asegúrese de que el "Volumen de elución extraído" esté configurado en 100 µL.
6. Seleccionar CMV ELITe_PC para el Control Positivo y completar el número de lote y la fecha de

- vencimiento para - Positive Control (Control Positivo),
7. Seleccionar CMV ELITe_NC y completar el número de lote y la fecha de vencimiento para el Control Negativo CMV.
8. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
9. Cargar la CMV Q-PCR Mix en el Inventory Block seleccionado siguiendo las instrucciones de la GUI. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
10. Cargar / controlar los Rack de puntas en la Inventory Area seleccionada siguiendo las instrucciones de la GUI. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
11. Cargar el cassette PCR, el Control Positivo y el Control Negativo siguiendo las instrucciones de la GUI. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
12. Cerrar la portezuela del instrumento.
13. Presionar "Start" para iniciar el ciclo.

Al finalizar el procedimiento, el **ELITe InGenius** permite visualizar, aprobar, memorizar los resultados, imprimir y guardar el informe.

Nota: El Control Positivo se debe ejecutar como control de amplificación, para configurar el documento de control. Para configurar el gráfico se requieren cuatro (4) valores de control positivo en 4 sesiones distintas. Después de lo cual el instrumento memoriza los valores del control positivo y los utiliza para el seguimiento de la fase de amplificación. Consultar el manual de uso del instrumento para más detalles.

Nota: Al finalizar el ciclo se puede retirar el Control Positivo que quedó en el instrumento, taparlo, identificarlo y conservarlo a -20 °C. Evitar derramar la muestra mientras se la retira.

Nota: Al final del ciclo se deben retirar del instrumento los cassette PCR con los reactivos y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

Examen y aprobación de los resultados

Al finalizar el ciclo se visualiza automáticamente la pantalla "Results Display". En esta pantalla se visualizan los resultados relativos a muestra / calibrador / control y la información pertinente al ciclo. A partir de esta pantalla se puede aprobar el resultado, imprimir o guardar los informes ("Sample Report" o "Track Report").

Nota: Consultar el manual de instrucciones del instrumento **ELITe InGenius** para más detalles.

ELITe InGenius genera los resultados con el producto **CMV ELITe MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

- A. Validación de la curva de calibración,
- B. Validación de los resultados de amplificación del Control Positivo y del Control Negativo
- C. Validación de los resultados de la muestra,
- D. Generación del informe con los resultados de la muestra.

A. Validación de la curva de calibración

Las señales fluorescentes emitidas por la sonda específica para CMV (FAM, Channel 1 "CMV"), en las reacciones de amplificación del calibrador, son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del instrumento con los parámetros incluidos en el protocolo de la prueba "CMV ELITe_STD".

La curva de calibración para el lote del reactivo de amplificación se memoriza en la base de datos y puede ser visualizada y aprobada por el personal con función de "Administrador" o "Analista", siguiendo las instrucciones de la GUI. La curva de calibración específica para el lote del reactivo de amplificación, vence después de 60 días.

Antes de analizar las muestras es obligatorio generar y aprobar la curva de calibración para el lote de reactivo de amplificación utilizado. La disponibilidad de una curva de calibración y los resultados del control de amplificación "Aprobados" (Status) se visualizan en la pantalla "Calibration" del software ELITe InGenius.

Nota: Cuando la curva de calibración no satisface los criterios de aceptación, el instrumento visualiza el

mensaje "not passed" en el menú "Calibration" y no es posible aprobarla. En ese caso se deben repetir las reacciones de amplificación del calibrador.

Nota: En caso de que la curva de calibración se cargue con las muestras y el resultado no sea válido, toda la sesión no será válida y la amplificación de todas las muestras tendrá que repetirse.

B. Validación de los resultados de amplificación del Control Positivo y del Control Negativo

Las señales fluorescentes emitidas por la sonda específica para CMV (FAM, Channel 1 "CMV"), en las reacciones de amplificación del Control Positivo y del Control Negativo, son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del instrumento con los parámetros incluidos en el protocolo de la prueba "CMV ELITe_PC" y "CMV ELITe_NC".

Los resultados de amplificación del Control Positivo y del Control Negativo, específicos para el lote del reactivo de amplificación, se memorizan en la base de datos y pueden ser visualizados y aprobados (Controls) por el personal con función de "Administrador" o "Analista", siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario.

Los resultados de amplificación del Control Positivo y del Control Negativo, específicos para el lote del reactivo de amplificación, vencen después de 15 días.

Antes de analizar una muestra y después de haber aprobado la curva de calibración, es obligatorio generar y aprobar el resultado de la amplificación del Control Positivo y del Control Negativo para el lote de reactivo de amplificación utilizado. La disponibilidad del resultado del Control Positivo y del Control Negativo de amplificación "Aprobado" (Status) se visualiza en la pantalla "Controls" del software ELITe InGenius.

Nota: Cuando el Control Positivo no satisface los criterios de aceptación, el instrumento visualiza el mensaje "not passed" y no es posible aprobarlo. En ese caso se deben repetir las reacciones de amplificación del Control Positivo y del Control Negativo.

Nota: Cuando se ejecuta el Control Positivo como control de amplificación con las muestras y el resultado no es válido, se invalida toda la sesión y se debe repetir la amplificación de todas las muestras.

C. Validación de los resultados de la muestra

Las señales fluorescentes emitidas por la sonda específica para CMV (FAM, Channel 1 "CMV") y por la sonda específica para el Control Interno (AP525, Channel 2 "IC"), en cada reacción de amplificación, son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del instrumento con los parámetros incluidos en el protocolo de la prueba.

Nota: Antes de analizar cada una de las muestras es obligatorio generar y aprobar la curva de calibración y la validación de los reactivos de amplificación para el lote de reactivo utilizado. Se recomienda, pero es opcional, ejecutar el Control Positivo y Negativo junto a los calibradores. La disponibilidad de una curva de calibración y de amplificación y los resultados del Control Positivo y Negativo "Approved" (Status) se visualizan en las pantallas "Calibration" y "Controls" del software ELITe InGenius. y se informan en la sección "Assay Parameters".

Los resultados se describen en los informes generados por el instrumento ("Result Display").

El ciclo de la muestra es válido cuando se cumplen las tres condiciones indicadas en la tabla siguiente.

1) Curva de calibración	Status
CMV Q-PCR Standard	APPROVED
2) Control Positivo	Status
CMV Positive Control	APPROVED
3) Control Negativo	Status
CMV Negative Control	APPROVED

Para cada muestra, el sistema interpreta automáticamente el resultado del ensayo según lo establecido por el algoritmo del software ELITe InGenius y los parámetros del protocolo del ensayo.

Para cada muestra el sistema ejecuta automáticamente el cálculo de la carga viral. La medida es expresada en "gEq / mL" or "IU / mL como lo determina el protocolo de la muestra.

En la tabla siguiente se visualizan los posibles mensajes referidos al resultado de una muestra.

Resultado del ciclo de la muestra	Interpretación
CMV: DNA Detected, quantity equal to XXX gEq / mL or IU / mL	La cantidad de ADN de CMV detectado coincide con el intervalo de medición de la prueba, como se indica.
CMV: DNA Detected, quantity below LLoQ gEq / mL or IU / mL	El ADN de CMV detectado está por debajo del límite inferior de cuantificación de la prueba
CMV: DNA Detected, quantity beyond ULQ gEq / mL or IU / mL	El ADN de CMV detectado supera el límite superior de cuantificación de la prueba
CMV: DNA Not Detected or below LoD gEq / mL or IU / mL	ADN no detectado o inferior al límite de detección de la prueba.
Invalid - Retest Sample	El resultado de la prueba no es válido por un error de control interno. El Ct de Control Interno resultó No Determinado o superior a 35 (punto de corte del CI = 35). La prueba debe repetirse.

Las muestras que no son adecuadas para interpretar los resultados se informan como "Muestra no validada" por el software ELITe InGenius. En este caso no fue posible detectar eficientemente el ADN del Control Interno porque hubo problemas en la fase de amplificación o en la fase de extracción (degradación del ADN, pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el extracto) que puede causar resultados incorrectos y falsos negativos.

Quando el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída se puede volver a analizar por amplificación en el modo "Sólo PCR". Si se confirma el resultado no válido, se debe volver a analizar la prueba a partir de la extracción de una nueva alícuota utilizando el modo "Extraer + PCR".

Las muestras adecuadas en las que no se pudo detectar ADN de CMV se informan como "ADN no detectado o debajo de LoD". En este caso, no puede excluirse que el ADN del CMV esté presente en un título por debajo del límite de detección del producto (consulte el párrafo "Características de rendimiento").

Nota: Los resultados obtenidos con este dosaje deben interpretarse considerando todos los datos clínicos y los demás exámenes de laboratorio del paciente.

Los resultados del ciclo de la muestra se memorizan en la base de datos y pueden ser visualizados y aprobados (Result Display) por el personal con función de "Administrador" o "Analista", siguiendo las instrucciones de la interfaz gráfica del usuario. Desde la pantalla "Result Display" se pueden imprimir y guardar los resultados. Ejecutar como "Sample Report" y "Track Report".

D. Generación del informe de los resultados de la muestra

Los resultados de la muestra se memorizan en la base de datos y se pueden visualizar como "Sample Report" y "Track Report".

El "Sample Report" muestra los detalles del ciclo de la muestra seleccionada para el ID de la muestra, por ejemplo del paciente.

El "Track Report" muestra los detalles de un ciclo de la muestra pista por pista.

Los "Sample Report" y el "Track Report" pueden imprimirse y firmarse por personal autorizado.

ELITe BeGenius®

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA e identificarse de acuerdo con las prácticas para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir en

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

alícuotas las muestras que van a congelarse. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de sangre se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión 1.3 del **software ELITe BeGenius®** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITe_WB_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Cuando se utiliza la probeta primaria, el volumen de la muestra varía en función de la probeta que se haya cargado. Para obtener más información sobre cómo realizar la configuración y el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse de +2 °C a +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

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

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de plasma se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión 1.3 del **software ELITe BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITe_PL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Nota: Cuando la extracción de ácidos nucleicos de muestras de plasma se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión 1.3 del **software ELITe BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción **CMV ELITe_PL_1000_100**, que procesa 1000 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

La probeta primaria no puede utilizarse con el protocolo de ensayo **CMV ELITe_PL_1000_100**.

Otras muestras:

No hay datos disponibles sobre el rendimiento del producto con el ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: suspensiones de leucocitos, suspensiones de granulocitos.

Sustancias interferentes

Con el fin de evitar problemas de inhibición y el riesgo de resultados no válidos frecuentes, el ADN extraído de la muestra no debe contener heparina, hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol ni 2-propanol.

Una alta cantidad de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra puede inhibir la reacción de amplificación.

No se dispone de datos sobre la inhibición provocada por fármacos antiviricos, antibióticos, quimioterápicos o inmunosupresores.

Calibradores de amplificación y controles de amplificación

Antes de analizar cualquier muestra, es indispensable preparar y aprobar la curva de calibración y validar los reactivos para cada lote de reactivos de amplificación:

Como conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del **CMV ELITe Standard**, junto con el protocolo «**CMV ELITe_STD**» o «**CMV ELITe_STD_1000_100**».

Como control positivo de amplificación, utilizar el producto «**CMV - ELITe Positive Control**» junto con el protocolo «**CMV ELITe_PC**» o «**CMV ELITe_PC_1000_100**».

Como control negativo de amplificación, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro del kit) junto con el protocolo «**CMV ELITe_NC**» o «**CMV ELITe_NC_1000_100**».

Nota: El **ELITe BeGenius** con el **software ELITe BeGenius** permite generar la curva de calibración y validar los controles de amplificación para cada uno de los lotes de reactivos de amplificación que se va a guardar en la base de datos.

Las curvas de calibración, aprobadas y guardadas en la base de datos, caducan **después de 60 días**. Se necesita una fecha de caducidad para volver a procesar el conjunto de calibradores.

Los resultados del control de validación de la amplificación, aprobados y guardados en la base de datos, caducan **después de 15 días**. Se necesita una fecha de caducidad para volver a procesar los controles positivo y negativo.

Los calibradores y los controles de la amplificación deben volver a analizarse si se presenta una de las siguientes circunstancias:

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación.
- 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 el instrumento **ELITe BeGenius**.

Controles de calidad

Se deben realizar controles externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda. Ejemplos de controles externos disponibles comercialmente son los productos «**CMV Molecular Q Panel**» (ref. CMVMQP01 de Qnostics Ltd, Reino Unido) y «**AcroMetrix® CMV_{ic} Panel**» (Acrometrix, Life Technologies, EE. UU.).

ELITe BeGenius® PROCEDIMIENTO

El procedimiento para utilizar el producto «**CMV - ELITe MGB® Kit**» con el sistema **ELITe BeGenius** comprende tres pasos:

- Verificación de la disponibilidad del sistema
- Configuración de la sesión
- Evaluación y aprobación de los resultados

Verificación de la disponibilidad del sistema

Antes de iniciar la sesión de análisis de la muestra, es necesario realizar las siguientes tareas siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento:

- Encender el **ELITe BeGenius** y seleccionar el modo «**CLOSED**».
- Verificar que los calibradores («**CMV Q-PCR Standard**») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede comprobar en el menú «**Calibration**» de la página «**Home**».
- Verificar que los controles de amplificación (**CMV - Positive Control** y **CMV Negative Control**) se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede comprobar en el menú «**Control**» de la página «**Home**».

Elegir el tipo de sesión y configurarla, siguiendo las instrucciones de la interfaz proporcionadas a tal efecto y utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits **ELITe MGB**, las matrices correspondientes y el instrumento **ELITe BeGenius**.

Los protocolos de ensayo disponibles para el producto «**CMV ELITe MGB® Kit**» se describen en la tabla siguiente.

Protocolos de ensayo para el producto « CMV ELITe MGB® Kit » y el ELITe BeGenius			
Nombre	Matriz	Unidad de informe	Características
CMV ELITe_Be_WB_200_100	Sangre	copies/mL or IU / mL	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL
CMV ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copies/mL or IU / mL	Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL

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

Los protocolos para el análisis cualitativo están disponibles bajo petición.

Configuración de la sesión

El producto «**CMV ELITe MGB® Kit**» puede utilizarse en combinación con el **ELITe BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

- Sesión de la muestra (modo de procesamiento «**Extract + PCR**»).
- Sesión de amplificación (modo de procesamiento «**PCR Only**»).
- Sesión de calibración (modo de procesamiento «**PCR Only**»).

D. Sesión del Positive Control y del Negative Control (modo de procesamiento «PCR Only»).

Todos los parámetros necesarios para la sesión están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se abren automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

Nota: el sistema **ELiTe BeGenius** puede conectarse al servidor de información de ubicaciones (LIS, «Location Information Server»), que permite enviar la información de la sesión de trabajo. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

A continuación, se describen los pasos principales para configurar los cuatro tipos de sesión.

A. Sesión de la muestra

Para configurar la sesión integrada, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «CMV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de CPE para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las gradillas de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «Extract + PCR».
6. Cargar las muestras en el área de refrigeración comenzando a partir de la gradilla de muestras L5.
7. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

Nota: si se cargan probetas secundarias, marcar la probeta de 2 mL. Si las probetas secundarias no tienen códigos de barras, introducir manualmente el ID de las muestras.

8. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «CMV ELiTe_Be_PL_200_100»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Si es necesario realizar una segunda extracción, repetir los pasos del 6 al 9 utilizando la gradilla de muestras L4.
11. Cargar las probetas de eluido con códigos de barras en el área de refrigeración, comenzando a partir de la gradilla de elución L3.

Nota: las probetas de elución pueden etiquetarse para mejorar la rastreabilidad.

12. Insertar la gradilla de elución L3 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Repetir los pasos 11 y 12 utilizando la gradilla de reactivos/elución L2.
14. Cargar el CPE y la mezcla de «CMV Q-PCR Mix» en el área de refrigeración.
15. Insertar la gradilla de reactivos L1 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
16. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
17. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
18. Cargar la gradilla de extracción con los cartuchos de extracción «ELiTe InGenius SP 200» y los consumibles de extracción necesarios siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
19. Cerrar la puerta del instrumento.
20. Presionar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el instrumento **ELiTe BeGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda puede extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: al finalizar la sesión, el cartucho «PCR Cassette» que contiene los productos de reacción y demás consumibles debe extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas

de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

B. Sesión de amplificación

Para configurar la sesión de amplificación, llevar a cabo los pasos que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «CMV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
4. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
5. Cargar las muestras en el área de refrigeración comenzando a partir de la gradilla de elución L3.
6. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
7. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
8. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «CMV ELiTe_Be_PL_200_100»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar la mezcla «CMV Q-PCR Mix» en el área de refrigeración.
10. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Presionar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el instrumento **ELiTe BeGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda puede extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: al finalizar la sesión, el cartucho «PCR Cassette» que contiene los productos de reacción debe extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

C. Sesión de calibración

Para configurar la sesión de calibración, con los calibradores «Q-PCR Standard», llevar a cabo los pasos que se indican a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «CMV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar las probetas de calibrador «CMV Q-PCR Standard» (Cal1: CMV Q-PCR Standard 102, Cal2: CMV Q-PCR Standard 103, Cal3: CMV Q-PCR Standard 104, Cal4: CMV Q-PCR Standard 105). Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».

6. Cargar las probetas del calibrador en la gradilla de elución L3.
 7. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
 8. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
 9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «CMV ELITe_Be_STD»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
 10. Cargar la mezcla «CMV Q-PCR Mix» en la gradilla de reactivos/elución L2.
 11. Insertar la gradilla de reactivos/elución L2 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
 12. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
 13. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
 14. Cerrar la puerta del instrumento.
 15. Presionar «Start» para iniciar la sesión.
- Una vez finalizado el proceso, el instrumento ELITe BeGenius permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: al finalizar la sesión, los calibradores que quedan pueden extraerse del instrumento, así como taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar los calibradores «Q-PCR Standard».

Nota: al finalizar la sesión, el cartucho «PCR Cassette» que contiene los productos de reacción debe extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

D. Sesión del Positive Control y del Negative Control

Para configurar la sesión del Positive Control y del Negative Control, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «CMV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar el producto «CMV - ELITe Positive Control», para la amplificación del control positivo. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua de calidad para biología molecular (como Negative Control) para las sesiones en una probeta de elución incluida en el volumen de suministro del conjunto de consumibles «ELITe InGenius SP».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
6. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
7. Cargar las probetas Positive Control y de Negative Control en la gradilla de elución L3.
8. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
10. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «CMV ELITe_Be_PC» y «CMV ELITe_Be_NC»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar la mezcla «CMV Q-PCR Mix» en la gradilla de reactivos/elución L2.
12. Insertar la gradilla de reactivos/elución L2 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
14. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

15. Cerrar la puerta del instrumento.
 16. Presionar «Start» para iniciar la sesión.
- Una vez finalizado el proceso, el instrumento ELITe BeGenius permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: al finalizar la sesión, el Positive Control que queda puede extraerse del instrumento, así como taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar los controles positivos.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «PCR Cassette» que contienen los productos de reacción deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

Revisión y aprobación de los resultados

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», en la que se muestran los resultados de la muestra/del calibrador/del control y la información sobre la sesión. En esta pantalla, es posible aprobar el resultado, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»).

Nota: el sistema ELITe BeGenius puede conectarse al servidor de información de ubicaciones (LIS, «Location Information Server»), que permite enviar los resultados de la sesión de trabajo al centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El sistema ELITe BeGenius genera los resultados con el producto «CMV ELITe MGB Kit» mediante el siguiente procedimiento:

- A. Validación de la curva de calibración
- B. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación
- C. Validación de los resultados de la muestra
- D. Generación del informe de los resultados de la muestra.

Nota: consultar los mismos capítulos del ELITe InGenius para obtener más información.

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES ELITE InGenius y ELITe BeGenius

Sensibilidad analítica: límite de detección

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección (LoD) de la amplificación del ADN, permite detectar la presencia de unas 10 copias en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

El límite de detección de este ensayo se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a un título de 10 copias/20 µL en ADN genómico humano a un título de 500 ng/20 µL. Esta muestra se analizó en 12 duplicados realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. en dos instrumentos distintos.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	24	23	1

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con diferentes matrices y el ELITe InGenius se verificó con un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel comprendió al menos seis puntos en torno a la concentración límite. Cada muestra del panel se analizó en al menos 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, configuración de la sesión, extracción de ácidos nucleicos, amplificación en tiempo real e interpretación de los datos con el ELITe InGenius y productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

En las siguientes tablas se indican los resultados finales de cada matriz.

Límite de detección con el ELITE InGenius (UI/mL)				
Volumen de la muestra	Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
200 µL	Sangre	109 UI/mL	71 UI/mL	239 UI/mL
	Plasma	88 UI/mL	50 UI/mL	291 UI/mL
	Líquido cefalorraquídeo	58 UI/mL	48 UI/mL	82 UI/mL
	orina	151 UI/mL	119 UI/mL	214 UI/mL
	Exudado bucal	44 UI/mL	36 UI/mL	57 UI/mL
	Líquido amniótico	57 UI/mL	46 UI/mL	78 UI/mL
1000 µL	Plasma	17 UI/mL	14 UI/mL	22 UI/mL

La sensibilidad analítica expresada en gEq/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 25.

La sensibilidad analítica expresada en gEq/mL se indica a continuación.

Límite de detección con el ELITE InGenius (gEq/mL)				
Volumen de la muestra	Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
200 µL	Sangre	156 gEq/mL	99 gEq/mL	332 gEq/mL
	Plasma	293 gEq/mL	167 gEq/mL	970 gEq/mL
	Líquido cefalorraquídeo	193 gEq/mL	160 gEq/mL	273 gEq/mL
	orina	216 gEq/mL	170 gEq/mL	306 gEq/mL
	Exudado bucal	220 gEq/mL	180 gEq/mL	285 gEq/mL
	Líquido amniótico	285 gEq/mL	230 gEq/mL	390 gEq/mL
1000 µL	Plasma	57 gEq/mL	47 gEq/mL	73 gEq/mL

El valor del LoD calculado para matrices de **sangre y plasma** (volumen de muestra de 200 µL) y los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se verificó analizando 20 duplicados de sangre recogida en EDTA y 20 duplicados de muestras de plasma recogido en EDTA enriquecidas con material de referencia de CMV (Primer estándar internacional de la OMS, NIBSC) a la concentración declarada. El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo según la directiva EP17-A del CLSI.

Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de sangre y plasma y el ELITE InGenius					
Muestra	Título	Diana	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA	109 UI/mL	CMV	20	20	0
Plasma recogido en EDTA	88 UI/mL	CMV	20	20	0

Límite de detección para muestras de sangre y plasma y el ELITE BeGenius					
Muestra	Título	Diana	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA	109 UI/mL	CMV	20	20	0
Plasma recogido en EDTA	88 UI/mL	CMV	20	19	1

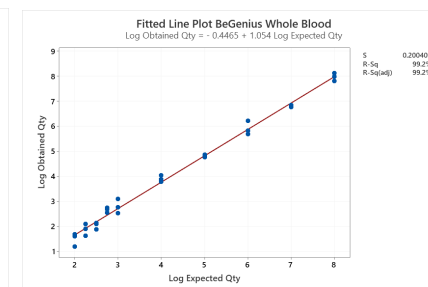
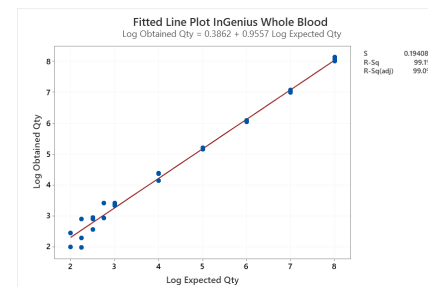
El valor del LoD para la diana de CMV se confirmó en 109 UI/mL en el caso de muestras de sangre recogida en EDTA y a 88 UI/mL en el caso de muestras de plasma recogido en EDTA.

Rango de medición lineal

Sangre:

El rango de medición lineal del producto «CMV ELITE MGB® Kit» cuando se utilizó con sangre y los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se evaluó utilizando un panel preparando mediante la dilución de un material de referencia de CMV (Notovir Italy) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel constaba de ocho puntos de dilución de 10⁸ a 10²UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de sangre, presenta una respuesta lineal para todas los niveles de dilución con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,991 para el instrumento ELITE InGenius y de 0,992 para el instrumento ELITE BeGenius.



El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en la concentración que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2702 log UI/mL para el ELITE InGenius y de 0,1925 log UI/mL para el ELITE BeGenius) y exacta (sesgo de 0,3453 log UI/mL para el ELITE InGenius y de -0,1462 log UI/mL para el ELITE BeGenius): 178 UI/mL

El límite superior de cuantificación (ULoQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0597 log UI/mL para el ELITE InGenius y de 0,1590 log UI/mL para el ELITE BeGenius) y exacta (sesgo de -0,0683 log UI/mL para el ELITE InGenius y de 0,0249 log UI/mL para el ELITE BeGenius): 100.000.000 UI/mL

El rango de medición lineal para sangre recogida en EDTA, expresado como copias/mL, se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 27.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de sangre y los instrumentos ELITE InGenius y ELITE BeGenius		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	178	100.000.000
gEq/mL	254	142.857.143

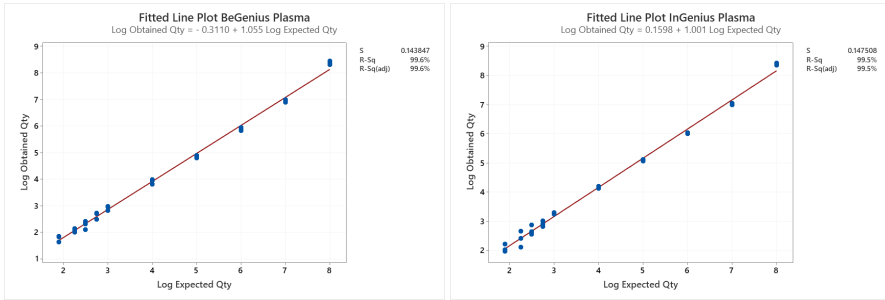
Plasma (volumen de muestra 200 µL):

El rango de medición lineal del producto «CMV ELITE MGB® Kit» cuando se utilizó con plasma y los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se evaluó utilizando un panel preparando mediante la dilución de un material de referencia de CMV (Notovir Italy) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel constaba de ocho puntos de dilución de 10⁸ a 10²UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de plasma, presenta una respuesta lineal para todas los niveles de dilución con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,995 para el instrumento ELITE InGenius y de 0,996 para el instrumento ELITE BeGenius.

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD



El límite inferior de cuantificación (LLOq) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2701 log UI/mL para el ELITe InGenius y de 0,2114 log UI/mL para el ELITe BeGenius) y exacta (sesgo de 0,3314 log UI/mL para el ELITe InGenius y de -0,0619 log UI/mL para el ELITe BeGenius): 88 UI/mL.

El límite superior de cuantificación (ULOq) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0351 log UI/mL para el ELITe InGenius y de 0,0675 log UI/mL para el ELITe BeGenius) y exacta (sesgo de -0,3988 log UI/mL para el ELITe InGenius y de -0,3865 log UI/mL para el ELITe BeGenius): 100.000.000 UI/mL.

El rango de medición lineal para plasma recogido en EDTA, expresado como copias/mL, se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 30.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de plasma y los instrumentos ELITe InGenius y ELITe BeGenius		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	88	100.000.000
gEq/mL	293	333.333.334

Otras matrices

La linealidad de este ensayo cuando se utilizó con el ELITe InGenius se verificó con un panel de diluciones de CMV en las siguientes matrices diferentes: plasma (volumen de muestra 1000 µL), líquido cefalorraquídeo, hisopado bucal, líquido amniótico y LB/AB.

La linealidad en "PCR Only" de este ensayo se determinó utilizando un panel de diluciones (1 log₁₀ de pasos de dilución) de un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación, cuya concentración inicial se midió con un espectrofotómetro. Las diluciones de 2x10⁶ equivalentes genómicos por reacción a 2x10¹ equivalentes genómicos por reacción se analizaron en 5 duplicados, realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo presenta una respuesta lineal para todas las diluciones (coeficiente de correlación cuadrática superior a 0,99).

La linealidad en "Extract+PCR" de este ensayo utilizado con diferentes matrices y el ELITe InGenius se verificó con un panel de diluciones de CMV. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel constaba de cinco puntos de dilución (1 log₁₀ de pasos de dilución) de 10⁶ UI/mL a 10² UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en al menos 3 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, configuración de la sesión, extracción de ácidos nucleicos, amplificación en tiempo real e interpretación de los datos con el ELITe InGenius y productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal para todas las diluciones.

El límite inferior del rango de medición lineal se configuró a la concentración más baja que da un 100 % de posibilidades de positividad y resultados cuantitativos suficientemente exactos y precisos. El límite superior del rango de medición lineal se estableció a la concentración más alta que da resultados cuantitativos suficientemente exactos y precisos.

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

El rango de medición lineal expresado en gEq/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 25.

En las siguientes tablas se indican los resultados de cada matriz.

Rango de medición lineal para muestras de plasma y el ELITe InGenius			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
1000 µL	UI/mL	178	1.500.000
	gEq/mL	593	5.000.000

Rango de medición lineal para muestras de líquido cefalorraquídeo y el ELITe InGenius			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
200 µL	UI/mL	101	15.000.000

Rango de medición lineal para muestras de orina y el ELITe InGenius			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
200 µL	UI/mL	316	35.000.000
	gEq/mL	451	50.000.000

Rango de medición lineal para muestras de exudados bucales y el ELITe InGenius			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
200 µL	UI/mL	100	10.000.000
	gEq/mL	500	50.000.000

Rango de medición lineal para muestras de líquido amniótico y el ELITe InGenius			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
200 µL	UI/mL	100	10.000.000
	gEq/mL	500	50.000.000

Rango de medición lineal para muestras de LBA/AB y el ELITe InGenius			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
200 µL	UI/mL	178	10.000.000
	gEq/mL	890	50.000.000

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto «CMV ELITe MGB Kit» en combinación con los instrumentos ELITe InGenius y ELITe BeGenius se evaluó analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de CMV, a saber, el «Primer estándar internacional de la OMS para ADN de CMV» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 327 UI/mL) y de 10 veces el LoD (aproximadamente 1090 UI/mL).

La repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe InGenius se obtuvo analizando muestras del panel en ocho duplicados, en dos sesiones al día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento, con el mismo operador y en el mismo día. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

La repetibilidad entre sesiones con el ELITe InGenius se obtuvo analizando muestras del panel en ocho duplicados, en dos sesiones al día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento, con el mismo operador y en dos días distintos. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

Los valores de Ct de la diana y del Internal Control se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión.

En las tablas siguientes se muestra un resumen de los resultados.

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE InGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	24,18	0,17	0,69
3xLoD	8/8	35,91	0,51	1,42				
10xLoD	8/8	33,98	0,29	0,86				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITE InGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	48/48	24,20	0,22	0,90
3xLoD	16/16	36,09	0,78	2,15				
10xLoD	16/16	34,07	0,25	0,75				

En la prueba de repetibilidad con el **ELITE InGenius**, el ensayo detectó la diana de CMV tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 2,2 % en el caso del CMV ni el 0,9 % en el caso del Internal Control.

La repetibilidad dentro de las sesiones con el **ELITE BeGenius** se obtuvo analizando muestras del panel en ocho duplicados, en una sesión al día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento y en el mismo día. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

La repetibilidad entre sesiones con el **ELITE BeGenius** se obtuvo analizando muestras del panel en ocho duplicados, en una sesión al día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento y en dos días distintos. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

Los valores de Ct de la diana y del Internal Control se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión. En las tablas siguientes se muestra un resumen de los resultados.

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE BeGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	27,21	0,38	1,39
3xLoD	8/8	37,21	0,49	1,33				
10xLoD	8/8	35,03	0,52	1,48				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITE BeGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	48/48	27,18	0,37	1,38
3xLoD	16/16	37,51	0,61	1,63				
10xLoD	16/16	35,06	0,44	1,25				

En la prueba de repetibilidad con el **ELITE BeGenius**, el ensayo detectó la diana de CMV tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 1,6 % en el caso del CMV ni el 1,4 % en el caso del Internal Control.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto «CMV ELITE MGB Kit» en combinación con los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se evaluó analizando un panel de muestras de sangre. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de CMV, a saber, el «Primer estándar internacional de la OMS para ADN de CMV» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 327 UI/mL) y de 10 veces el LoD (aproximadamente 1090 UI/mL).

La reproducibilidad entre instrumentos con el **ELITE InGenius** se obtuvo analizando las muestras del panel en ocho duplicados, en una sesión al día, en dos días, utilizando el mismo lote y dos instrumentos diferentes con dos operadores distintos. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias con el sistema **ELITE InGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

La reproducibilidad entre lotes con el **ELITE InGenius** se obtuvo analizando las muestras del panel en ocho duplicados, en dos sesiones al día, utilizando dos lotes diferentes y el mismo instrumento con el mismo operador. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias con el sistema **ELITE InGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los valores de Ct de la diana y del Internal Control se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITE InGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	25,31	0,71	2,82
3xLoD	8/8	35,96	0,81	2,26				
10xLoD	8/8	33,62	0,36	1,07				

Reproducibilidad entre lotes con el ELITE InGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	25,20	0,65	2,59
3xLoD	8/8	35,97	0,65	1,82				
10xLoD	8/8	33,72	0,29	0,86				

En la prueba de reproducibilidad con el **ELITE InGenius**, el ensayo detectó la diana de CMV tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 2,3 % en el caso del CMV ni el 2,8 % en el caso del Internal Control.

La reproducibilidad entre instrumentos con el **ELITE BeGenius** se obtuvo analizando muestras del panel en ocho duplicados, en una sesión al día, en dos días, con dos instrumentos diferentes con dos operadores distintos. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias con el sistema **ELITE BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

La reproducibilidad entre lotes con el **ELITE BeGenius** se obtuvo analizando muestras del panel en ocho duplicados, en dos sesiones al día, con dos lotes diferentes y el mismo instrumento. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias con el sistema **ELITE BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los valores de Ct de la diana y del Internal Control se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión.

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados.

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITE BeGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	28,29	0,48	1,69
3xLoD	8/8	36,06	0,46	1,27				
10xLoD	8/8	34,12	0,23	0,66				

Reproducibilidad entre lotes con el ELITE BeGenius								
Muestra	CMV				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	28,30	0,47	1,65
3xLoD	8/8	36,19	0,51	1,41				
10xLoD	8/8	34,22	0,12	0,36				

En la prueba de reproducibilidad con el **ELITE BeGenius**, el ensayo detectó la diana de CMV tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 1,4 % en el caso del VBK ni el 1,7 % en el caso del Internal Control.

Reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «CMV Molecular "Q" Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

interpretación de los resultados con el sistema **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.
Los resultados, obtenidos a partir de 200 µL de muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius®				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log UI/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados log UI/mL
CMVMQP01-Alta	10 ⁵	5,000	2/2	5,024
CMVMQP01-Media	10 ⁴	4,000	2/2	3,996
CMVMQP01-Baja	10 ³	3,000	2/2	3,060
CMVMQP01-Negativa	negativas	-	0/2	-

Todas las muestras positivas se detectaron como positivas con un título que estaba dentro del valor esperado de ±0,5 log.

Los resultados, obtenidos a partir de 1000 µL de muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius®				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log UI/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados log UI/mL
CMVMQP01-Alta	10 ⁵	5,000	2/2	4,679
CMVMQP01-Media	10 ⁴	4,000	2/2	3,717
CMVMQP01-Baja	10 ³	3,000	2/2	2,733
CMVMQP01-Negativa	negativas	-	0/2	-

Todas las muestras positivas se detectaron como positivas con un título que estaba dentro del valor esperado de ±0,5 log.

Se realizaron análisis adicionales utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2014 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el **ELITE InGenius** y el plasma y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius				
Muestra	Consenso log UI/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados log UI/mL
CMVDNA14-01	2,468	0,343	2/2	2,256
CMVDNA14-02	3,034	0,281	2/2	2,915
CMVDNA14-03	3,383	0,368	2/2	3,185
CMVDNA14-04	3,014	0,251	2/2	2,976
CMVDNA14-05	1,859	0,462	2/2	1,706
CMVDNA14-06	2,767	0,325	2/2	2,526
CMVDNA14-07	4,030	0,280	2/2	3,924
CMVDNA14-08	Negativa	-	0/2	-
CMVDNA14-09	2,065	0,512	2/2	1,273
CMVDNA14-10	3,947	0,278	2/2	3,946

Todas las muestras se detectaron correctamente. Ocho (8) de nueve muestras positivas se cuantificaron dentro del rango definido por el consenso EQA ± 1 desviación estándar (DE) y una muestra (CMVDNA14-09) se cuantificó dentro de 2 DE. Esto se explica por el hecho de que el título de la muestra está por debajo del límite inferior de cuantificación.

Se realizaron análisis adicionales utilizando como material de referencia el panel calibrado «AcroMatrix® CMV_{IC} Panel» (Acrometrix, Life Technologies, EE. UU.). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el **ELITE InGenius** y el plasma y se muestran en la siguiente tabla.

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius®				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log UI/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados log UI/mL
ADN de CMV 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,386
ADN de CMV 3E5	300.000	5,477	2/2	5,444
ADN de CMV 3E4	30.000	4,477	2/2	4,473
ADN de CMV 3E3	3.000	3,477	2/2	3,441
ADN de CMV 3E2	300	2,477	2/2	2,575

Todas las muestras se detectaron como positivas, con un título que estaba dentro del valor esperado de ±0,5 log.

Se realizaron análisis adicionales, a partir de 1000 µL de muestra, utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2017 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el **ELITE InGenius** y el plasma y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius			
Muestra	Consenso log UI/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados log UI/mL
CMVDNA17S-01	2,431	2/2	2,362
CMVDNA17S-02	3,762	2/2	3,665
CMVDNA17S-03	3,920	2/2	3,822
CMVDNA17S-04	2,847	2/2	2,671
CMVDNA17S-05	2,572	2/2	2,189
CMVDNA17S-06	2,849	2/2	2,658
CMVDNA17S-07	3,902	2/2	3,785
CMVDNA17S-08	3,746	2/2	3,667
CMVDNA17S-09	Negativa	0/2	-
CMVDNA17S-10	3,900	2/2	3,707

Todas las muestras se detectaron correctamente. Las muestras positivas se notificaron con un título que estaba dentro del valor esperado de ±0,5 log.

Factor de conversión a unidades internacionales

El factor de conversión, para convertir un resultado cuantitativo de gEq/mL a unidades internacionales/mL, se calculó utilizando un panel de al menos tres diluciones (1 log₁₀ entre diluciones) de material de referencia calibrado por la OMS («Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano», código NIBSC 09/162, Reino Unido) en diferentes matrices con un resultado negativo para ADN de CMV.

Cada punto del panel se analizó en al menos 10 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de cada matriz.

Factor de conversión a unidades internacionales con el ELITE InGenius		
Volumen de la muestra	Matriz	Fc (UI/gEq)
200 µL	Sangre	0,7
	Plasma	0,3
	Líquido cefalorraquídeo	0,3
	Orina	0,7
	Exudado bucal	0,2

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

	Líquido amniótico	0,2
	LBA/AB	0,2
1000 µL	Plasma	0,3

El factor de conversión del producto «CMV ELITE MGB® Kit» cuando se utiliza con muestras de **sangre** recogida en EDTA y los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se verificó con un panel de diluciones de CMV. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel constaba de siete puntos de dilución de aproximadamente 10⁶ UI/mL a 10^{2.5} UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

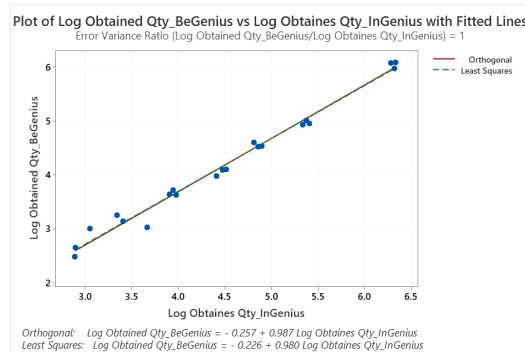
La precisión de cuantificación de la diana, expresada como desviación estándar de log UI/mL, fue inferior a 0,5 log tanto en los análisis realizados con el **ELITE InGenius** como en los realizados con el **ELITE BeGenius**.

La exactitud de cuantificación de la diana, expresada como diferencia entre las concentraciones teóricas y medidas en log UI/mL, fue inferior a 0,5 log tanto en los análisis realizados con el **ELITE InGenius** como los realizados con el **ELITE BeGenius**.

Estos resultados confirmaron los factores de conversión calculados para muestras de sangre utilizando el **ELITE InGenius**.

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 siguiente figura.



El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de -0,257 (IC del 95 %: -0,503; -0,011) y una pendiente de 0,987 (IC del 95 %: 0,934; 1,040). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,986.

El factor de conversión del producto «CMV ELITE MGB® Kit» cuando se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se verificó con un panel de diluciones de CMV. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel constaba de ocho puntos de dilución de aproximadamente 10⁶ UI/mL a 10² UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

La precisión de cuantificación de la diana, expresada como desviación estándar de log UI/mL, fue inferior a 0,5 log tanto en los análisis realizados con el **ELITE InGenius** como en los realizados con el **ELITE BeGenius**.

La exactitud de cuantificación de la diana, expresada como diferencia entre las concentraciones teóricas y medidas en log UI/mL, fue inferior a 0,5 log tanto en los análisis realizados con el **ELITE InGenius** como los realizados con el **ELITE BeGenius**.

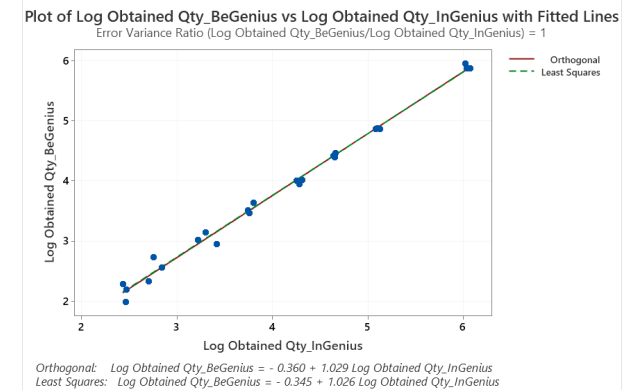
Estos resultados confirmaron los factores de conversión calculados para muestras de sangre utilizando el **ELITE InGenius**.

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

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 siguiente figura.



En este análisis, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente de 1,029 (IC del 95 %: 0,993 a 1,065) y una intersección de -0,360 (IC del 95 %: -0,510 a -0,209). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,993.

Robustez: ausencia de contaminación cruzada

La robustez del ensayo, como ausencia de contaminación cruzada, se verificó analizando los resultados de cinco sesiones en las que las muestras negativas para ADN de CMV se alternaron con muestras enriquecidas con ADN de CMV. Ninguna de las muestras negativas para ADN de CMV dio un resultado positivo.

La ausencia de contaminación cruzada se verificó utilizando una muestra de sangre negativa para ADN de CMV enriquecida con material de referencia aprobado por la OMS («Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano», código NIBSC 09/162, Reino Unido) a una carga vírica de 10.000 UI/mL, así como una muestra de sangre negativa para ADN de CMV. Se analizaron cinco series de 12 muestras, alternando una muestra enriquecida con una muestra negativa, y realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA y enriquecida con ADN de CMV	30	30	0
Sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de CMV	30	0	30

Robustez: tasa total de fallos del sistema

La robustez del ensayo, como la tasa total de fallos del sistema que producía resultados falsos negativos, se verificó analizando un panel de muestras de ADN de CMV enriquecidas a un bajo título y fue inferior al 1,7 %.

La tasa total de fallos del sistema se verificó utilizando muestras de sangre negativas para ADN de CMV enriquecidas con material de referencia calibrado y certificado CMVDNA12-01 del producto «QCMD 2012 Human Cytomegalovirus EQA Panel» (Qnostics, Reino Unido), a una carga vírica de 750 UI/mL. Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA y enriquecida con ADN de CMV	60	59	1

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

Para sangre y plasma (volumen de muestra de 200 µL):

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas positivas para ADN de CMV utilizando el **ELITE InGenius**. Como el **ELITE BeGenius** presentó rendimientos analíticos equivalentes al **ELITE InGenius**, puede suponerse que los resultados de sensibilidad diagnóstica obtenidos con el instrumento **ELITE InGenius** son aplicables también al instrumento **ELITE BeGenius**.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas positivas para ADN de CMV.

El análisis, que comenzó a partir de 200 µL de muestra, se realizó en:

- 60 muestras de sangre recogidas en EDTA que eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).
- 54 muestras de plasma que se recogieron de pacientes en EDTA y eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).

Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A..

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Volumen de la muestra	Muestras	N	positivas	negativas
200 µL	Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de CMV	60	60	0
	Plasma recogido en EDTA y positivo para ADN de CMV	54	54	0

Otras matrices

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de muestras clínicas positivas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas positivas para el ADN del CMV en asociación con **ELITE InGenius** y las siguientes matrices: plasma (volumen de muestra 1000 µL), líquido cefalorraquídeo, orina, hisopo bucal, líquido amniótico, BAL / BA.

La prueba, a partir de 200 µL de muestra, se realizó en:

- 20 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de CMV, que se enriquecieron para ADN de CMV añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido).
- 31 muestras de orina de pacientes que eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).
- 50 muestras de exudados bucales negativas para ADN de CMV, que se enriquecieron para ADN de CMV añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido).
- 11 muestras de líquido amniótico de pacientes que eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real) y en 20 muestras de líquido amniótico negativas para ADN de CMV, que se enriquecieron para ADN de CMV añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido).
- 49 muestras de LBA/AB de pacientes que eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).

El análisis, que comenzó con 1000 µL de muestra, se realizó en 60 muestras de plasma que se recogieron de pacientes en EDTA y eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).

Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación,

detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A..

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Volumen de la muestra	Muestras	N	positivas	negativas
200 µL	LCR enriquecido para ADN de CMV	20	20	0
	Orina positiva para ADN de CMV	31	31	0
	Exudado bucal enriquecido para ADN de CMV	50	50	0
	Líquido amniótico positivo o enriquecido para ADN de CMV	31	31	0
	LBA/AB positivo para ADN de CMV	49	49	0
1000 µL	Plasma recogido en EDTA y positivo para ADN de CMV	60	58	2

Todas las muestras, analizadas a partir de 200 µL de muestra, fueron válidas para el análisis y se confirmaron como positivas. En estos análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

Todas las muestras, analizadas a partir de 1000 µL de muestra, fueron válidas para el análisis; 58 de 60 muestras de plasma se confirmaron como positivas, mientras que dos muestras presentaron un resultado negativo, diferente del resto.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 96.6 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

Para sangre y plasma (volumen de muestra de 200 µL):

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras negativas, se evaluó analizando muestras clínicas negativas para ADN de CMV, utilizando para ello el **ELITE InGenius**. Como el **ELITE BeGenius** presentó rendimientos analíticos equivalentes al **ELITE InGenius**, puede suponerse que los resultados de especificidad diagnóstica obtenidos con el instrumento **ELITE InGenius** son aplicables también al instrumento **ELITE BeGenius**.

El análisis, que comenzó a partir de 200 µL de muestra, se realizó en:

- 59 muestras de sangre recogidas en EDTA que eran negativas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).
- 58 muestras de plasma recogidas en EDTA que eran negativas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).

Volumen de la muestra	Muestras	N	positivas	negativas
200 µL	Sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de CMV	59	4	55
	Plasma recogido en EDTA y negativo para ADN de CMV	58	1	57

Todas las muestras, analizadas a partir de 200 µL de muestra, fueron válidas para el análisis.

55 de 59 muestras de sangre se confirmaron como negativas para ADN de CMV, mientras que cuatro muestras presentaron un resultado positivo a bajo título, diferente del resto. Este resultado puede explicarse por el hecho de que el límite de detección del método de referencia es más alto que el límite de detección del producto que se evaluó.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo asociada a la sangre fue del 93,2 %.

57 de 58 muestras de plasma se confirmaron como negativas para ADN de CMV, mientras que una muestra presentó un resultado positivo a bajo título, diferente del resto.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo asociada al plasma fue del 98,3 %.

Otras matrices

La especificidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de muestras negativas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas negativas para el ADN del CMV en asociación con **ELITE InGenius** y las siguientes matrices: plasma (volumen de muestra 1000 µL), líquido cefalorraquídeo, orina, hisopo bucal, líquido amniótico, BAL / BA.

La prueba, a partir de 200 µL de muestra, se realizó en:

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

- 7 muestras de LCR que eran negativas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real) y 3 muestras de LCR que eran supuestamente negativas para ADN de CMV.
- 8 muestras de orina que eran negativas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real) y 46 muestras de orina supuestamente negativas para ADN de CMV.
- 52 muestras de exudados bucales que eran supuestamente negativas para ADN de CMV.
- 10 muestras de líquido amniótico que eran negativas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real) y 22 muestras de líquido amniótico que eran supuestamente negativas para ADN de CMV.
- 49 muestras de LBA/AB que eran negativas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).

El análisis, que comenzó con 1000 µL de muestra, se realizó en 62 muestras de plasma que se recogieron de pacientes en EDTA y eran supuestamente negativas para ADN de CMV.

Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Volumen de la muestra	Muestras	N	positivas	negativas
200 µL	LCR negativo o supuestamente negativo para ADN de CMV	20	0	20
	Orina negativa o supuestamente negativa para ADN de CMV	54	0	54
	Exudado bucal supuestamente negativo para ADN de CMV	52	2	50
	Líquido amniótico negativo o supuestamente negativo para ADN de CMV	32	0	32
	LBA/AB negativo para ADN de CMV	49	0	49
1000 µL	Plasma recogido en EDTA y supuestamente negativo para ADN de CMV	57	3	54

Todas las muestras, analizadas a partir de 200 µL de volumen, fueron válidas para el análisis. El valor del Control Interno fue inferior al del punto de corte del CI, que está fijado en 35 para todas las matrices.

50 de 52 muestras de exudados bucales se confirmaron como negativas para ADN de CMV, mientras que dos muestras presentaron un resultado positivo a bajo título, diferente del resto.

La especificidad diagnóstica del ensayo asociada al exudado bucal fue del 96 %.

Todas las muestras de líquido amniótico, LCR y LBA/AB se confirmaron como negativas para ADN de CMV.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo asociada a la sangre fue del 100 %.

Todas las muestras, analizadas a partir de 1000 µL, fueron válidas para el análisis.

54 de 57 se confirmaron como negativas para ADN de CMV, mientras que tres (3) muestras presentaron un resultado positivo a bajo título, diferente del resto. En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 94,7 %.

La especificidad diagnóstica total del ensayo fue del 97,4 %.

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time System

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe ser utilizado con **ADN extraído** de las siguientes muestras clínicas:

Sangre entera recolectada con EDTA

Las muestras de sangre entera destinadas a la extracción de los ácido nucleicos deben ser recolectadas con EDTA según las indicaciones del laboratorio, transportadas a +2° / +8 °C y conservadas a +2° / +8 °C por un máximo de tres días, de lo contrario deben ser congeladas y conservadas a -20 °C por un máximo de treinta días o bien a -70°C por tiempos más prolongados. Se aconseja subdividir en diferentes alícuotas las muestras que deben conservarse congeladas para no someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación. Cuando se utilizan muestras congeladas, para evitar la posible degradación de los ácidos nucleicos descongelarlas inmediatamente antes de la extracción.

Nota: cuando se realiza la extracción del ADN de sangre entera (muestra celular) con el kit «**EXTRABlood**» se deben respetar las indicaciones del Manual de instrucciones de uso: partir con **200 µL** de muestra, agregar **5µL** de **CPE** para el control interno al iniciar la extracción, recuperar el ADN con **100 µL** de tampón de elución.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de sangre entera usando **ELITE STAR System**, con **versión de software 3.4.13** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción "**UUNI_E100_S200_ELI**", que emplea 200 µL de muestra y eluye el producto de la extracción en 100 µL (la elución se realiza en 115 µL efectivos, de los cuales se recuperan 100 µL). Las muestras en las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITE STAR**». Es necesario siempre un volumen mínimo de 600 µL para cada muestra según la clase de tubo utilizado. Agregar **200 µL** de **CPE** en los tubos de Proteinase-Carrier, como se indica en el manual del kit de extracción. Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de sangre entera usando **ELITE GALAXY System**, con **versión de software 1.3.1** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción **xNA Extraction (Universal)**, que emplea 300 µL de muestra y eluye el producto de la extracción en 200 µL (la elución se realiza en 210 µL efectivos, de los cuales se recuperan 200 µL). Las muestras en las probetas primarias pueden cargarse directamente en «**ELITE GALAXY**». Es necesario siempre para cada muestra un volumen mínimo de 400-650 µL según la clase de tubo utilizado. Agregar **10 µL / muestra** de **CPE**. (Al CPE debe agregarse el **IC + Carrier solution**, como se indica en el manual del kit de extracción). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: Cuando se ejecuta la extracción del ADN de muestras de sangre entera con el equipo «**NucliSENS® easyMAG®**», utilizar el protocolo de extracción **Generic 2.0.1** y respetar las siguientes indicaciones: distribuir **100 µL** de la muestra en la Strip de 8 pocillos; cargar la Strip en el equipo e iniciar la extracción sin incubación para la lisis; después que el equipo ha agregado el **EasyMAG® Lysis Buffer**, mezclar (directamente en el equipo) tres veces el contenido de la Strip con la pipeta multicanal suministrada usando el programa 3; dejar en incubación por 10 minutos y luego agregar la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** al contenido de la Strip con la pipeta multicanal usando el programa 3, continuar con la extracción y recuperar el ADN con **50 µL** de tampón de elución.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de sangre entera usando el instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» y el kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**», con **versión de software 3.5**, utilizar el protocolo de extracción "**Virus Blood_200_V4_default IC**" y seguir estas indicaciones: el instrumento tiene la capacidad de utilizar directamente el tubo primario, el volumen de muestra retirado para la extracción es de **200 µL**, se requiere siempre un volumen muerto mínimo de 100 µL. Cargar en el equipo, en la posición prevista para las probetas "control interno" las probetas que contienen buffer ATE, como se indica en el Manual de instrucciones de uso del kit; indicar la posición en la cual se distribuirán los eluatos y especificar el volumen de elución de **60 µL** (la elución se realiza en 90 µL efectivos, de los cuales se recuperan 60 µL). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Plasma extraído con EDTA

Las muestras de plasma destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas con EDTA según las indicaciones del laboratorio, transportadas a +2° / +8 °C y conservadas a +2° / +8 °C por un máximo de tres días, de lo contrario deben ser congeladas y conservadas a -20 °C por un máximo de treinta días o bien a -70 °C por tiempos más prolongados.

Se aconseja subdividir en varias alícuotas las muestras que se deben conservar congeladas, para no someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación.

Cuando se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar la posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de plasma usando **ELITE STAR System**, con **versión de software 3.4.13** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción "**UUNI_E100_S200_ELI**", que emplea 200 µL de muestra y eluye el producto de la extracción en 100 µL (la elución se realiza en 115 µL efectivos, de los cuales se recuperan 100 µL). Las muestras en las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITE STAR**». Es necesario siempre un volumen mínimo de 600 µL para cada muestra según la clase de tubo utilizado. Agregar **200 µL de CPE** en los tubos de Proteinase-Carrier, como se indica en el manual del kit de extracción. Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de plasma usando **ELITE GALAXY System**, con **versión de software 1.3.1** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción **xNA Extraction (Universal)**, que emplea 300 µL de muestra y eluye el producto de la extracción en 200 µL (la elución se realiza en 210 µL efectivos, de los cuales se recuperan 200 µL). Las muestras en las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITE GALAXY**». Para cada muestra es necesario siempre un volumen mínimo de 400-650 µL según la clase de tubo utilizado. Agregar **10 µL / muestra de CPE**. (Al CPE debe agregarse el **IC + Carrier solution**, como se indica en el manual del kit de extracción). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Nota: cuando se realiza la extracción de ADN de muestras de plasma usando el instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» y el kit «**QIASymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**», con **versión de software 3.5**, utilizar el protocolo de extracción "**Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC**" y seguir estas indicaciones: el instrumento tiene la capacidad de utilizar directamente el tubo primario, el volumen de muestra retirado para la extracción es de **500 µL**, siempre se requiere un volumen muerto mínimo de 100 µL. Preparar la solución que contiene el buffer AVE y el carrier ARN según las instrucciones del Manual de uso del kit de extracción. Agregar a la solución **6 µL de CPE** para cada muestra requerida. Cargar en el instrumento, en la posición prevista para las probetas "control interno", las probetas que contienen la solución, como se indica en el Manual de instrucciones de uso del kit; indicar la posición en la cual se distribuirán los eluatos y especificar el volumen de elución de **85 µL** (la elución se realiza en 115 µL efectivos, de los cuales se recuperan 85 µL). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir atentamente las indicaciones del Manual de instrucciones de uso del kit.

Líquido cefalorraquídeo

Las muestras de líquido cefalorraquídeo destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas según las indicaciones del laboratorio evitando la contaminación con la sangre del paciente, transportadas a +2°/+8 °C y conservadas a +2°/+8 °C por un máximo de cuatro horas, de lo contrario deben congelarse y conservarse a -20 °C por un máximo de treinta días o bien a -70°C por tiempos más prolongados.

Se aconseja dividir en diferentes alícuotas las muestras para conservarlas congeladas y no someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación.

Nota: Cuando se ejecuta la extracción del ADN a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo con el equipo «**NucliSENS® easyMAG®**» utilizar el protocolo de extracción **Generic 2.0.1** y respetar las siguientes indicaciones: distribuir **500 µL** de la muestra en la Strip de 8 pocillos; cargar la Strip en el equipo e iniciar la extracción. Después de los 10 minutos de incubación agregar **5 µL de CPE** para el control interno antes de agregar la **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** al contenido de la Strip con la pipeta multicanal usando el programa 3; continuar con la extracción y recuperar el ADN con **100 µL** de tampón de elución.

Orina

Las muestras de orina destinadas a la extracción de ácidos nucleicos deben ser recolectadas en recipientes sin conservantes según las indicaciones del laboratorio, transportadas a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) y conservadas a temperatura ambiente (+18 / +25 °C) por un máximo de cuatro horas, de lo contrario, deben conservarse a +2 / +8 °C por un máximo de tres días. Si es posible, evitar congelar las muestras de orina de primer chorro. La congelación puede ocasionar la precipitación de inhibidores y la pérdida de título del ADN.

En caso de congelación, se aconseja subdividir en diferentes alícuotas las muestras para no someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación y conservarlas a temperatura inferior a -20°C por un máximo de treinta días o bien a -70°C por tiempos más prolongados.

Nota: Cuando se lleva a cabo la extracción del ADN a partir de muestras de orina con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», utilizar el protocolo de extracción **Generic 2.0.1** seguir estas indicaciones: distribuir **500 µL** de muestra en la Strip de 8 pocillos, cargar la Strip en el instrumento y comenzar con la extracción; al concluir los 10 minutos de incubación, agregar **5 µL de CPE** para el control interno antes de agregar el **NucliSENS® EasyMAG® Magnetic Silica** al contenido de la Strip con la pipeta multicanal y el programa 3; continuar con la extracción y recuperar el ADN con **100 µL** de tampón de elución.

Sustancias interferentes

El ADN extraído de la muestra de partida no debe contener heparina, hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol o 2-propanol para evitar fenómenos de inhibición y la aparición de frecuentes resultados no válidos.

Cantidades elevadas de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra pueden inhibir la reacción de amplificación.

No son disponibles datos referidos a eventuales fenómenos de inhibición por parte de fármacos antibióticos, antivirales, quimioterápicos o inmunosupresores.

Controles de amplificación

Es absolutamente necesario convalidar cada una de las sesiones de amplificación preparando una reacción de control negativo y una reacción de control positivo.

Para el control negativo utilizar agua bidestilada estéril (no provista en el producto).

Para el control positivo utilizar los componentes **CMV Q-PCR Standard. Controles de calidad**

Se aconseja confirmar todo el procedimiento de análisis de cada una de las sesiones, extracción y amplificación, utilizando una muestra negativa y una muestra positiva ya testadas o del material de referencia calibrado.

PROCEDIMIENTO

Programación de la sesión de amplificación real time

(A realizarse en el área de amplificación / visualización de los productos de amplificación)

Si se utiliza un equipo **7300 Real-Time PCR System**:

Antes de iniciar la sesión, tomando como referencia la documentación del equipo, es necesario:

- encender el thermal cycler para real time, encender el computador de control, iniciar el software destinado y abrir una sesión "absolute quantification";
- programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda para CMV con el "reporter" = "FAM" y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "CMV";
- programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda de control interno con el "reporter" = "VIC" (AP525 equivalente al VIC) y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "CI";
- para cada pocillo en uso de la microplaca, programar (Well Inspector) los "detector" (tipo de fluorescencia a medir), el "passive reference" = "ROX" (se usa AP593 en lugar del ROX, normalización de la fluorescencia medida) normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o estándar con la correspondiente cantidad conocida). Completar el **Plan de trabajo** adjunto al final de este manual de instrucciones de uso transcribiendo estas informaciones o bien imprimir la organización de la microplaca. El **Plan de trabajo** deberá seguirse con atención durante la transferencia de la mezcla de reacción y de las muestras a los pocillos.

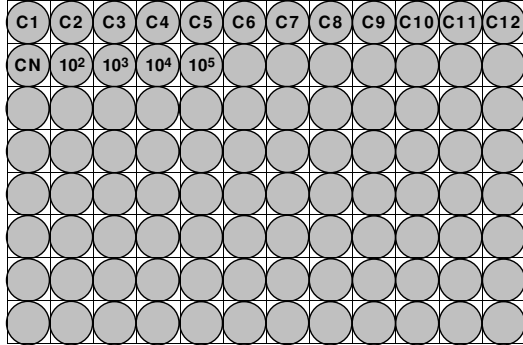
Nota: para la determinación del título del ADN en la muestra de partida es necesario preparar una serie de

CMV ELite MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

reacciones con los **Q - PCR Standard** (10⁵ copias, 10⁴ copias, 10³ copias, 10² copias) para obtener la **Curva estándar**.

Se ilustra a continuación, a modo de ejemplo, cómo puede organizarse el análisis cuantitativo de 12 muestras.



Leyenda: C1 - C12: Muestras a analizar; CN: Control negativo de amplificación;
10²: Estándar 10² copias; 10³: Estándar 10³ copias; 10⁴: Estándar 10⁴ copias; 10⁵: Estándar 10⁵ copias.

Con referencia a la documentación del instrumento, programar en el software específico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile), los parámetros del **ciclo térmico**:
- agregar, en la fase de amplificación, el paso (Add Step) de **extensión a 72°C**;

Nota: la adquisición de la fluorescencia (Instruments > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) debe permanecer programada en el paso de hibridación a 60°C.

- modificar los tiempos, como se indica en la siguiente tabla;
- programar un número de **45** ciclos;
- programar el valor de volumen para la simulación software de la transferencia térmica en la reacción ("Sample volume") a **30 µL**;
- opcional: agregar la fase de disociación (Add Dissociation Stage) y programar la temperatura en un rango de **40°C a 80°C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tiempos
Descontaminación	50°C	2 min.
Desnaturalización inicial	94°C	2 min.
Amplificación y detección (45 ciclos)	94°C	10 seg.
	60°C ² (adquisición de la fluorescencia)	30 seg.
	72°C	20 seg.
Disociación(opcional)	95°C	15 seg.
	40°C	30 seg.
	80°C	15 seg.

Si se utiliza un equipo **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- Antes de iniciar la sesión, tomando como referencia la documentación del equipo, es necesario:
- encender el thermal cycler para real time, encender el computador de control, iniciar el software destinado y abrir una sesión "absolute quantification" y programar "Run mode: Fast 7500";
 - programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda para CMV con el "reporter" = "FAM" y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "CMV";
 - programar (Detector Manager) el "detector" para la sonda de control interno con el "reporter" = "VIC" (AP525 equivalente al VIC) y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "CI";
 - para cada pocillo en uso de la microplaca, programar (Well Inspector) los "detector" (tipo de

CMV ELite MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

fluorescencia a medir, el "passive reference" = "CY5" (se usa AP593 en lugar del CY5, normalización de la fluorescencia medida) normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o estándar con la correspondiente cantidad conocida). Completar el **Plan de trabajo** adjunto al final de este manual de instrucciones de uso transcribiendo estas informaciones o bien imprimir la organización de la microplaca. El **Plan de trabajo** deberá seguirse con atención durante la transferencia de la mezcla de reacción y de las muestras a los pocillos.

Nota: para la determinación del título de ADN en la muestra inicial, es necesario preparar una serie de reacciones con los **Q - PCR Standard** (10⁵ copias, 10⁴ copias, 10³ copias, 10² copias) para obtener el **Curva estándar**.

En la sección anterior, relativa al procedimiento para el equipo **7300 Real Time PCR System**, se describe un ejemplo de la modalidad de organización de un análisis cuantitativo de algunas muestras.

Con referencia a la documentación del instrumento, programar en el software específico (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile), los parámetros del **ciclo térmico**:

- agregar, en la fase de amplificación, el paso (Add Step) de **extensión a 72°C**;
- opcional: agregar la fase de disociación (Add Dissociation Stage) y programar la temperatura en un rango de **40°C a 80°C**.

- modificar los tiempos, como se indica en la siguiente tabla;
- programar un número de **45** ciclos;
- programar el valor de volumen para la simulación software de la transferencia térmica en la reacción ("Sample volume") a **30 µL**;
- opcional: agregar la fase de disociación (Add Dissociation Stage) y programar la temperatura en un rango de **40°C a 80°C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tiempos
Descontaminación	50°C	2 min.
Desnaturalización inicial	94°C	2 min.
Amplificación y detección (45 ciclos)	94°C	10 seg.
	60°C ² (adquisición de la fluorescencia)	30 seg.
	72°C	20 seg.
Disociación(opcional)	95°C	15 seg.
	40°C	1 min.
	80°C	15 seg.
	60°C	15 seg.

Preparación de la amplificación

(A realizarse en el área de extracción / preparación de la reacción de amplificación)

Antes de iniciar la sesión es necesario:

- extraer y descongelar las probetas con las muestras a analizar. Agitar delicadamente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlas en hielo;
- extraer y descongelar las probetas **CMV Q - PCR Mix** necesarias para la sesión teniendo presente que el contenido de cada una es suficiente para preparar **25 reacciones**. Agitar delicadamente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlas en hielo;
- extraer y descongelar la probeta de **CMV - Positive Control** o las probetas de **CMV Q - PCR Standard**. Agitar delicadamente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para obtener en el fondo el contenido y mantenerlas en hielo;
- extraer la **Amplification microplate** que será utilizada en la sesión, prestando atención de manejarla con guantes sin polvo y de no dañar los pocillos.

1. Transferir, depositándolos cuidadosamente en el fondo sin crear burbujas, **20 µL** de mezcla de reacción **CMV Q - PCR MIX** en los pocillos de la **Amplification microplate** como fue establecido previamente en el **Plan de trabajo**.

CMV ELite MGB® Kit
reactivo para l'amplificaci3n en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Nota: Si no se utiliza toda la mezcla de reacci3n, conservar el volumen restante en lugar oscuro a -20°C por un m3ximo de un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacci3n por un m3ximo de **3 VECES**.

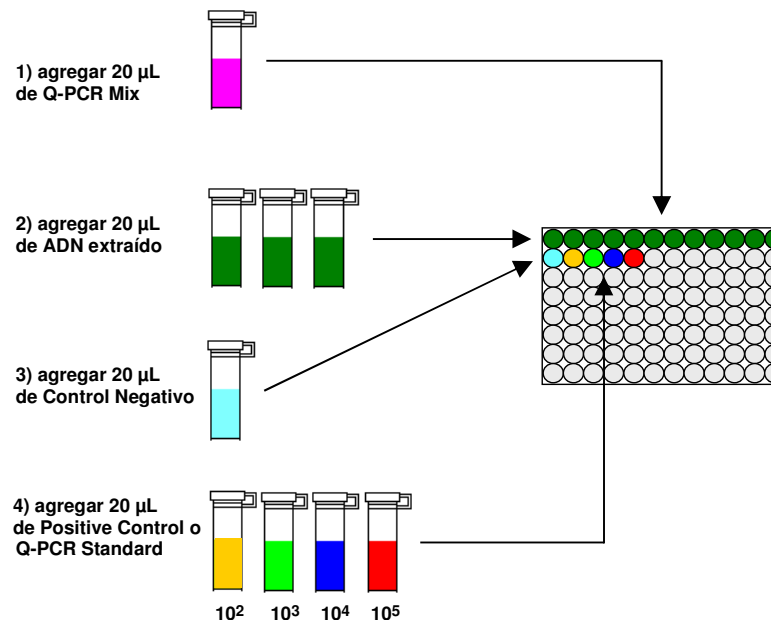
- Transferir, deposit3ndolos cuidadosamente en la mezcla de reacci3n, **20 µL de ADN extraido** de la primera muestra en el correspondiente pocillo de la **Amplification microplate** como fue establecido previamente en el **Plan de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando tres veces el volumen de 20 µL en la mezcla de reacci3n. Prestar atenci3n a no crear burbujas. Proceder del mismo modo con todos los otros **ADN extraidos**.
- Transferir, deposit3ndolos cuidadosamente en la mezcla de reacci3n, **20 µL de Agua bidestilada est3ril** (no provista en el producto) en el pocillo de la **Amplification microplate** de control negativo de amplifiaci3n como fue establecido previamente en el **Plan de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando tres veces el agua bidestilada est3ril en la mezcla de reacci3n. Prestar atenci3n a no crear burbujas.
- Dependiendo del tipo de resultado solicitado (cualitativo o cuantitativo), siga una de las dos opciones:
 - Cuando se requiera un resultado **cualitativo** del an3lisis (detecci3n de ADN de CMV): transf3rlo, deposit3lo cuidadosamente en la mezcla de reacci3n, **20 µL de CMV - Positive Control** en el pocillo correspondiente de la microplaca de amplifiaci3n seg3n lo establecido previamente en el **Plan de trabajo**. Mezcle bien el control positivo pipeteando el **CMV - Positive Control** tres veces en la mezcla de reacci3n. Ten cuidado de no crear burbujas.
 - Cuando se requiere un resultado **cuantitativo** del an3lisis (cuantificaci3n del ADN de CMV): transferir, depositarlos cuidadosamente en la mezcla de reacci3n, **20 µL de CMV Q - PCR Standard 10²** en el pocillo correspondiente de la microplaca de Amplifiaci3n como se estableci3 previamente en el **Plan de trabajo**. Mezcle el pocillo est3ndar pipeteando **CMV Q - PCR Standard 10²** tres veces en la mezcla de reacci3n. Ten cuidado de no crear burbujas. Proceder de la misma manera con i **CMV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.
- Sellar cuidadosamente la **Amplification microplate** con la **Amplification Sealing Sheet**.
- Transferir la **Amplification microplate** en el thermal cycler para real time ubicado en el 3rea de "amplificaci3n / detecci3n" de los productos de amplifiaci3n e iniciar el ciclo t3rmico de amplifiaci3n, guardando la programaci3n de la sesi3n con una identificaci3n un3voca y reconocible (por ej. "año-mes-día-CMV-EGSpA").

Nota: Al finalizar el ciclo t3rmico, se debe quitar la **Amplification microplate** con los productos de reacci3n del equipo y se debe eliminar para no generar contaminaciones ambientales. **Nunca levantar la Amplification Sealing Sheet de la Amplification microplate** para evitar que se derramen los productos de reacci3n.

En la siguiente figura se ilustra de manera sint3tica el procedimiento para la preparaci3n de las reacciones de amplifiaci3n.

CMV ELite MGB® Kit
reactivo para l'amplificaci3n en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD



Nota: Si la preparaci3n de la amplifiaci3n se realiza mediante el equipo «**QIASymphony® SP/AS**», introducir la microplaca con los extractos, los reactivos y la microplaca de amplifiaci3n en los alojamientos espec3ficos, usando los adaptadores, luego respetar lo previsto en el manual de uso del preparador autom3tico y los pasos requeridos por el software.

Nota: si la amplifiaci3n se configura con el instrumento «**ELITE GALAXY**», cargue la microplaca de eluci3n, la mezcla de reacci3n completa y la microplaca de amplifiaci3n como se especifica en el manual de instrucciones del instrumento y siga los requisitos de la GUI .

An3lisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda espec3fica para CMV (detector FAM "CMV") y por la sonda espec3fica para el Control Interno (detector VIC "CI") en las reacciones de amplifiaci3n deben ser analizados con el software del equipo.

Antes de efectuar el an3lisis, tomando como referencia la documentaci3n del equipo, es necesario:

- programar manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) el intervalo de c3lculo del **Nivel de fluorescencia de fondo (Baseline)** desde el ciclo 6 al ciclo 15;

Nota: En caso de una muestra positiva con alto t3tulo de CMV, la fluorescencia FAM de la sonda espec3fica para CMV puede comenzar a crecer antes del 15º ciclo. En este caso el intervalo de c3lculo del **Nivel de fluorescencia de fondo** debe ser adaptado desde el ciclo 6 al ciclo en el cual la fluorescencia FAM comienza a crecer (Results > Component).

Si se utiliza un equipo **7300 Real-Time PCR System**:

- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector FAM "CMV" en **0,1**;
- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector VIC "CI" en **0,05**.

Si se utiliza un equipo **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector FAM "CMV" en **0,2**;

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

- programar manualmente el Umbral (Threshold) para el detector VIC "CI" en 0,1.

Los valores de fluorescencia emitidos por las sondas específicas en la reacción de amplificación y el valor **Umbral** de fluorescencia se utilizan para determinar el **Ciclo Umbral (Ct, Threshold cycle)**, el ciclo en el cual se ha alcanzado el valor **Umbral** de fluorescencia.

En la reacción de amplificación con el **Positive Control***, el valor de **Ct** para CMV (Resultados> Informe) se usa para validar la amplificación y detección como se describe en la siguiente tabla::

Reacción Positive Control detector FAM "CMV"	Resultado de la prueba	Amplificación / Detección
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Positive Control** es **Ct > 25** o **Ct no determinado (Undetermined)** para el CMV, la presencia del ADN diana no se detectó correctamente. Hubo problemas en la fase de amplificación o detección (dispensación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico) que pueden causar resultados incorrectos La sesión no es válida y debe repetirse por la fase de amplificación.

* **Nota:** cuando este producto se utiliza para la cuantificación del ADN del CMV, se configuró la serie de reacción con los **Q - PCR Standard** en lugar de la reacción con **Positive Control**. En este caso, para validar la amplificación y detección, se debe hacer referencia a la reacción de amplificación del **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

En la reacción de amplificación del **Control negativo**, el valor de **Ct** para CMV (Results > Report) se utiliza para confirmar la amplificación y la detección como se describe en la siguiente tabla:

Reacción Control negativo detector FAM "CMV"	Resultado de la prueba	Amplificación / Detección
Ct No determinado	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Control negativo** es distinto de **Ct No determinado (Undetermined)** para CMV, ha sido detectada la presencia de ADN blanco. Se han verificado problemas en la fase de amplificación (contaminación) que pueden causar resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y se debe repetir a partir de la fase de amplificación.

En las reacciones de amplificación de cada **muestra**, el valor de **Ct** para CMV se utiliza para detectar la presencia de ADN blanco, mientras que el valor de **Ct** para el Control Interno se utiliza para confirmar la extracción, amplificación y detección.

Nota: Verificar con el software del equipo (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) que el **Ct** sea determinado por un aumento rápido y regular de los valores de fluorescencia y no por fenómenos de pico o aumento gradual de la señal de fondo (fondo irregular o alto).

Este producto tiene la capacidad de detectar una cantidad mínima de aproximadamente 11 genomas Equivalentes por reacción, 279 genomas Equivalentes por mL de sangre entera, usando el kit de extracción «**EXTRAblood**» (véanse las Características de las prestaciones).

Los resultados como **Ct** de las reacciones de amplificación de cada **muestra** (Results > Report) son utilizados como se describe en la siguiente tabla:

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Reacción muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado de la prueba	ADN de CMV
detector FAM "CMV"	detector VIC "CI"			
Ct No determinado	Ct > 35 o Ct No determinado	no idónea	no válido	-
	Ct ≤ 35	idónea	válido, negativo	NO DETECTADO
Ct Determinado	Ct > 35 o Ct No determinado	idónea	válido, positivo	DETECTADO
	Ct ≤ 35	idónea	válido, positivo	DETECTADO

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct No determinado** para CMV y **Ct > 35** o **Ct No determinado** para el Control Interno, no ha sido posible detectar de manera eficiente el ADN del Control Interno. En este caso, se han verificado problemas durante la fase de amplificación (amplificación no eficiente o nula) o durante la fase de extracción (degradación del ADN de la muestra, muestra con un número de células insuficiente, pérdidas del ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en la extracción) que pueden provocar resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra no es apta, la prueba no es válida y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct No determinado** para CMV y **Ct ≤ 35** para el Control Interno, el ADN de CMV no ha sido detectado en el ADN extraído de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de CMV esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (ver apartado sobre las Características de las prestaciones). En este caso el resultado sería un falso negativo.

Los resultados obtenidos con esta prueba deben ser interpretados considerando todos los datos clínicos y los resultados de los otros exámenes de laboratorio correspondientes al paciente.

Nota: Cuando en la reacción de amplificación correspondiente a una muestra ha sido detectada la presencia de ADN de CMV, la amplificación del Control Interno puede dar como resultado un Ct > 35 o Ct No determinado. En efecto, la reacción de amplificación de baja eficiencia del Control Interno puede ser anulada por competición de la reacción de amplificación de alta eficiencia de CMV. En este caso, la muestra es apta de todas maneras y el resultado positivo de la prueba es válido.

Análisis cuantitativo de los resultados

Después de realizar el procedimiento para el análisis cualitativo de los resultados se puede hacer el análisis cuantitativo de los resultados correspondientes a las muestras positivas.

Los valores de **Ct** para CMV en las reacciones de amplificación de los cuatro **Q - PCR standard** se utilizan para calcular la **Curva estándar** (Resultados> Curva estándar) de la sesión de amplificación y para validar la amplificación y detección como se describe en la siguiente tabla:

Curva estándar detector FAM "CMV"	Intervalo de aceptación	Amplificación / Detección
Coefficiente de Correlación (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTA

Si el valor del **Coefficiente de correlación (R2)** no está contenido dentro de los límites, no ha sido detectada correctamente la presencia de ADN blanco. Se han verificado problemas en la fase de amplificación o en la de detección (dispensación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, programación incorrecta de la posición del control positivo, programación incorrecta del ciclo térmico) que pueden provocar resultados incorrectos. La sesión no es válida y se debe repetir a partir de la fase de amplificación.

Los valores de **Ct** para CMV en las reacciones de amplificación de cada **muestra** y la **Curva estándar (Standard Curve)** (Results > Standard Curve) de la sesión de amplificación son utilizados para calcular la **Cantidad (Quantity)** de ADN blanco presente en las reacciones de amplificación correspondientes a las muestras.

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Este producto tiene la capacidad de cuantificar desde 1.000.000 a aproximadamente 13 genomas Equivalentes por reacción, de 25.000.000 a 316 genomas Equivalentes por mL de sangre entera, usando el kit de extracción «EXTRAblood» (véanse las Características de las prestaciones en la página 20), como se describe en la siguiente tabla:

Resultado de la muestra detector FAM "CMV"	genomas Equivalentes de CMV por reacción
Cantidad > 1 x 10 ⁶	SUPERIORES A 1.000.000
1,3 x 10 ¹ ≤ Cantidad ≤ 1 x 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad < 1,3 x 10 ¹	INFERIORES A 13

Los resultados (Cantidad) de cada muestra (Results > Report) son utilizados para calcular los genomas Equivalentes (gEq) de CMV presentes en la muestra de partida (Nc) según esta fórmula:

$$Nc = \frac{V_e \times \text{Cantidad}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Donde:

V_c es el volumen de la muestra usado en la extracción en relación con la unidad de medida requerida;
E_p es la eficiencia del procedimiento, extracción y amplificación, expresada en decimales;
V_e es el volumen total obtenido de la extracción expresado en µL;
V_a es el volumen del producto de extracción usado en la reacción de amplificación expresado en µL;
Cantidad es el resultado de la reacción de amplificación correspondiente a la muestra expresado en gEq por reacción.

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada con EDTA y el kit de extracción «EXTRAblood» y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera y «EXTRAblood»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 25 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de plasma extraído con EDTA y el sistema de extracción ELITe STAR System y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para plasma y «ELITe STAR System»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 28 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada con EDTA y el sistema de extracción ELITe GALAXY System y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera y «ELITe GALAXY System»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de plasma extraído con EDTA y el sistema de extracción ELITe GALAXY System y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para plasma y «ELITe GALAXY System»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 35 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada con EDTA y el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®» y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera y «NucliSENS® easyMAG®»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 50 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de líquido cefalorraquídeo y de orina y el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®» y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para líquido cefalorraquídeo y orina y «NucliSENS® easyMAG®»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 10 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada con EDTA y el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS», y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera y «QIASymphony® SP/AS»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 24 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de plasma extraído con EDTA y el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS», y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para plasma y «QIASymphony® SP/AS»}$$

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 12 \times \text{Cantidad}$$

Conversión de los resultados en las Unidades Internacionales

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada en EDTA y el kit de extracción «EXTRAblood» y se desea obtener el resultado expresado en UI / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera y «EXTRAblood»}$$

$$F_c = 0,76 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times F_c$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 19 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada en EDTA y el kit de extracción «ELITe STAR System» y se desea obtener el resultado expresado en UI / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para sangre entera y ELITe STAR System}$$

$$F_c = 0,83 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times F_c$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 23,2 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de plasma extraído con EDTA y el sistema de extracción «ELITe STAR System» y se desea obtener el resultado expresado en UI / mL, la fórmula es:

$$\text{Fórmula simplificada para plasma y «ELITe STAR System»}$$

$$F_c = 1,10 \text{ UI / gEq}$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times F_c$$

$$Nc \text{ (UI / mL)} = 30,8 \times \text{Cantidad}$$

Cuando se utilizan muestras de sangre entera recolectada en EDTA y el sistema de extracción «ELITe GALAXY System» y se desea obtener el resultado expresado en UI / mL, la fórmula es:

Fórmula simplificada para sangre entera y «ELITE GALAXY System»	
$Fc = 0,51 \text{ UI / gEq}$	$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
	$Nc \text{ (UI / mL)} = 17,9 \times \text{Cantidad}$

Quando se utilizan muestras de plasma extraído con EDTA y el sistema de extracción «ELITE GALAXY System» y se desea obtener el resultado **expresado en UI / mL**, la fórmula es:

Fórmula simplificada para plasma y «ELITE GALAXY System»	
$Fc = 0,28 \text{ UI / gEq}$	$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
	$Nc \text{ (UI / mL)} = 9,8 \times \text{Cantidad}$

Quando se utilizan muestras de sangre entera recolectada en EDTA y el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®» y se desea obtener el resultado **expresado en UI / mL**, la fórmula es:

Fórmula simplificada para sangre entera y «NucliSENS® easyMAG®»	
$Fc = 0,61 \text{ UI / gEq}$	$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
	$Nc \text{ (UI / mL)} = 30,5 \times \text{Cantidad}$

Quando se utilizan muestras de sangre entera recolectada en EDTA y el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS» y se desea obtener el resultado **expresado en UI / mL**, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal con «QIASymphony® SP/AS»	
$Fc = 0,46 \text{ UI / gEq}$	$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
	$Nc \text{ (UI / mL)} = 11 \times \text{Cantidad}$

Quando se utilizan muestras de plasma extraído con EDTA y el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS» y se desea obtener el resultado **expresado en UI / mL**, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal con «QIASymphony® SP/AS»	
$Fc = 0,87 \text{ UI / gEq}$	$Nc \text{ (UI / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
	$Nc \text{ (UI / mL)} = 10,4 \times \text{Cantidad}$

Donde: **Fc** es el factor de conversión establecido utilizando el material de referencia calibrado aprobado por la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Techniques", NIBSC, Reino Unido, código 09/162 (véanse las Características de las prestaciones).

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES

Sensibilidad analítica: límite de detección

La sensibilidad analítica de esta prueba, como límite de detección, permite detectar la presencia de aproximadamente 11 genomas Equivalentes en los 20 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de la prueba, como límite de detección, ha sido testada utilizando un ADN plasmídico que contiene el producto de amplificación cuya concentración inicial ha sido medida espectrofotométricamente. El ADN plasmídico ha sido diluido con un título de 10 copias / 20 µL en ADN genómico humano con un título de 500 ng / 20 µL. Esta muestra fue utilizada en 50 repeticiones para realizar la amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

La sensibilidad analítica de la prueba ha sido verificada utilizando un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite utilizando muestras de sangre entera y «EXTRAblood». El panel ha sido preparado utilizando muestras de sangre entera negativa para el ADN de CMV positividad con el material de referencia calibrado y certificado OptiQuant CMV DNA (cepa AD169, AcroMetrix Europe B.V., Países Bajos) con una concentración de 3.160 gEq / mL a 1 gEq / mL. Cada muestra del panel ha sido utilizada en 24 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se ha llevado a cabo con la regresión Probit. El límite de detección se ha definido como la concentración en la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Límite de detección con muestras de sangre entera y «EXTRAblood» (gEq / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	279 gEq / mL	198 gEq / mL	466 gEq / mL

Límite de detección con muestras de sangre entera y «EXTRAblood» (gEq / reacción)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	11,2 gEq / reac.	7,9 gEq / reac.	18,6 gEq / reac.

Las conversiones de gEq / mL a gEq / reacción se han calculado como se indica en la página 31.

La sensibilidad analítica de la prueba se ha verificado utilizando un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite junto con muestras de sangre entera y **ELITE STAR System**. El panel se ha preparado diluyendo el "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Reino Unido) en sangre entera extraído con EDTA y negativa para el ADN de CMV. Las concentraciones virales variaban de 3,160 UI / mL a 1000 IU / mL. Cada muestra del panel se ha testado en doce repeticiones para llevar a cabo todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con sistema de extracción automático **ELITE STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se ha realizado con la regresión Probit. El límite de detección ha sido definido como la concentración en la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Límite de detección con muestras de sangre entera y «ELITE STAR System» (UI / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	263 UI / mL	128 UI / mL	1.208 UI / mL

La sensibilidad analítica de la prueba se indica como gEq/mL en la siguiente tabla:

Límite de detección con muestras de sangre entera y «ELITE STAR System» (gEq / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	317 gEq / mL	154 gEq / mL	1.455 gEq / mL

La sensibilidad analítica como Eq/mL para muestras de plasma y **ELITE STAR System** se calcula aplicando el factor específico de conversión citado en la página 31.

La sensibilidad analítica de la prueba se ha verificado utilizando un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite junto con muestras de plasma y **ELITE STAR System**. El panel se ha preparado diluyendo el "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Reino Unido) en plasma extraído con EDTA y negativa para el ADN de CMV. Las concentraciones virales variaban de 3,160 UI / mL a 1000 IU / mL. Cada muestra del panel se ha testado en doce repeticiones para llevar a cabo todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con sistema de extracción automático **ELITE STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se ha realizado con la regresión Probit. El límite de detección ha sido definido como la concentración en la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Límite de detección con muestras de plasma y «ELITE STAR System» (UI / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	222 UI / mL	126 UI / mL	1638 UI / mL

La sensibilidad analítica se indica como gEq/mL en la siguiente tabla:

Límite de detección con muestras de plasma y «ELITE STAR System» (gEq / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	201 gEq / mL	114 gEq / mL	1489 gEq / mL

La sensibilidad analítica como Eq/mL para muestras de plasma y **ELITE STAR System** se calcula aplicando el factor específico de conversión citado en la página 31.

La sensibilidad analítica de la prueba se ha verificado utilizando un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite junto con muestras de sangre entera y **ELITE GALAXY System**. El panel se ha preparado diluyendo el "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Reino Unido) en sangre entera recolectada con EDTA y negativa para el ADN de CMV. Las concentraciones virales variaban de 10 UI / mL a 560 IU / mL. Cada muestra del panel se ha testado en doce repeticiones para llevar a cabo todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con sistema de extracción automático **ELITE GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se ha realizado con la regresión Probit. El límite de detección ha sido definido como la concentración en la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%.

Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Límite de detección con muestras de sangre entera y «ELITE GALAXY System» (UI / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	127 UI / mL	75 UI / mL	435 UI / mL

La sensibilidad analítica se indica como gEq/mL en la siguiente tabla:

Límite de detección con muestras de sangre entera y «ELITE GALAXY System» (gEq / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	249 gEq / mL	147 gEq / mL	853 gEq / mL

La sensibilidad analítica como Eq/mL para muestras de sangre entera y **ELITE GALAXY System** se calcula aplicando el factor específico de conversión citado en la página 31.

La sensibilidad analítica de la prueba se ha verificado utilizando un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite junto con muestras de plasma y **ELITE GALAXY System**. El panel se ha preparado diluyendo el "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques" (NIBSC code 09/162, Reino Unido) en plasma extraído con EDTA y negativa para el ADN de CMV. Las concentraciones virales variaban de 10 UI / mL a 560 IU / mL. Cada muestra del panel se ha testado en doce repeticiones para llevar a cabo todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con sistema de extracción automático **ELITE GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se ha realizado con la regresión Probit. El límite de detección ha sido definido como la concentración en la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Límite de detección con muestras de plasma y «ELITE GALAXY System» (UI / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	140 UI / mL	86 UI / mL	381 UI / mL

La sensibilidad analítica se indica como gEq/mL en la siguiente tabla:

Límite de detección con muestras de plasma y «ELITE GALAXY System» (gEq / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	500 gEq / mL	307 gEq / mL	1.361 gEq / mL

La sensibilidad analítica como Eq/mL para muestras de plasma y **ELITE GALAXY System** se calcula aplicando el factor específico de conversión citado en la página 32.

Sensibilidad analítica: intervalo de medición lineal

La sensibilidad analítica de esta prueba, como intervalo de medición lineal, permite cuantificar desde aproximadamente 1.000.000 a alrededor de 13 genomas Equivalentes en los 20 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de la prueba ha sido evaluada utilizando un panel de diluciones (1 Log₁₀ entre una dilución y la siguiente) de ADN plasmídico que contiene el producto de amplificación, cuya concentración inicial ha sido medida espectrofotométricamente. Los puntos del panel de 10⁷ moléculas por reacción a 10¹ moléculas por reacción han sido utilizados en 9 repeticiones para efectuar la amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado con la regresión lineal, ha demostrado que la prueba presenta una respuesta lineal para todos los puntos del panel (coeficiente de correlación lineal superior a 0,99).

El límite inferior del intervalo de medición lineal ha sido fijado en aproximadamente 13 gEq / reacción, porque en las pruebas para el estudio del límite de detección, la dilución en 316 gEq / mL es la última que presenta el 100% de positividad. El límite inferior del intervalo de medición lineal se encuentra dentro de un logaritmo del valor del estándar de amplificación Q - PCR Standard de concentración más baja (10² gEq / 20 µL).

El límite superior del intervalo de medición lineal ha sido fijado en 10⁶ gEq / reacción, dentro de un logaritmo del valor del estándar de amplificación Q - PCR Standard de concentración más alta, (10⁵ gEq / 20 µL). Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Intervalo de medición lineal con muestras de sangre entera y «EXTRAblood»		
	Límite inferior	Límite superior
gEq / MI	316	25.000.000
gEq / reacción	12,6	1.000.000

Las conversiones de gEq / mL a gEq / reacción, y viceversa, se han calculado como se indica en la página 19.

Sensibilidad analítica: Precisión y Exactitud

La precisión de la prueba, como variabilidad de los resultados obtenidos en una misma sesión de amplificación con distintas repeticiones de una muestra, ha permitido obtener un Coeficiente de Variación porcentual (CV %) promedio de los valores de Ct inferior al 2% dentro del intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en los 20 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La precisión de la prueba, como variabilidad de los resultados obtenidos en una misma sesión de amplificación con distintas repeticiones de una muestra, ha permitido obtener un Coeficiente de Variación porcentual (CV %) promedio de las cantidades medidas de aproximadamente el 21% dentro del intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en los 20 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La exactitud de la prueba, como diferencia entre el promedio de los resultados obtenidos en una misma sesión de amplificación con distintas repeticiones de una muestra y el valor teórico de la concentración de la muestra, ha permitido obtener una Inexactitud porcentual promedio de las cantidades medidas de aproximadamente el 20% dentro del intervalo de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en los 20 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La precisión y la exactitud han sido determinadas utilizando los datos obtenidos en las pruebas para el estudio del intervalo de medición lineal.

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con panel de material de referencia certificado

La sensibilidad analítica de la prueba, como reproducibilidad de los resultados en comparación con los resultados obtenidos con otras metodologías y en distintos laboratorios, ha sido verificada con un panel de material de referencia certificado.

Las pruebas han sido realizadas utilizando como material de referencia calibrado y certificado un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite (cepa AD169, QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra del panel ha sido utilizada en 2 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción con «EXTRAblood» y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Pruebas con material de referencia calibrado y «EXTRAblood»				
Muestra	Consensus Log ₁₀ conc. viral	Desviación Estándar	Positivas / Repeticiones	Promedio de los resultados Log ₁₀ gEq / mL
CMV09-01	4,368	0,465	2 / 2	4,064
CMV09-02	2,995	0,400	2 / 2	2,984
CMV09-03	2,297	0,583	2 / 2	2,038
CMV09-04	5,407	0,442	2 / 2	5,026
CMV09-05	2,996	0,444	2 / 2	2,902
CMV09-06	3,493	0,421	2 / 2	3,231
CMV09-07	4,379	0,412	2 / 2	4,129
CMV09-08	Negativo	NA	0 / 2	Non detectado
CMV09-09	6,374	0,457	2 / 2	5,943
CMV09-10	2,352	0,542	2 / 2	1,996
CMV09-11	2,407	0,513	2 / 2	2,105
CMV09-12	3,645	0,449	2 / 2	3,539

Todas las muestras han sido detectadas correctamente. Los resultados cuantitativos obtenidos están comprendidos en el intervalo definido por el Consensus de las pruebas comerciales ± 1 Desviación Estándar, como es requerido.

Se han realizado otras pruebas utilizando material de referencia calibrado, un panel de diluciones de CMV comprendido dentro del límite de concentración (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Scotland, Reino Unido). Cada muestra ha sido testada en duplicado para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI / mL, que se citan en la siguiente tabla, se han determinado aplicando el factor de conversión para **ELITE STAR System** y plasma y se resumen en la siguiente tabla.

Pruebas con material de referencia calibrado y ELITE STAR System				
Muestra	Consensus Log ₁₀ conc. viral	Desviación Estándar	Positivas / Repeticiones	Promedio de los resultados Log ₁₀ UI / mL
CMV12-01	4,409	0,349	2/2	4,589
4,589	3,925	0,335	2/2	4,020
4,020	2,297	0,507	1/2	2,377
2,377	2,021	0,617	1/2	2,246
2,246	3,158	0,613	2/2	3,475
3,475	3,448	0,361	2/2	3,530
3,530	3,490	0,377	2/2	3,259
3,259	Negativo	NA	0/2	Non detectado
CMV12-09	3,767	0,374	2/2	3,709
CMV12-10	2,826	0,456	2/2	2,951

Todas las muestras han sido detectadas correctamente. Los resultados cuantitativos obtenidos están comprendidos en el intervalo definido por el Consensus de las pruebas comerciales ± 1 Desviación Estándar, tal como es requerido.

Se han realizado otras pruebas utilizando material de referencia calibrado, un panel de diluciones de CMV comprendido dentro del límite de concentración (QCMD 2012 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Scotland, Reino Unido). Cada muestra ha sido testada en duplicado para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI / mL, que se citan en la siguiente tabla, se han determinado aplicando el factor de conversión para **ELITE GALAXY System** y plasma y se resumen en la siguiente tabla.

Pruebas con material de referencia calibrado y «ELITE GALAXY System»				
Campione	Consensus Log ₁₀ conc. viral	Desviación Estándar	Positivas / Repeticiones	Promedio de los resultados Log ₁₀ gEq / mL
CMV12-01	4.409	0,349	2/2	4,035
CMV12-02	3.925	0,335	2/2	3,476
CMV12-03	2.297	0,507	1/1	1,809
CMV12-04	2.021	0,617	2/2	1,638
CMV12-05	3.158	0,613	2/2	2,500
CMV12-06	3.448	0,361	2/2	3,070
CMV12-07	3.490	0,377	2/2	3,296
CMV12-08	Negativo	NA	0/2	Non detectado
CMV12-09	3.767	0,374	2/2	3,481
CMV12-10	2.826	0,456	2/2	2,569

Se ha excluido una repetición de CMV12-03 del análisis debido a una avería del sistema durante la fase inicial de extracción. En el análisis cualitativo, todas las muestras se han detectado correctamente. En el análisis cuantitativo, 8/9 muestras positivas se han cuantificado correctamente dentro del intervalo de 0,5 log con respecto al título previsto. Las muestras CMV12-01 y CMV12-07 están asociadas. La diferencia entre CMV12-01 (4,579 log) y CMV12-07 (3,888 log) ha resultado igual a 0,691, por lo cual, está comprendida dentro del intervalo previsto. El resultado CMV12-07 se ha considerado válido.

Sensibilidad analítica: Factor de conversión en las Unidades Internacionales

El factor de conversión para utilizar con esta prueba para transformar el resultado cuantitativo de gEq / mL a Unidades Internacionales / mL con **muestras de sangre entera** recolectada con EDTA se ha definido como:

0,76 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el kit de extracción manual «**EXTRAblood**»;

0,79 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el sistema de extracción automático **ELiTe STAR System**;

0,51 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el sistema de extracción automático **ELiTe GALAXY System**;

0,61 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el sistema de extracción automático «NucliSENS® easyMAG®»;

0,46 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el sistema de extracción automático «QIASymphony® SP/AS®».

El factor de conversión para utilizar con esta prueba para transformar el resultado cuantitativo de gEq / mL en Unidades Internacionales / mL con **muestras de plasma** extraído con EDTA se ha definido como:se ha definido como:

1,10 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el sistema de extracción automático **ELiTe STAR System**;

0,27 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el sistema de extracción automático **ELiTe GALAXY System**;

0,87 Unidades Internacionales / gEq cuando se utiliza el sistema de extracción automático «QIASymphony® SP/AS®».

Los datos correspondientes a cada factor de conversión se citan a continuación.

Sangre entera recolectada con EDTA

El factor de conversión se ha determinado utilizando un panel de cuatro diluciones (0,5 Log₁₀ entre una dilución y la siguiente) de material de referencia calibrado aprobado por la OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus DNA for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Reino Unido, código 09/162) en sangre entera recolectada con EDTA.

Los cuatro puntos del panel se han utilizado en 8 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción con «**EXTRAblood**» y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 0,76 Unidades Internacionales (UI) por gEq de CMV detectado. Los resultados finales se presentan en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con sangre entera y «EXTRAblood» (Fc = 0,76 UI / gEq)					
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	362.383	275.411	5,440	
100.000	5,000	155.738	118.361	5,073	
31.625	4,500	39.503	30.022	4,477	
10.000	4,000	13.623	10.353	4,015	

Los cuatro puntos del panel se han empleado en 15 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELiTe STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 0,79 Unidades Internacionales (UI) para gEq de CMV detectado en muestras de plasma. Los resultados finales se presentan en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con sangre entera y «ELiTe STAR System» (Fc = 0,83 UI / gEq)					
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	489.201	406.037	5,564	
100.000	5,000	119.506	99.190	4,964	
31.625	4,500	39.777	33.015	4,493	
10.000	4,000	13.749	11.411	4,017	
3.162	3,500	3.636	3.018	3,443	

Los cuatro puntos del panel se han utilizado en 15 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema automático **ELiTe GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 0,51 Unidades Internacionales (UI) para gEq de CMV detectado en muestras de sangre entera. Los resultados finales se presentan en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con sangre entera y ELiTe GALAXY System (Fc = 0,51 UI / gEq)					
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL	
316.228	5,500	484.362	247.024	5,384	
100.000	5,000	217.996	111.178	5,039	
31.623	4,500	56.243	28.684	4,449	
10.000	4,000	23.600	11.902	4,074	
3.162	3,500	7.302	3.724	3,553	

Los cuatro puntos del panel se han utilizado en 8 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «NucliSENS® easyMAG®», y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 0,61 Unidades Internacionales (UI) por gEq de CMV detectado.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con sangre entera y «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 0,61 UI / gEq)					
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL	
316.255	5,500	564.835	344.549	5,537	
100.000	5,000	178.704	109.009	5,037	
31.625	4,500	51.454	31.387	4,497	
10.000	4,000	14.141	8.626	3,936	

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para la amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Los cuatro puntos del panel se han utilizado en 8 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 0,46 Unidades Internacionales (UI) por gEq de CMV detectado. Los resultados finales se presentan en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con sangre entera y « QIASymphony® SP/AS » (Fc = 0,46 UI / gEq)				
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	599.940	275.972	5,435
100.000	5,000	222.073	102.153	5,004
31.625	4,500	70.712	32.527	4,497
10.000	4,000	24.326	11.190	4,038

Plasma extraído con EDTA

El factor de conversión se ha determinado utilizando un panel de cuatro diluciones (0,5 Log10 entre una dilución y la siguiente) de material de referencia calibrado aprobado por la OMS ("1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques", NIBSC, Reino Unido, código 09/162), en plasma extraído con EDTA.

Los cuatro puntos del panel se han empleado en 15 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 1,10 Unidades Internacionales (UI) para gEq de CMV detectado en muestras de plasma. Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con plasma y «ELITE STAR System» (Fc = 1,10 UI / gEq)				
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	302.372	332.609	5,503
100.000	5,000	109.972	120.969	5,061
31.625	4,500	29.972	32.970	4,502
10.000	4,000	8.545	9.544	3,967
3.162	3,500	2.685	2.954	3,458

Los cuatro puntos del panel se han empleado en 15 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 0,27 Unidades Internacionales (UI) para gEq de CMV detectado en muestras de plasma. Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con plasma y «ELITE GALAXY System» (Fc = 0,27 UI / gEq)				
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL
316.228	5,500	1.056.067	275.985	5,406
100.000	5,000	453.489	126.977	5,036
31.623	4,500	118.124	33.074	4,463
10.000	4,000	42.732	11.501	4,052
3.162	3,500	13.594	3.806	3,552

CMV ELITE MGB® Kit
reactivo para la amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Los cuatro puntos del panel se han utilizado en 8 repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos ha permitido calcular un factor de conversión (Fc) promedio igual a 0,87 Unidades Internacionales (UI) por gEq de CMV detectado en muestras de plasma.

Los resultados finales se presentan en la siguiente tabla.

Conversión en las Unidades Internacionales con plasma y «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 0,87 UI / gEq)				
Conc. esperada UI / mL	Conc. esperada Log ₁₀ UI / mL	Cantidad promedio gEq / mL	Cantidad promedio UI / mL	Cantidad promedio Log ₁₀ UI / mL
316.255	5,500	330.340	287.396	5,458
100.000	5,000	101.683	88.464	4,947
31.625	4,500	40.963	35.638	4,551
10.000	4,000	13.148	11.438	4,058

Sensibilidad diagnóstica: eficiencia de la detección y cuantificación en distintos genotipos / subtipos

La sensibilidad diagnóstica de la prueba, como eficiencia de detección y cuantificación en distintos genotipos / subtipos, ha sido evaluada confrontando las secuencias con bases de datos nucleotídicas.

El examen de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos cebadores y de la sonda fluorescente sobre la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos del exon 4 del gen MIEA de CMV, entre las que se encuentran las de las cepas AD169 y Merlin, ha demostrado su conservación y la ausencia de mutaciones significativas.

La sensibilidad diagnóstica de la prueba, como eficiencia de detección y cuantificación en distintos genotipos / subtipos, ha sido evaluada utilizando una construcción plasmídica que contiene la región amplificada del CMV de la cepa Merlin.

La eficiencia de detección y cuantificación ha sido evaluada utilizando como material de referencia una construcción plasmídica que contiene la región amplificada del CMV de la cepa Merlin (GENEART A.G., Alemania). El ADN plasmídico ha sido diluido en las concentraciones de 100.000, 10.000, 1.000, 100 y 10 copias por reacción. Cada muestra ha sido utilizada para realizar la amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Eficiencia de detección y cuantificación con CMV cepa Merlin			
Muestra	Concentración teórica copias / reacción	Positivas / Repeticiones	Promedio de los resultados copias / reacción
plásmido pMerlin 10 ⁵	100.000	3 / 3	93.699
plásmido pMerlin 10 ⁴	10.000	3 / 3	8.815
plásmido pMerlin 10 ³	1.000	3 / 3	898
plásmido pMerlin 10 ²	100	3 / 3	100
plásmido pMerlin 10 ¹	10	9 / 9	11

El plásmido Merlin ha sido detectado y cuantificado correctamente incluso en la concentración de 10 copias por reacción.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica de la prueba, como confirmación de muestras clínicas positivas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras clínicas de sangre entera positivas para el ADN de CMV.

La sensibilidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 54 muestras de sangre entera recolectada en EDTA negativas para el ADN de CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el DNA de CMV	54	53	0

Una muestra ha arrojado un resultado "no válido" en dos sesiones de análisis distintas. El resultado

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

"no válido", probablemente, ha sido determinado por un inhibidor no identificado presente en la muestra. Esta muestra ha sido excluida del cálculo de la sensibilidad diagnóstica. La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado superior al 98,1%.

La sensibilidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 60 muestras de sangre entera extraído con EDTA positivas para el ADN de CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera con EDTA positiva para el DNA de CMV	60	58	0

Dos muestras reportaron un resultado "no válido " en dos sesiones de análisis independientes .

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%

La sensibilidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 68 muestras de plasma recolectada en EDTA positivas para el ADN de CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recolectada en EDTA positiva para el DNA de CMV	68	66	2

Dos muestras han arrojado un resultado negativo con los productos ELITechGroup S.p.A. Esta discrepancia puede explicarse dado que el título CMV de la muestra es cercano o inferior al límite de revelación del método usado (280 gEq/mL).

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 97,1%.

La sensibilidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 60 muestras de sangre entera recolectada con EDTA positivas para el ADN de CMV (testadas con un producto CE IVD de amplificación real time). Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el DNA de CMV	60	60	0

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%

La sensibilidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 51 muestras de plasma extraído con EDTA positivas para el ADN de CMV (testadas con un producto CE IVD de amplificación real time). Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELITE GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recolectada en EDTA positiva para el DNA de CMV	51	47	4

Cuatro muestras han arrojado un resultado negativo con los productos ELITechGroup S.p.A. Esta discrepancia puede explicarse dado que los títulos CMV de las muestras discordantes (respectivamente, <350 gEq/mL, <350 gEq/mL, 961 gEq/mL y 534 gEq/mL) son cercanos o inferiores al límite superior de revelación del método utilizado (1411 gEq/mL). Muestras dentro del intervalo de confianza del límite de revelación pueden arrojar estocásticamente un resultado positivo o negativo, debido a la distribución casual de las partículas virales.

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 92,16%.

La sensibilidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 50 muestras de sangre entera recolectada en EDTA de donantes normales presumiblemente negativas, positivizadas para el ADN de CMV con una muestra de material de referencia certificada y calibrada (QCMD 2009 Human

CMV ELITe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido) con un título de 1500 copias / mL. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «NucliSENS® easyMAG®» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positivizado para el DNA de CMV	50	50	0

La sensibilidad de diagnóstico de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La sensibilidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando como material de referencia 60 muestras de sangre entera recolectada en EDTA de donantes normales, presumiblemente negativas para el ADN de CMV, positivizadas para el ADN de CMV con una muestra de material de referencia certificada y calibrada (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido) con un título de 700 copias / mL. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positivizado para el DNA de CMV	60	60	0

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La sensibilidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 60 muestras de plasma extraído con EDTA de donantes normales, presumiblemente negativas para el ADN de CMV, positivizadas para el ADN de CMV con una muestra de material de referencia certificada y calibrada (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido) con un título de 360 copias / mL. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recolectada en EDTA positivizado para el DNA de CMV	60	60	0

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La sensibilidad de diagnóstico ha sido evaluada utilizando como material de referencia 60 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas, positivizadas para el ADN de CMV con una muestra de material de referencia certificada y calibrada (QCMD 2009 Human Cytomegalovirus DNA EQA Panel, Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido) con un título de 300 copias / mL. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «NucliSENS® easyMAG®» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo positivizado para el ADN de CMV	60	60	0

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La sensibilidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 52 muestras clínicas de orina positivas para el ADN de CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «NucliSENS® easyMAG®» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Orina positiva para el ADN de CMV	52	52	0

La sensibilidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

Especificidad analítica: ausencia de reactividad cruzada con marcadores potencialmente interferentes

La especificidad analítica de la prueba, como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, ha sido evaluada confrontando las secuencias con bases de datos nucleotídicas.

CMV ELiTe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

El análisis de la alineación de las secuencias de los oligonucleótidos cebadores y de la sonda fluorescente con las secuencias disponibles en la base de datos de organismos distintos de CMV, entre las cuales se encuentran las del genoma completo de HHV6, el virus herpético humano más parecido al CMV, ha demostrado su especificidad y la ausencia de homologías significativas.

La especificidad analítica de la prueba, como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, ha sido verificada utilizando algunas muestras clínicas negativas para el ADN de CMV pero positivas para el ADN de HHV6, EBV y VZV que han sido confirmados negativos.

La especificidad analítica se ha corroborado utilizando como material de referencia 16 muestras de sangre entera recolectada en EDTA, negativas para el ADN de CMV, pero positivas para el ADN de HHV6, EBV y VZV (testadas con productos CE IVD de amplificación real time). Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el ADN de HHV6	8	0	8
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el ADN de EBV	7	0	7
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el ADN de VZV	1	0	1

Especificidad diagnóstica: confirmación de muestras negativas

La especificidad diagnóstica de la prueba, como confirmación de muestras clínicas negativas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras clínicas de sangre entera negativas para el ADN de CMV.

La especificidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 56 muestras de sangre entera recolectada en EDTA negativas para el ADN CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de CMV	56	0	56

La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado superior al 98,2%.

La especificidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 70 muestras de plasma extraído con EDTA negativas para el ADN CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema de extracción automático **ELiTe STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de CMV	70	0	63

Siete muestras reportaron un resultado "no válido " en dos sesiones de análisis independientes .

La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 61 muestras de plasma extraído con EDTA negativas para el ADN CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema de extracción automático **ELiTe STAR System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma extraído con EDTA negativa para el ADN de CMV	61	0	61

La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 61 muestras de sangre entera recolectada con EDTA negativas para el ADN de CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción y configuración PCR con el sistema de extracción automático **ELiTe GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

CMV ELiTe MGB® Kit
reactivo para l'amplificación en tiempo real de ADN

REF RTK015PLD

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de CMV	66	0	65

Una muestra ha resultado "no válida" debido a un inhibidor no identificado en la muestra. Este ejemplo no se ha incluido en el cálculo de la sensibilidad de diagnóstico.

La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica se ha evaluado utilizando como material de referencia 64 muestras de plasma extraído con EDTA negativas para el ADN CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema de extracción automático **ELiTe GALAXY System** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recolectada en EDTA negativa para el ADN de CMV	64	0	64

La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 50 muestras de sangre entera recolectada en EDTA de donantes normales, presumiblemente negativas para el ADN de CMV. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «NucliSENS® easyMAG®» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de CMV	50	0	50

La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 60 muestras de sangre entera recolectada en EDTA de donantes normales, presumiblemente negativas para el ADN de CMV. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positivizado para el DNA de CMV	60	1	59

Una muestra de sangre entera negativa para el ADN de CMV ha dado un resultado positivo para CMV con los productos ELITechGroup S.p.A. El resultado discordante puede ser explicado debido a un título muy bajo del ADN de CMV (aproximadamanete 2 gEq / reacción), por una infección latente de CMV, un virus ampliamente extendido en la población. La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 60 muestras de plasma extraído con EDTA de donantes normales, presumiblemente negativas para el ADN de CMV. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recolectada en EDTA negativa para el ADN de CMV	60	1	59

Una muestra de plasma negativa para el ADN de CMV ha arrojado un resultado positivo con un título de CMV demasiado bajo (aproximadamente 2 gEq / reacción) con los productos ELITechGroup S.p.A. Esta discrepancia puede explicarse con una infección latente de CMV, un virus ampliamente difundido en la población. La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 60 muestras de líquido cefalorraquídeo recolectada en EDTA negativas para el ADN CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «NucliSENS® easyMAG®» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Líquido cefalorraquídeo positívizado para el ADN de CMV	60	0	56

La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

La especificidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 56 muestras de orina negativas para el ADN de CMV, testadas con un producto CE IVD de amplificación real time. Cada muestra ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis: extracción con el sistema automático «NucliSENS® easyMAG®» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	Nº	positivas	negativas
Orina negativa para el ADN de CMV	56	1	55

Una muestra de orina negativa para el ADN de CMV ha dado un resultado positivo para CMV con los productos ELITechGroup S.p.A. El resultado discordante puede ser explicado debido a un título muy bajo del ADN de CMV (aproximadamente 4 gEq / reacción), probablemente por debajo que el límite de detección del método de referencia. La especificidad diagnóstica de la prueba en este caso ha resultado igual al 100%.

Resistencia: ausencia de contaminación cruzada

La resistencia de esta prueba, como ausencia de contaminación cruzada, ha sido verificada analizando los resultados de cinco sesiones, en las cuales muestras negativas para el ADN de CMV han sido alternadas con muestras positivizadas para el ADN de CMV. Ninguna muestra negativa para el ADN de CMV ha resultado positiva.

La ausencia de contaminación cruzada ha sido verificada utilizando una muestra de sangre entera negativa para el ADN de CMV positivizada con el material de referencia calibrado y certificado OptiQuant CMV DNA (cepa AD169, AcroMetrix Europe B.V., Países Bajos) con un título de 8.300 gEq / mL y una muestra de sangre entera positiva para el ADN de CMV. Se han utilizado cinco series de 12 muestras, alternando una muestra positivizada con otra negativa, para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positivizada para el ADN de CMV	30	30	0
Sangre entera recolectada en EDTA negativa para el ADN de CMV	30	0	30

Resistencia: tasa global de error del sistema

La resistencia de la prueba, como tasa global de error del sistema que arroja resultados falsos negativos, ha sido verificada realizando el análisis de un panel de muestras positivizadas para el ADN de CMV con bajo título y ha resultado menor al 1,7%.

La tasa global de error ha sido verificada utilizando un panel de muestras de sangre entera negativa para el ADN de CMV positivizado con el material de referencia calibrado y certificado OptiQuant CMV DNA (cepa AD169, AcroMetrix Europe B.V., Países Bajos) con un título de 900 gEq / mL. Cada muestra del panel ha sido utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y amplificación, con los productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recolectada en EDTA positivizada para el ADN de CMV	60	60	0

Roche cobas z 480 analyzer

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con **ADN extraído** de las siguientes muestras clínicas:

Sangre entera recolectada en EDTA

Las muestras de sangre entera destinadas a la extracción del ADN deben ser recolectadas en EDTA e identificarse según las instrucciones del laboratorio, transportadas a +2 / +8°C y conservadas a +2 / +8°C por un máximo de tres días. Las muestras se pueden congelar y conservar a -20°C durante máximo treinta días, o a -70°C por períodos más prolongados. Se recomienda subdividir en varias alícuotas las muestras que se van a conservar congeladas para no someterlas a repetidos ciclos de congelación/descongelación. Cuando se utilicen muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar la posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: Cuando se realiza la extracción del ADN de muestras de sangre entera con el instrumento «**MagNA Pure 24 System**», con **versión de software 1.0** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción «**Pathogen200**» y respetar las siguientes indicaciones: dispensar **300 µL** de muestra en el MagNA Pure Tube 2.0 mL, cargar el tubo en el instrumento y dar inicio a la extracción. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade **CPE 20 µL** / extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL. El **CPE** debe diluirse en proporción 1:2 en agua de grado molecular para biología. En el Manual de instrucciones para el uso del kit encontrará indicaciones detalladas sobre el procedimiento de extracción que deberán seguirse al pie de la letra.

Plasma recolectado en EDTA

Las muestras de plasma destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas en EDTA según las instrucciones del laboratorio, transportadas a +2 / +8 C y conservadas a +2 / +8 C por un máximo de tres días, o bien conservarse congeladas a -20 C por un máximo de treinta días, o a -70 C durante más tiempo.

Se recomienda subdividir en varias alícuotas las muestras que se van a conservar congeladas para no someterlas a repetidos ciclos de congelación/descongelación.

Quando se utilicen muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar la posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: Cuando se realiza la extracción del ADN de muestras de plasma con el instrumento «**MagNA Pure 24 System**», con **versión de software 1.0** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción «**Pathogen200**» y respetar las siguientes indicaciones: dispensar **300 µL** de muestra en el MagNA Pure Tube 2.0 mL, cargar el tubo en el instrumento y dar inicio a la extracción. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade **CPE 20 µL** / extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL. El **CPE** debe diluirse en proporción 1:2 en agua de grado molecular para biología. En el Manual de instrucciones para el uso del kit encontrará indicaciones detalladas sobre el procedimiento de extracción que deberán seguirse al pie de la letra.

Orina

Las muestras de orina destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben introducirse en envases sin conservantes según las indicaciones del laboratorio, transportarse a temperatura ambiente (+18 / +25 C) y conservarse a temperatura ambiente (+ 18 / +25 C) por máximo cuatro horas, o bien conservarse a +2 / +8 °C hasta un máximo de tres días. De ser posible, evitar congelar las muestras de orina del primer chorro. La congelación puede provocar la precipitación de inhibidores y la pérdida de título del ADN.

En caso de congelación, se recomienda subdividir las muestras en varias alícuotas para no someterlas a repetidos ciclos de congelación/descongelación, y conservarlas a -20 C durante máximo treinta días, o a -70°C por más tiempo.

Nota: Cuando se realiza la extracción del ADN de muestras de orina con el instrumento «**MagNA Pure 24 System**», con **versión de software 1.0** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción «**Pathogen200**» y respetar las siguientes indicaciones: dispensar **300 µL** de muestra en el MagNA Pure Tube 2.0 mL, cargar el tubo en el instrumento y dar inicio a la extracción. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade **CPE 20 µL** / extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL. El **CPE** debe diluirse en proporción 1:2 en agua de grado molecular para biología. En el Manual de instrucciones para el uso del kit encontrará indicaciones detalladas sobre el procedimiento de extracción que deberán seguirse al pie de la letra.

seguirse al pie de la letra.

Sustancias interferentes

El ADN extraído de la muestra original no debe contener heparina, hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol o 2-propanol para evitar fenómenos de inhibición y la aparición de frecuentes resultados no válidos.

Una alta cantidad de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra podría inhibir la reacción de amplificación.

No se dispone de datos a cerca de posibles fenómenos de inhibición por parte de fármacos antivirales, antibióticos, quimioterápicos o inmunosupresores.

Controles de amplificación

Es imprescindible convalidar todas y cada una de las ejecuciones de amplificación preparando una reacción para el control negativo y una reacción para el control positivo.

Como control negativo, utilizar agua de grado molecular para biología (no incluida en el kit) para añadir a la reacción en lugar del ADN extraído de la muestra.

Para el control positivo, utilizar el producto «**CMV - ELiTe Positive Control**» o alternativamente "**CMV - ELiTe Positive Control RF**". o el producto «**CMV ELiTe Standard**».

Controles de calidad

Se recomienda convalidar el procedimiento entero de análisis de cada ejecución de extracción y amplificación utilizando una muestra negativa y una muestra positiva ya sometidas a ensayo, o material de referencia calibrado.

Los controles externos deben utilizarse de conformidad con las leyes locales, estatales y entidades de acreditación federales. Ejemplo de controles externos disponibles en el mercado: «**CMV Molecular Q Panel**» (código CMVMQP01 de Qnostics Ltd, Reino Unido).

PROCEDIMIENTO

Configuración de la ejecución de amplificación en tiempo real

(Ejecútese en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación)

Si se utiliza un instrumento **cobas z 480 analyzer (Roche)**:

Antes de iniciar la ejecución, haciendo referencia a la documentación del equipo, es necesario:

- encienda la computadora de control, encienda el termociclador en tiempo real, inicie el software dedicado y, desde la ventana principal, abra una sesión de "Nuevo experimento";
- programar el volumen de reacción («Sample volume») a 40 µL;
- asignar una identificación a cada muestra («Sample editor»);
- definir el ciclo térmico de la reacción conforme a la siguiente tabla:

Ciclo térmico		
Paso	Temperaturas	Tiempos
Descontaminación	50°C	2 min
Desnaturalización inicial	94°C	2 min
Amplificación y detección (45 ciclos)	94°C	10 s
	60°C (adquisición de la fluorescencia)	30 s
	72°C	20 s
Disociación (opcional)	95°C	15 s
	40°C	30 s
	80°C	15 s

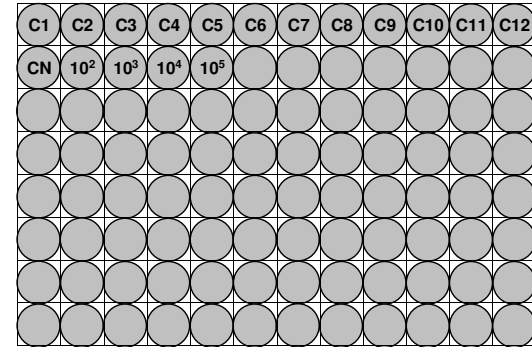
Nota: La adquisición de la fluorescencia se produce de forma individual; configurar las Ramp Rates (°C/s) a 4,4°C/s.

- seleccione los canales de detección de señal: el "detector" para la sonda CMV con el "canal FAM 465-510" y el "detector" para la sonda de control interno CI con el "canal VIC 540-580";

Cumplimentar la **hoja de trabajo** adjunta en la parte final de este manual de instrucciones de uso, transcribiendo estos datos, o bien imprimir la organización de la microplaca. Las indicaciones de la **hoja de trabajo** deberán ejecutarse con atención durante la transferencia de la mezcla de reacción y de las muestras a los pocillos.

Nota: Para la determinación del título del ADN en la muestra inicial es necesario preparar una serie de reacciones con los **Q - PCR Standard** (10⁵ gEq, 10⁴ gEq, 10³ gEq, 10² gEq) para obtener la **curva estándar**.

A continuación se ilustra, a título de ejemplo, cómo se puede organizar el análisis cuantitativo de 12 muestras.



Leyenda: C1 - C12: Muestras por analizar; CN: Control negativo de amplificación; 10²: Estándar 10² gEq; 10³: Estándar 10³ gEq; 10⁴: Estándar 10⁴ gEq; 10⁵: Estándar 10⁵ gEq.

Preparación de la amplificación

(Ejecútese en el área de extracción / preparación de la reacción de amplificación)

Antes de iniciar la sesión:

- Descongelar las probetas con las muestras que se van a analizar. Agitar suavemente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para que el contenido vuelva a depositarse en el fondo y guardarlas en hielo.
- Descongelar las probetas de **CMV Q - PCR Mix** necesarias para la ejecución recordando que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Agitar suavemente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para que el contenido vuelva a depositarse en el fondo y guardarlas en hielo.
- Descongelar la probeta de **CMV - Positive Control** o alternativamente **CMV - ELiTe Positive Control RF** o las probetas de **CMV Q - PCR Standard**. Agitar suavemente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para que el contenido vuelva a depositarse en el fondo y guardarlas en hielo.
- Tomar la **AD-plate** que se utilizará en la ejecución prestando atención a manipularla con guantes y a no dañar los pocillos.

1. Transferir, depositándolos cuidadosamente en el fondo sin que se formen burbujas, **20 µL** de mezcla de reacción **CMV Q - PCR Mix** en los pocillos de la **AD-plate** según se ha descrito anteriormente en la **hoja de trabajo**.

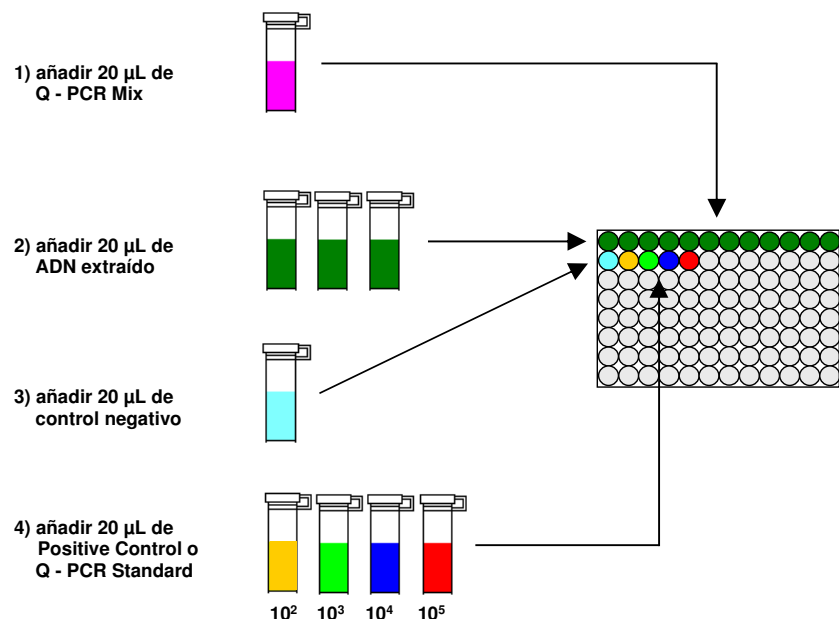
Nota: Si no se usa toda la mezcla de reacción, conservar el volumen sobrante a -20°C en un lugar oscuro durante máximo un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacción máximo **5 VECES**.

2. Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **DNA extraído** de la primera muestra en el correspondiente pocillo de la **AD-plate** según se ha descrito anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** en la mezcla de reacción. Prestar atención a que no se formen burbujas. Proceder de la misma manera con todos los demás **ADN extraídos**.

- Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **agua de grado molecular para biología** (no incluida en el producto) en el casquillo de la **AD-plate** del control negativo de amplificación, según se ha descrito anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando tres veces el **agua de grado molecular para biología** en la mezcla de reacción. Prestar atención a que no se formen burbujas.
- Dependiendo del tipo de resultado solicitado (cualitativo o cuantitativo), siga una de las dos opciones:
 - Cuando se requiere un resultado **cualitativo** del análisis (detección de ADN de CMV): transferir, depositarlos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **CMV – Positive Control** o alternativamente **CMV - ELITe Positive Control RF** en el pocillo correspondiente de la placa AD como se estableció previamente en el **hoja de trabajo**. Mezcle bien el control positivo pipeteando el **CMV – Positive Control** tres veces en la mezcla de reacción. Ten cuidado de no crear burbujas.
 - Cuando se requiere un resultado **cuantitativo** del análisis (cuantificación del ADN del CMV): transferir, depositarlos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **CMV Q - PCR Standard 10²** en el pocillo correspondiente de la placa de AD como se estableció previamente en la **hoja de trabajo**. Mezcle el pocillo estándar pipeteando **CMV Q - PCR Standard 10²** tres veces en la mezcla de reacción. Ten cuidado de no crear burbujas. Proceder de la misma manera con los **CMV Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.
- Sellar cuidadosamente la **AD-plate** con el **Sealing Film**.
- Transferir la **AD-plate** al termociclador para tiempo real en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación y dar inicio al ciclo térmico de amplificación guardando la configuración de la ejecución con una identificación unívoca y reconocible (p. ej. «año-mes-día-CMV-EGSpA»).

Nota: Al terminar el ciclo térmico, retirar del equipo la **AD-plate** con los productos de reacción y desecharla sin que se produzcan contaminaciones ambientales. **No levantar bajo ninguna circunstancia el Sealing Film de la Amplification microplate** para evitar que los productos de reacción se salgan.

En la figura que se muestra a continuación se ilustra de forma sintética el procedimiento de preparación de las reacciones de amplificación.



Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica para CMV (detector «CMV») y por la sonda específica para el control interno (detector «C1») en las reacciones de amplificación deben ser analizadas por el software del equipo.

Seleccionar el grupo de muestras en las cuales aplicar el análisis.

Antes de realizar el análisis, haciendo referencia a la documentación del equipo, es necesario:

- configurar manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) el intervalo de cálculo del **Nivel de fluorescencia de fondo (Background)** del ciclo 2 al ciclo 6

Para muestras de **plasma y orina**:

- ajustar manualmente el **Threshold** y **Noiseband** para el detector FAM "CMV" a **0,55**;
- ajustar manualmente el **Threshold** y **Noiseband** del detector "IC" del CIV a **1,2**.

Para muestras de **sangre entera**:

- ajustar manualmente el **Threshold** y **Noiseband** para el detector FAM "CMV" a **0,80**;
- ajustar manualmente el **Threshold** y **Noiseband** del detector "IC" del CIV a **1,5**.

Los valores de fluorescencia emitidos por las sondas específicas en la reacción de amplificación y el valor **Umbral** de fluorescencia se utilizan para determinar el **Ciclo de umbral (Ct, Threshold cycle)**; es decir, el ciclo en el que se ha alcanzado el valor **Umbral** de fluorescencia.

Los valores de **Ct** para el CMV en las reacciones de amplificación de los cuatro **Q - PCR Standard** se utilizan para calcular la **Standard Curve** (Results > Standard Curve) de esa sesión de amplificación y para validar la amplificación y la detección como se muestra en la siguiente tabla:

Reacción Q - PCR Standard 10 ⁵ detector «CMV»	Resultado del ensayo	Amplificación / Detección
Ct ≤ 25	POSITIVO	CORRECTO

Standard Curve detector "CMV"	Rango de aceptación	Amplificación / Detección
Correlation Coefficient (R2)	0.99 ≤ R2 ≤ 1.0	CORRECTO

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Q - PCR Standard 10⁵** es **Ct > 25** o **Ct no determinado (Undetermined)**, el ADN objetivo no se detectó correctamente. Hubo problemas en la fase de amplificación o detección (dispensación incorrecta de la mezcla de reacción o estándares, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico) que puede causar resultados. no es correcto La sesión no es válida y debe repetirse por la fase de amplificación.

En la reacción de amplificación del **control negativo**, el valor de **Ct** para CMV (Results > Report) se utiliza para convalidar la amplificación y la detección, como se describe en la siguiente tabla:

Reacción Control negativo detector «CMV»	Resultado del ensayo	Amplificación / Detección
Ct no determinado	NEGATIVO	CORRECTO

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Control negativo** es diferente de **Ct No determinado (Undetermined)** para CMV, se habrá detectado la presencia de ADN diana. Se han presentado problemas durante el paso de amplificación (contaminación) que pueden determinar resultados incorrectos y falsos positivos. La ejecución no es válida y debe repetirse desde el paso de amplificación.

En las reacciones de amplificación de cada **muestra**, el valor de **Ct** para CMV se utiliza para detectar la presencia de ADN diana, mientras que el valor de **Ct** para el control interno se utiliza para convalidar la extracción, la amplificación y la detección.

Nota: Comprobar en el software del equipo (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) que el **Ct** se haya determinado mediante un aumento rápido y regular de la fluorescencia y no mediante fenómenos de pico o aumento gradual de la señal de fondo (fondo irregular o elevado).

Los resultados de Ct de las reacciones de amplificación de cada muestra (Results > Report) se utilizan como se describe en la siguiente tabla:

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	DNA de CMV
detector «CMV»	detector «Ct»			
Ct no determinado	Ct > 35 o Ct no determinado	no idóneo	no válido	-
	Ct ≤ 35	idóneo	válido, negativo	NO DETECTADO
Ct determinado	Ct > 35 o Ct no determinado	idóneo	válido, positivo	DETECTADO
	Ct ≤ 35	idóneo	válido, positivo	DETECTADO

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es Ct no determinado para CMV y Ct > 35 o Ct no determinado para el control interno, no ha sido posible detectar de manera eficiente el ADN del control interno. En este caso se ha producido problemas en el paso de amplificación (amplificación no eficiente o nula) o en el paso de extracción (degradación del ADN de la muestra, muestra con número de células insuficientes, pérdida del ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el ADN extraído) que pueden dar lugar a resultados erróneos y a falsos negativos. La muestra no es apta, el ensayo no es válido y deberá repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es Ct no determinado para CMV y Ct ≤ 35 para el control interno, el ADN de CMV no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra pero no se puede descartar que el ADN de CMV esté presente a un título inferior en el límite de detección del producto (véanse las características de las prestaciones). En este caso el resultado sería un falso negativo.

Los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de los demás exámenes de laboratorio del paciente.

Nota: Cuando en la reacción de amplificación inherente a una muestra se ha detectado la presencia de ADN de CMV, la amplificación del control interno puede dar como resultado un Ct > 35 o Ct no determinado. De hecho, la reacción de amplificación de baja eficiencia del control interno puede verse anulada por la competición con la reacción de amplificación de alta eficiencia de CMV. En este caso la muestra es apta de todas formas y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis cuantitativo de los resultados

Después de efectuar el procedimiento de análisis cualitativo se puede realizar el análisis cuantitativo de los resultados de las muestras positivas.

Si el resultado de la reacción de amplificación del Q - PCR Standard 10⁵ es Ct > 25 o Ct No determinado (Undetermined) o los valores de Ct en las reacciones de amplificación de los cuatro Q - PCR standard no se colocan regularmente en la línea estándar, el ADN diana no se habrá detectado correctamente. Se han presentado problemas en el paso de amplificación o de detección (suministro incorrecto de la mezcla de reacción o de los estándares, degradación de la mezcla de reacción o de los estándares, configuración incorrecta de la posición de los estándares, configuración incorrecta del ciclo térmico), que pueden dar lugar a resultados incorrectos. La ejecución no es válida y debe repetirse desde el paso de amplificación.

Los valores de Ct para CMV en las reacciones de amplificación de cada muestra y la Curva estándar (Standard Curve, Results > Standard Curve) de la ejecución de amplificación se utilizan para calcular la Cantidad (Quantity) de ADN diana presente en las reacciones de amplificación inherentes a las muestras.

Este producto tiene la capacidad de cuantificar de 1.000.000 a aproximadamente 10 genomas equivalentes por reacción, de 25.000.000 a 250 genomas equivalentes por mL de sangre entera usando el sistema de extracción MagNA Pure 24 (véanse las Características de las prestaciones), tal y como se describe en la siguiente tabla:

Resultado de la muestra detector FAM «CMV»	genomas equivalentes de CMV por reacción
Cantidad > 1 x 10 ⁶	SUPERIORES A 1.000.000
1,0 x 10 ¹ ≤ Cantidad ≤ 1 x 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad < 1,0 x 10 ¹	INFERIORES A 10

Los resultados (Cantidad) inherentes a cada muestra (Results > Report) se utilizan para calcular los genomas equivalentes (gEq) de CMV presentes en la muestra original (Nc) conforme a la siguiente fórmula:

$$Nc = \frac{Ve \times Cantidad}{Vc \times Va \times Ep}$$

En donde:

Vc es la cantidad de la muestra empleada en la extracción con relación a la unidad de medida requerida;

Ep es la eficiencia del procedimiento, extracción y amplificación expresada en decimales,

Ve es el volumen total obtenido de la extracción expresado en µL;

Va es el volumen del producto de extracción usado en la reacción de amplificación expresado en µL;

Cantidad es el resultado de la reacción de amplificación inherente a la muestra expresada en gEq por reacción.

Quando se utilizan muestras de sangre entera y plasma recolectadas en EDTA y orina y el sistema de extracción MagNA Pure 24 y se desea obtener el resultado expresado en gEq / mL, la fórmula resulta:

Fórmula simplificada para sangre entera, plasma y orina y MagNA Pure 24
$Nc \text{ (gEq / mL)} = 25 \times \text{Cantidad}$

Conversión de resultados a unidades internacionales

Quando se utilizan muestras de sangre entera recogidas en EDTA y MagNA Pure 24 y se requiere el resultado en IU / mL, la fórmula se convierte:

Fórmula simplificada para sangre entera y MagNA Pure 24
$Fc = 0,5 \text{ IU / gEq}$
$Nc \text{ (IU / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (IU / mL)} = 12,5 \times \text{Quantity}$

Quando las muestras de plasma recogidas en EDTA y MagNA Pure 24 se utilizan y el resultado se requiere en IU / mL, la fórmula se convierte:

Fórmula simplificada para plasma y MagNA Pure 24
$Fc = 0,4 \text{ IU / gEq}$
$Nc \text{ (IU / mL)} = Nc \text{ (gEq / mL)} \times Fc$
$Nc \text{ (IU / mL)} = 10 \times \text{Quantity}$

Cuando las muestras de orina y **MagNA Pure 24** se utilizan y el resultado se requiere en IU / mL, la fórmula se convierte:

Fórmula simplificada para orina y MagNA Pure 24	
Fc = 1,1 IU / gEq	
Nc (IU / mL) = Nc (gEq / mL) x Fc	
Nc (IU / mL) = 27.5 x Quantity	

Donde **Fc** es el factor de conversión calculado utilizando el material calibrado de referencia aprobado por la OMS "1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification (NAT) Techniques", código NIBSC 09/162, Reino Unido (véase el párrafo Características de funcionamiento).

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES

Sensibilidad analítica: límite de detección

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección, permite detectar la presencia de unas 10 copias en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección, se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a una concentración de 10 copias/20 µL en 150.000 copias de globina beta/20 µL. Esta muestra se utilizó en 27 duplicados realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias de ADN plasmídico + 150.000 copias de globina beta	27	26	1

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de sangre y el **MagNA Pure 24** se verificó con un panel de diluciones de CMV dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel comprendió seis puntos en torno a la concentración límite. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando la extracción con el sistema automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

En las siguientes tablas se indican los resultados finales de cada matriz.

Límite de detección con el MagNA Pure 24 (UI/mL)			
Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Sangre	135 UI/mL	84 UI/mL	354 UI/mL
Plasma	88 UI/mL	54 UI/mL	279 UI/mL
Orina	296 UI/mL	174 UI/mL	851 UI/mL

La sensibilidad analítica expresada en gEq/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 66.

La sensibilidad analítica expresada en gEq/mL se indica a continuación.

Límite de detección con el MagNA Pure 24 (gEq/mL)			
Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Sangre	270 gEq/mL	168 gEq/mL	708 gEq/mL
Plasma	220 gEq/mL	108 gEq/mL	698 gEq/mL
Orina	269 gEq/mL	158 gEq/mL	774 gEq/mL

Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

La sensibilidad analítica de este ensayo, como rango de medición lineal, permite cuantificar de unas 1.000.000 a 10 equivalentes genómicos en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de este ensayo se evaluó utilizando un panel de diluciones (1 log₁₀ entre una dilución y la siguiente) de ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación, con una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. Los puntos del panel de 10⁷ moléculas por reacción a 10¹ moléculas por reacción se utilizaron en 9 duplicados para realizar la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal para todos los puntos del panel (coeficiente de correlación lineal superior a 0,99).

El límite inferior del rango de medición lineal se estableció en 10 gEq/reacción dentro de un logaritmo a partir de la concentración más baja del estándar de amplificación Q-PCR (10² gEq/20 µL).

El límite superior del rango de medición lineal se estableció en 10⁶ gEq/reacción dentro de un logaritmo a partir de la concentración más alta del estándar de amplificación Q-PCR (10⁵ gEq/20 µL).

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Rango de medición lineal utilizando el MagNA Pure 24		
	Límite inferior	Límite superior
gEq/mL	250	25.000.000
gEq/reacción	10	1.000.000

Las conversiones de gEq/mL a gEq/reacción y viceversa se calcularon tal como se muestra en la página 60.

La linealidad de este ensayo utilizado en asociación con diferentes matrices y el **MagNA Pure 24** se verificó con un panel de diluciones de CMV. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de CMV. El panel constaba de cinco puntos de dilución (1 log₁₀ de pasos de dilución) de 10⁶ UI/mL a 10² UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en cuatro duplicados realizando la extracción con el sistema automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal para todas las diluciones por encima del LoD.

Límite de cuantificación

El límite inferior del rango de medición lineal se configuró a la concentración más baja que da un 100 % de posibilidades de positividad y resultados cuantitativos suficientemente exactos y precisos. El límite superior del rango de medición lineal se estableció a la concentración más alta analizada que da resultados cuantitativos suficientemente exactos y precisos.

El rango de medición lineal expresado en gEq/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 66.

En las siguientes tablas se indican los resultados de cada matriz.

Rango de medición lineal para muestras de sangre y el MagNA Pure 24		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	178	1.000.000
gEq/mL	356	2.000.000

Rango de medición lineal para muestras de plasma y el MagNA Pure 24

Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	100	1.000.000
gEq/mL	250	2.500.000

Rango de medición lineal para muestras de orina y el MagNA Pure 24

Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	1000	1.000.000
gEq/mL	909	909.091

Sensibilidad analítica: precisión y exactitud

La precisión de este ensayo, en términos de la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando diferentes duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual (%CV) máximo de los valores de Ct inferior al 1,36 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La precisión de este ensayo, en términos de la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual medio (%CV) de las cantidades medidas de alrededor del 12,5 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La exactitud de este ensayo, en términos de la diferencia entre la media de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra y el valor de concentración teórico de la muestra, permitió obtener un porcentaje de inexactitud media de la cantidad logarítmica medida de alrededor del 2,2 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La precisión y la exactitud se determinaron utilizando los datos obtenidos durante los experimentos evaluando el rango de medición lineal.

Reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «AcroMetrix® CMV_{ic} Panel» (Acrometrix, Life Technologies, US). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando la extracción con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el **MagNA Pure 24** y el plasma y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el MagNA Pure 24				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log UI/mL	Positivos/Duplicados	Media de resultados log UI/mL
ADN de CMV 3E6	3.000.000	6,477	2/2	6,299
ADN de CMV 3E5	300.000	5,477	2/2	5,280
ADN de CMV 3E4	30.000	4,477	2/2	4,298
ADN de CMV 3E3	3.000	3,477	2/2	3,364
ADN de CMV 3E2	300	2,477	2/2	2,262

Todas las muestras se detectaron como positivas, con un título que estaba dentro del valor esperado de ±0,5 log.

Factor de conversión a unidades internacionales

El factor de conversión que debe utilizarse con este ensayo para transformar el resultado cuantitativo de gEq/mL en unidades internacionales/mL se determinó utilizando un panel de material de referencia calibrado aprobado por la OMS, a saber, el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en las diferentes matrices negativas para ADN de CMV y junto con el **MagNA Pure 24**. El panel tenía 6 pasos de dilución de 1 log. Cada punto del panel se analizó en 16 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a **0,5 unidades internacionales (UI) por gEq de CMV detectado con muestras de sangre.**

En la siguiente tabla se muestran los resultados de cada matriz.

Conversión a unidades internacionales con sangre y el «MagNA Pure» (Fc: 0,5 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
111.055	5,046	197.188	98.594	4,991
34.903	4,543	73.891	36.945	4,556
10.970	4,040	23.428	11.714	4,050
3.448	3,538	8.863	4.431	3,605
1.084	3,035	2.963	1.481	3,136
341	2,532	995	497	2,638

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a **0,4 unidades internacionales (UI) por gEq de CMV detectado con muestras de plasma.**

En la siguiente tabla se muestran los resultados de cada matriz.

Conversión a unidades internacionales con plasma y el «MagNA Pure» (Fc: 0,4 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
111.055	5,046	235.469	94.188	4,969
34.903	4,543	89.375	35.750	4,548
10.970	4,040	25.950	10.380	4,008
3.448	3,538	9.683	3.873	3,576
1.084	3,035	3.189	1.276	3,086
341	2,532	910	364	2,526

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a **1,1 unidades internacionales (UI) por gEq de CMV detectado con muestras de orina.**

En la siguiente tabla se muestran los resultados de cada matriz.

Conversión a unidades internacionales con orina y el «MagNA Pure» (Fc: 1,1 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
316.228	5,500	217.719	242.110	5,379
100.000	5,000	91.719	100.891	4,995
31.623	4,500	33.484	36.833	4,557
10.000	4,000	10.550	11.605	4,053
3.162	3,500	3.434	3.777	3,565
1.000	3,000	1.050	1.155	3,054

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 51 muestras de sangre recogidas en EDTA que eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real), 63 muestras de plasma recogidas en EDTA que eran positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real), 6 muestras de orina positivas para ADN de CMV (analizadas con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real) y 45 muestras de orina negativas para ADN de CMV DNA que se enriquecieron con ADN de CMV añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del citomegalovirus humano» (código NIBSC 09/162, Reino Unido).

Cada muestra se utilizó realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de CMV	51	51	0
Plasma recogido en EDTA y positivo para ADN de CMV	63	62	1
Orina positiva para ADN de CMV	6	6	0
Orina enriquecida para ADN de CMV	45	44	1

Todas las muestras fueron válidas en el primer análisis.

Todas las muestras de sangre se confirmaron como positivas para ADN de CMV. La sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de sangre fue del 100 %.

62 de 63 muestras de plasma se confirmaron como positivas para ADN de CMV, mientras que una muestra presentó un resultado negativo, diferente del resto. La sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de plasma fue del 98 %.

Todas las muestras de orina clínicas se confirmaron como positivas para ADN de CMV.

Una muestra de orina enriquecida mostró un resultado negativo, diferente del resto, cuando se utilizaron productos de ELITechGroup S.p.A. Una explicación de esta diferencia puede ser un error de preparación por parte del operario.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de orina fue del 98 %.

La sensibilidad diagnóstica total del ensayo fue del 98,8 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 53 muestras de sangre recogidas en EDTA y supuestamente negativas para ADN del CMV, 50 muestras de plasma recogidas en EDTA y supuestamente negativas para ADN de CMV y 49 muestras de orina supuestamente negativas para ADN de CMV

Cada muestra se utilizó realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA y supuestamente negativa para ADN de CMV	53	1	52
Plasma recogido en EDTA y supuestamente negativo para ADN de CMV	50	2	48
Orina supuestamente negativa para ADN de CMV	49	0	49

Todas las muestras de sangre fueron válidas y 52 de 53 muestras de sangre se confirmaron como negativas al ADN de CMV, mientras que dos muestras dieron un resultado positivo, diferente del resto. La especificidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de sangre fue del 98 %.

49 de 50 muestras de plasma fueron válidas en el primer análisis, mientras que una muestra no válida mostró un resultado negativo después de la reamplificación. 48 de 50 muestras de plasma se confirmaron como negativas para ADN de CMV, mientras que dos muestras presentaron un resultado positivo, diferente del resto. La especificidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de plasma fue del 96 %.

Todas las muestras de orina fueron válidas en el primer análisis y se confirmaron como negativas para ADN de CMV. La especificidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de orina fue del 100 %.

La especificidad diagnóstica total del ensayo fue del 98 %.

Nota: Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se recogen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «CMV ELITe MGB®Kit», FTP RTK015PLD.

BIBLIOGRAFÍA

T. E. Fenner et al. (1991) *J Clin Microbiology* 29: 2621 - 2622
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar con este producto sólo el ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: sangre entera recolectada con EDTA, plasma extraído con EDTA, líquido cefalorraquídeo, orina.

No utilizar con este producto el ADN extraído de muestras heparinizadas: la heparina inhibe la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos y produce resultados no válidos.

No utilizar con este producto ADN extraído contaminado por hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol o 2-propanol: estas sustancias inhiben la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos y pueden causar resultados no válidos.

No utilizar con este producto ADN extraído que contenga elevadas cantidades de ADN genómico humano que puedan inhibir la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos.

No hay datos disponibles referidos a las prestaciones de este producto con el ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: sospecciones de leucocitos, suspensiones de granulocitos, líquido amniótico, saliva.

No hay datos disponibles referidos a eventuales fenómenos de inhibición por parte de fármacos antibióticos, antivirales, quimioterápicos o inmunosupresores.

Los resultados obtenidos con este producto dependen de la correcta identificación, recolección, transporte, conservación y preparación de las muestras; para evitar resultados erróneos es necesario tener una particular atención a estas fases y seguir atentamente las instrucciones provistas con los productos para la extracción de los ácidos nucleicos.

La metodología de amplificación real time de los ácidos nucleicos utilizada en este producto, debido a su alta sensibilidad analítica, está sujeta a contaminación por parte de muestras clínicas positivas para CMV, de los controles positivos y de los mismos productos de la reacción de amplificación. Las contaminaciones llevan a resultados falsos positivos. Las modalidades de realización del producto son capaces de reducir las contaminaciones; sin embargo, estos fenómenos pueden evitarse sólo con una buena práctica de las técnicas de laboratorio y siguiendo atentamente las instrucciones provistas en este manual.

Este producto requiere personal competente e instruido para la manipulación de muestras biológicas capaces de transmitir infecciones y de preparados químicos clasificados como peligrosos, para evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario u otras personas.

Este producto requiere instrumental y áreas de trabajo adecuadas para la manipulación de muestras biológicas capaces de transmitir infecciones y de preparados químicos clasificados como peligrosos, para evitar accidentes con consecuencias potencialmente graves para el usuario u otras personas.

Este producto requiere personal competente e instruido para los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos para evitar resultados incorrectos.

Este producto requiere áreas separadas para la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de los productos de amplificación para evitar resultados falsos positivos.

Este producto requiere el uso de instrumental y de instrumentos destinados a la extracción / preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación / detección de los productos de amplificación para evitar resultados falsos positivos.

Debido a las diferencias intrínsecas en las diferentes tecnologías, se recomienda realizar estudios de correlación para estimar estas diferencias antes de pasar a un producto nuevo.

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN de CMV no ha sido detectado en el ADN extraído de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de CMV esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (ver Características de las prestaciones en la página); en este caso el resultado sería un falso negativo.

Un resultado no válido obtenido con este producto indica que no se ha podido detectar de modo eficiente el ADN del Control Interno; en este caso se deberá repetir el análisis de la muestra a partir de la extracción con posibles retrasos en la obtención del resultado.

Los posibles polimorfismos en la región del genoma viral en los cuales hibridan los oligonucleótidos

primers y la sonda del producto podrían perjudicar la detección y cuantificación del ADN de CMV. Como para cualquier otro dispositivo de diagnóstico, los resultados obtenidos con este producto deben ser interpretados considerando todos los datos clínicos y otros exámenes de laboratorio correspondientes al paciente.

Como para cualquier otro dispositivo de diagnóstico, existe un riesgo latente de obtener resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos con este producto. Dicho riesgo latente no puede ser eliminado ni reducido ulteriormente. Este riesgo latente en situaciones particulares, como los diagnósticos prenatales y de urgencia, puede contribuir a decisiones incorrectas con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ADN blanco no detectado en la reacción dos Q - PCR Standard o Coeficiente de correlación de la Curva estándar no válido	
Causas posibles	Soluciones
Error en la dispensación de la microplaca.	Dispensar cuidadosamente los reactivos en la microplaca siguiendo el plan de trabajo. Controlar los volúmenes de mezcla de reacción dispensados. Controlar los volúmenes dos estándar distribuidos.
Configuración incorrecta de la sesión en ELITe InGenius y ELITe BeGenius	Compruebe la posición de la mezcla de reacción, el control positivo o los estándares. Compruebe los volúmenes de la mezcla de reacción, el control positivo o los estándares.
Degradación de la sonda.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de amplificación.
Degradación del control positivo o estándar.	Utilizar una nueva alícuota de estándar.
Error en la programación del equipo.	Controlar la posición de las reacciones del estándar programada en el equipo. Controlar el ciclo térmico programado en el equipo.

ADN blanco detectado en la reacción de Control negativo	
Causas posibles	Soluciones
Error en la dispensación de la microplaca.	Evitar esparcir el contenido de las probetas de las muestras. Cambiar siempre el tip entre una muestra y la otra. Dispensar cuidadosamente muestras, control negativo y estándar en la microplaca siguiendo el plan de trabajo.
Configuración incorrecta de la sesión en ELITe InGenius y ELITe BeGenius	Compruebe la posición de la mezcla de reacción o del control negativo. Compruebe los volúmenes de la mezcla de reacción o del control negativo.
Error durante la programación del equipo.	Controlar la posición de muestras, control negativo y estándar programada en el equipo.
Microplaca mal cerrada.	Cerrar con cuidado la microplaca.
Contaminación del agua bidestilada estéril.	Utilizar una nueva alícuota de agua estéril.
Contaminación de la mezcla de amplificación.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de amplificación.
Contaminación del área de extracción / preparación de las reacciones de amplificación.	Limpiar superficies e instrumentos con detergentes acuosos, lavar batas, sustituir probetas y tips en uso.

Presencia de fluorescencia de fondo irregular o elevada en las reacciones	
Causas posibles	Soluciones
Error en la dispensación de la muestra.	Mezclar cuidadosamente, pipeteando tres veces, muestras, control negativo y estándar en la mezcla de reacción. Evitar crear burbujas.
Error en la programación de la "baseline".	Programar el intervalo de cálculo de "baseline" en una zona de ciclos en la cual la fluorescencia de fondo ya se encuentre estabilizada (controlar los registros "Results", "Component") y que la fluorescencia de la señal no haya comenzado a crecer todavía, por ejemplo del ciclo 6 al ciclo 15. Programar el cálculo automático de la "baseline" seleccionando la opción "autobaseline".

Presencia de curva de disociación anómala	
Causas posibles	Soluciones
Ausencia de un pico definido. Pico definido pero diferente del de otras muestras y de los estándares.	Controlar que el Ct del detector FAM sea inferior a 30. Cantidades elevadas de producto de amplificación presentes al finalizar la reacción pueden interferir en el análisis de la curva de disociación. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia de un ADN blanco con una posible mutación. Para confirmar la presencia de una mutación, se debería secuenciar el ADN blanco presente en la muestra.

Error 30103 on ELITe InGenius	
Causas posibles	Soluciones
Concentración demasiado alta del objetivo en la muestra.	Si se observa una amplificación significativa en el gráfico de la PCR - repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua de grado de biología molecular de la muestra eluida en una sesión "Sólo PCR" o - repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua de grado de biología molecular de la muestra en una sesión de "Extracción + PCR".

SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS

REF

Número de catálogo.



Límite superior de temperatura.

LOT

Código de lote.



Utilizar antes del último día del mes.

IVD

Dispositivo médico diagnóstico *in vitro*.



Conforme a los requisitos de la Directiva Europea 98\79\CE correspondiente a los dispositivos médicos diagnósticos *in vitro*. Certificación otorgada por DEKRA Certification B.V., the Netherlands.



Contenido suficiente para "N" test.



Atención, consultar las instrucciones de uso.

CONT

Contenido.



Mantener alejado de la luz solar.



Fabricante.

AVISO AL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto contiene los reactivos con licencia de LTC.

Este producto se vende sobre la base del contrato de licencia entre ELITechGroup® Inc. Molecular Diagnostics y sus afiliados y LTC, Inc. El precio de compra de este producto incluye los derechos - limitados y no transferibles - de usar esta cantidad de producto, únicamente para las actividades del comprador que sean directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre la adquisición de una licencia de este producto para fines diferentes a los definidos anteriormente, por favor comuníquese con el Departamento de Licencias de Life Technologies, Inc., 5791 Val Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Teléfono: +1(760)603-7200. Fax: +1(760)602-6500. Correo electrónico: outlicensing@LTC.com..

Los reactivos de detección ELITE MGB® están cubiertos por una o más patentes U.S. número 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,969,003, RE 38,416 RE 38,416 y de las patentes EP 0819133, 1068358, 1144429, 1232157, 1235938, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939, así como de solicitud de patentes que están actualmente pendientes.

Esta licencia limitada permite a la persona o entidad legal a la cual se proporcionó este producto, de usar el producto y los datos generados por el uso del producto, sólo para el diagnóstico humano. Ni ELITechGroup S.p.A., ni sus licenciadores conceden cualquier otra licencia, explícita o implícita para cualquier otro propósito.

ELITE MGB® y el logotipo ELITE MGB® están registrados como marcas comerciales en la Unión Europea.

ELITE InGenius® y ELITE BeGenius® son marcas registradas de ELITechGroup

«NucliSENS® easyMAG®» son marcas registradas de bioMérieux.

«QIASymphony®» es una marca registrada de QIAGEN.

«Ficoll®» es una marca registrada de GE Healthcare.

MagNA Pure es una marca de Roche.

CMV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The «**CMV ELITE MGB® Kit**» product is a **qualitative** and **quantitative** nucleic acids amplification assay for the detection and quantification of the DNA of Human Cytomegalovirus (CMV) in DNA samples extracted from whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA, cerebrospinal fluid (CSF), urine, buccal swab, amniotic fluid and bronchoalveolar lavage (BAL) / bronchial aspirate (BA).

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of CMV infections, alongside patient clinical data and other laboratory test outcomes.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Whole Blood EDTA and Plasma EDTA** and the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA** and the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
Internal Control	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, Cerebrospinal Fluid, Urine, Buccal swab, Amniotic fluid, BAL, BA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030	›	CMV - ELITE Positive Control: CTR015PLD
ELITE BeGenius instrument: INT040	›	CMV ELITE Standard: STD015PLD
ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200	›	ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR	›	300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S (for INT030)
ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS	›	1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 (for INT040)
CPE – Internal Control: CTCRPE		

F. ELITE InGenius protocol

- › Sample volume 200 µL
- › CPE Internal Control volume 10 µL
- › Total eluate volume 100 µL
- › PCR eluate input volume 20 µL
- › CMV Q-PCR Mix volume 20 µL
- › Unit of quantitative result International Unit: IU/mL genome equivalent: gEq/mL (equivalent to copies/mL)
- › Frequency of controls 15 days
- › Frequency of calibration 60 days

G. ELITE InGenius/ELITE BeGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	109 IU/mL – 156 gEq/mL	100% 60/60*	93% 55/59*
Plasma	88 IU/mL – 293gEq/mL	100% 54/54*	98% 57/58*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Whole Blood	254 – 1.4x10 ⁸	178 – 1 x10 ⁸	0.7
Plasma	293 – 3.3x10 ⁸	88 – 1 x10 ⁸	0.3

H. ELITe InGenius Performances

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Cerebrospinal fluid	58 IU/mL – 193 gEq/mL	100% 20/20*	100% 20/20*
Urine	151 IU/mL – 216 gEq/mL	100% 31/31*	100% 54/54*
Buccal swab	44 IU/mL – 220 gEq/mL	100% 50/50*	96% 50/52*
Amniotic fluid	57 IU/mL – 285 gEq/mL	100% 31/31*	100% 32/32*
BAL / BA	97 IU/mL – 485 gEq/mL	100% 49/49*	100% 49/49*

Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Cerebrospinal fluid	335 – 5x10 ⁷	101 – 1,5 x10 ⁷	0.3
Urine	451 – 5x10 ⁷	316 – 3,5 x10 ⁷	0.7
Buccal swab	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
Amniotic fluid	500 – 5x10 ⁷	100 – 1,0 x10 ⁷	0.2
BAL / BA	890 – 5x10 ⁷	178 – 1,0 x10 ⁷	0.2

H. Reference Material

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
Acrometrix: CMVDNA3E	Thermo-Fisher	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014: CMVDNA14	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log**

*confirmed samples/ tested samples

**within the range of quantification

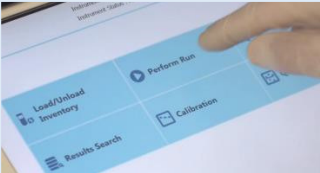
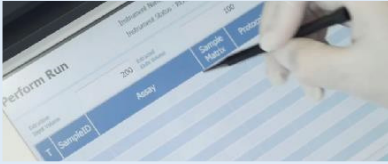

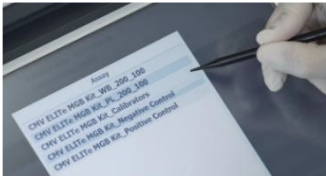


I. ELITe InGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITe InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

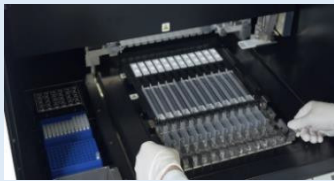
Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
--	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen 	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL" 	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID 
4. Select the "Assay protocol" of interest 	5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube 	6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block 

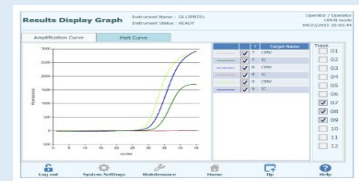
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks



8. Close the door
Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"

6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4

7. Load the PCR cassette rack
Load the Q-PCR Mix in the inventory block

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position :
Primary tube or Secondary tube

6. Load the CPE Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

ELITE BeGenius Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

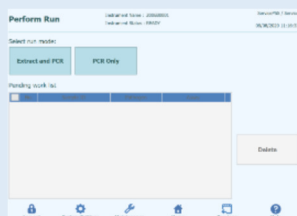
1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"

2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired

3. Thaw the CMV Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

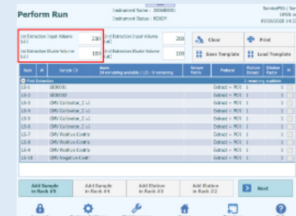
1. Select "Perform Run" on the touch screen



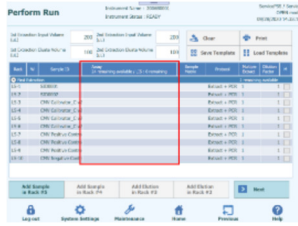
2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active



3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

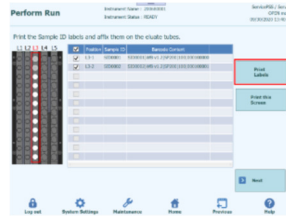


4. Select the "Assay protocol" of interest



Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area



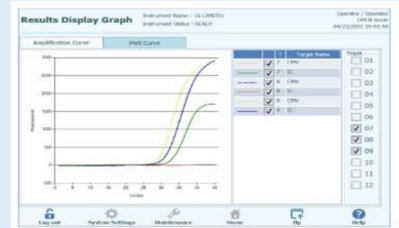
7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack



8. Close the door Start the run



9. View, approve and store the results



Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»

4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack

2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

5. Close the door.
Start the run

3. Select the "Assay protocol" of interest

6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

7. Load: Filter Tips and the Extraction Rack

5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.

8. Close the door
Start the run

6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area

9. Archive the eluate sample

CMV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

ELITE InGenius® SP 1000

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The CMV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**.
The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius®**.

B. Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target	CMV MIEA gene (exon 4 region)	FAM
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Plasma EDTA

D. Kit component

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

ELITE InGenius instrument: INT030

ELITE InGenius SP1000 Extraction Cartridge:
INT033SP1000

ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR

ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS

CPE – Internal Control: CTCRCPE

- › **CMV ELITE Positive Control:** CTR015PLD
- › **CMV ELITE Standard:** STD015PLD
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

› Sample volume	1000 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL genome equivalent:
› CPE Internal Control volume	10 µL		gEq/mL (equivalent to
› Total eluate volume	100 µL		copies/mL) 15 days
› PCR eluate input volume	20 µL	› Frequency of controls	
› CMV Q-PCR Mix volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma	17 IU/mL – 57 gEq/mL	97% 58/60*	95% 54/57*
			<small>*confirmed samples/ tested samples</small>
Matrix	Linearity (gEq/mL)	Linearity (IU/mL)	CF gEq/mL to IU/mL
Plasma	593 – 5x10⁶	178 – 1,5 x10⁷	0.3

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
Molecular Q Panel: CMVMQP01	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2017: CMVDNA17-S	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 0.5 log**
		<small>*confirmed samples/ tested samples</small>	<small>**within the range of quantification</small>

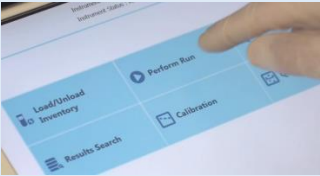
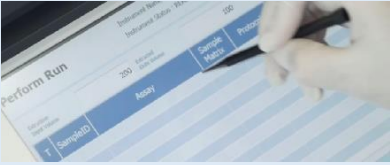

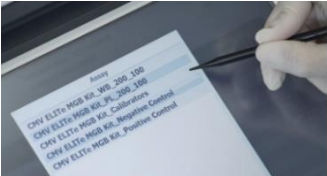

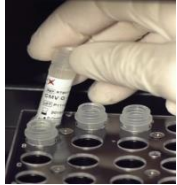



I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: CMV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: CMV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the CMV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

<p>1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p>	<p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p>
<p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

CMV ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› **Whole blood EDTA** › **Plasma EDTA** › **Cerebrospinal fluid** › **Urine**

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument › ELITE STAR: INT010 › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX › ELITE GALAXY: INT020 › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › CMV – ELITE Positive Control: CTR015PLD › CMV ELITE Standard: STD015PLD › easyMAG - Generic protocol 2.0.1 › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit › Molecular biology grade water |
|--|---|

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	263 IU/mL - 332 gEq/mL	100% (57/60)*	100% (63/70)*
	Plasma	222 IU/mL - 201 gEq/mL	97.1% (66/68)*	100% (61/61)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	127 IU/mL - 249 gEq/mL	98.3% (59/60)*	100% (65/66)*
	Plasma	140 IU/mL - 519 gEq/mL	92.2% (47/51)*	100% (64/64)*
easyMAG - ABI	Whole blood	-	100% (50/50)*	100% (50/50)*
	Cerebrospinal fluid	-	100% (60/60)*	100% (60/60)*
	Urine	-	100% (52/52)*	98.2% (55/56)*
QIASymphony - ABI	Whole blood	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*
	Plasma	-	100% (60/60)*	98.3% (59/60)*

*confirmed samples/tested samples

System	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
ELITE STAR - ABI	221 → 22 x 10 ⁶ (WB), 308 → 30.8 x 10 ⁶ (PL)	28 (WB,PL)	0.79 (WB), 1.10 (PL)
ELITE GALAXY - ABI	178 → 17.8 x 10 ⁶ (WB), 105 → 10 x 10 ⁶ (PL)	35 (WB,PL)	0.51 (WB), 0.27 (PL)
easyMAG - ABI	305 → 30.5 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB), 10 (CSF, Urine)	0.61 (WB)
QIASymphony - ABI	110 → 11 x 10 ⁶ (WB), 104 → 10 x 10 ⁶ (PL)	24 (WB), 12 (PL)	0.46 (WB), 0.87 (PL)

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITe Star	WB, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL for 12 samples
ELITe Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	WB	100 µL	-	50 µL	-
	CSF, Urine	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	WB	200 µL	300 µL	60 µL	-
	Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

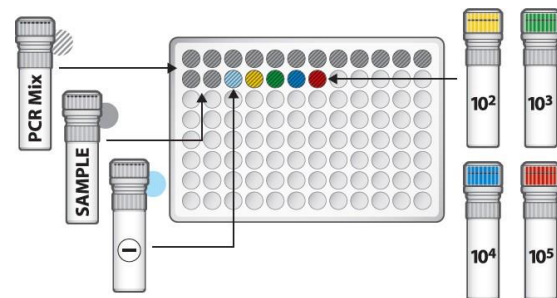
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	20 sec
<i>45 cycles</i>		

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw CMV Q-PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	CMV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

CMV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 100 to 10⁷ gEq/mL.

CMV ELITE MGB® Kit used with Cobas Z 480 PCR instrument

Ref: RTK015PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The CMV ELITE MGB Kit is a Real-Time PCR assay for the detection and quantification of the DNA of **Human Cytomegalovirus (CMV)**. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas Z 480 analyzer** (Roche) and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	CMV MIEA gene (Exon 4 region)	FAM
Internal Control	human beta Globin gene	VIC

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA › Plasma EDTA › Urine

D. Kit Components

CMV Q-PCR Mix

4 tubes of 540 µL



X 4

Ready to use complete reaction mixture
Number of tests per kit: 100
Freeze and thaw cycles per tube: 5
Maximum shelf-life: 24 months
Storage temperature: -20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System
- › CMV – ELITE Positive Control:CTR015PLD
- › CMV – ELITE Positive Control RF:CTR015PLD-R
- › CMV ELITE Standard:STD015PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	135 IU/mL 270 gEq/mL	100% (51/51)*	98% (52/53)*
	Plasma	88 IU/mL - 220 gEq/mL	98% (62/63)*	96% (48/50)*
	Urine	296 IU/mL - 269 gEq/mL	98% (50/51)*	100% (49/49)*

*confirmed samples/tested samples

System	Matrix	Linearity (IU/mL)	Conversion factor gEq/reaction to gEq/mL	Conversion factor gEq/mL to IU/mL
MagNA Pure 24	Whole blood	178 IU/mL -> 10⁶ IU/mL		0.5
	Plasma	100 IU/mL -> 10⁶ IU/mL	25 (WB, PL, Urine)	0.4
	Urine	10³ IU/mL -> 10⁶ IU/mL		1.1

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB PL, Urine	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL Diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "CMV" detector with "FAM" and quencher "465-510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540-580"

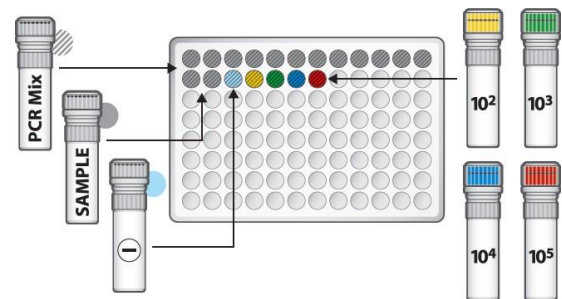
Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

acquisition must be set during hybridation step at 60°C

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw CMV Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	Matrix	CMV FAM	Internal Control VIC
Cobas – Z 480	WB	0.80	1.5
	Plasma	0.55	1.2
	Urine	0.55	1.2

Interpretation - Qualitative results

CMV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The CMV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ gEq/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ gEq/mL.