



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 19/01/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HHV8 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS038PLD

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

- Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040).
- Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS (pag.20):
 - Change in Limit of Detection (LoD)
 - Addition of Linear measuring range
 - Addition of Repeatability
 - Addition of Reproducibility

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



HHV8 ELITE MGB® Kit

reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS038PLD



ÍNDICE

USO PREVISTO	pág. 1
PRINCIPIO DE L' ENSAYO	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® y ELITE BEGENIUS®	pág. 6
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 6
PROCEDIMIENTO ELITE INGENIUS®	pág. 8
PROCEDIMIENTO ELITE BEGENIUS®	pág. 14
CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES ELITE INGENIUS® y ELITE BEGENIUS®	pág. 19
OTROS SISTEMAS	pág. 25
MUESTRAS Y CONTROLES	pág. 25
PROCEDIMIENTO	pág. 27
CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES	pág. 36
BIBLIOGRAFÍA	pág. 40
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	pág. 40
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	pág. 41
SIGNIFICADO DE LOS SÍMBOLOS	pág. 43
AVISO AL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	pág. 44

USO PREVISTO

El producto «HHV8 ELITE MGB® Kit» forma parte de una prueba cualitativa y cuantitativa de amplificación de los ácidos nucleicos para la **detección y cuantificación del ADN del herpesvirus humano 8 (HHV8)** en muestras de ADN extraído de sangre entera recolectada en EDTA, plasma recolectado en EDTA y líquido cefalorraquídeo (líquido).

El producto se utiliza para el diagnóstico y el monitoreo de la infección por HHV8, junto con los datos clínicos del paciente y con los resultados de otros exámenes de laboratorio.

HHV8 ELITE MGB® Kit

reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS038PLD

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

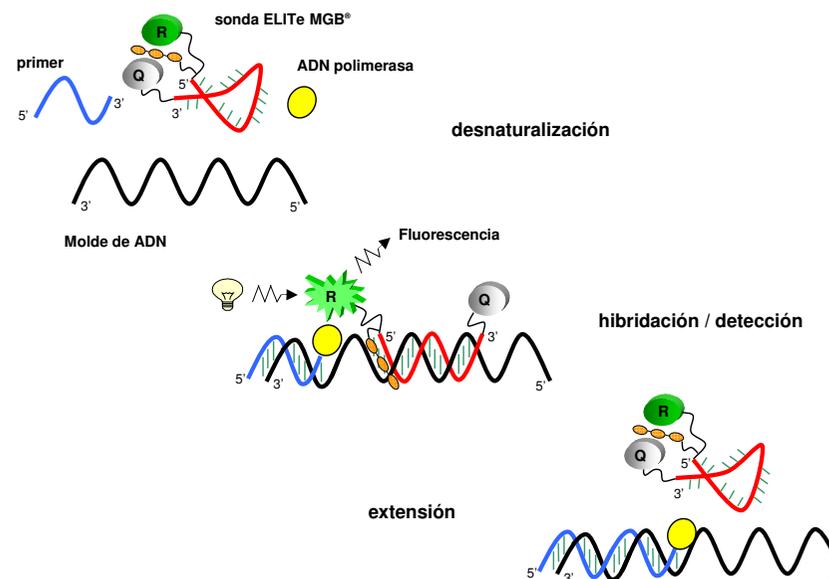
La prueba prevé la realización de una reacción de amplificación real time en microplaca con un termostato programable con sistema óptico de detección de la fluorescencia.

En cada pocillo se realizan dos reacciones de amplificación: una específica para la región del gen que codifica la **minor capsid protein** (ORF 26) de HHV8 y una específica para la región del gen humano que codifica la **beta globina** (Control Interno de inhibición) utilizando el ADN extraído de las muestras en examen. La sonda con tecnología ELITE MGB® específica para HHV8, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación para HHV8. 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 determinar la presencia y el título del ADN de HHV8 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.

La evaluación de l' ensayo ha sido realizada con equipos reportado en este manual.

En la figura presentada a continuación se resume el mecanismo de activación y emisión de la fluorescencia de la sonda con tecnología ELITE MGB®. Notar de qué manera la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación y, por lo tanto, se puede utilizar para el análisis de la curva de disociación.



PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**HHV8 ELITE MGB® Kit**» provee la mezcla de reacción completa y **lista para su uso** HHV8 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 test** en asociación con el sistema «**ELITE InGenius®**» y «**ELITE BeGenius®**» y **25 test** en asociación con otros sistemas.

Los oligonucleótidos primers y la sonda para HHV8, (estabilizada por el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo FAM e inactivada por un quencher no fluorescente), son específicos para una región del gen que codifica la **minor capsid protein** (ORF 26) de HHV8.

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

La mezcla de reacción suministra el tampón, el cloruro de magnesio, los nucleótidos trifosfatos y el fluoróforo AP593, usado en 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 producto permite efectuar **96 determinaciones en asociación con el sistema «ELITE InGenius®»** y «**ELITE BeGenius®**», estándares y controles incluidos.

El producto 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
HHV8 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.

OTROS PRODUCTOS REQUERIDOS

Los reactivos para la extracción del ADN de las muestras a analizar, el control positivo de extracción, las microplacas para la amplificación, el control positivo de amplificación y los ADN estándar de cantidad conocida, **no** están incluidos en este producto.

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

Para la extracción automática del ADN de las muestras a analizar con el instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., código INT030), se sugiere utilizar los siguientes productos genéricos: cartuchos de extracción «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., código INT032SP200), y materiales de consumo para la extracción y amplificación de muestras biológicas «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., código SCH mINT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., código F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., código INT035PCR) y «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, código TF-350-L-R-S).

Para la extracción, amplificación e interpretación automatizada del ADN de la muestra el instrumento «**ELITE InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes protocolos (ELITechGroup S.p.A.) se requieren:

- Para los calibradores «**HHV8 ELITE STD**»,
- Para el control positivo de la amplificación «**HHV8 ELITE PC**»,
- Para el control negativo de la amplificación «**HHV8 ELITE NC**»,
- Para analizar una muestra «**HHV8 ELITE_WB_200_100**» y «**HHV8 ELITE_PL_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), los consumibles para la extracción y 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, «**HHV6 ELITE_Be STD**»;
- para el control positivo de amplificación, «**HHV6 ELITE_Be PC**»;
- para el control negativo de amplificación, «**HHV6 ELITE_Be NC**»;
- para los análisis de las muestras, «**HHV6 ELITE_Be_WB_200_100**» y «**HHV6 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).

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

Para la configuración automática de la PCR con las muestras recolectadas, se recomienda el uso de productos ELITE MGB® Kits (ELITechGroup S.P.A.), con el instrumento «**ELITE GALAXY**».

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

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

Como control positivo de extracción y control de inhibición se requiere el empleo de producto

genérico «CPE - Internal Control» (ELITechGroup S.p.A., código CTRCPE), una solución estabilizada que contiene dos plásmido de ADN y ARN genómico del fago MS2.

Si estuviera 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.

Si estuviera 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.

Si se requiere la detección del ADN de HHV8 (análisis cualitativo), se aconseja usar el producto «HHV8 - ELiTe Positive Control» (ELITechGroup S.p.A., código CTR038PLD), control positivo de ADN plasmídico.

Si se requiere la detección y cuantificación del ADN de HHV8 (análisis cuantitativo) se aconseja usar el producto «HHV8 ELiTe Standard» (ELITechGroup S.p.A., código STD038PLD), cuatro diluciones de ADN plasmídico en cantidad conocida para obtener la curva estándar.

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 l'ensayo 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 l'ensayo.

Respetar las instrucciones provistas en el producto durante la ejecución de l'ensayo.

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

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.

Cuando la etapa de amplificación se realiza de forma 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.

Cuando la etapa de amplificación se realiza de forma 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 HHV8 Q - PCR Mix debe ser conservada en lugar oscuro a -20° C.

La HHV8 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 mezcla HHV8 Q Mix puede mantenerse en el bloque refrigerado del área de inventario durante un máximo de cinco sesiones de trabajo independientes de tres horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR»), o bien durante tres sesiones de trabajo consecutivas de tres horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR»).

ELiTe InGenius® y ELiTe BeGenius®

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

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

Sangre entera recolectada en EDTA

Las muestras de sangre entera destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas en 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 está utilizando muestras congeladas, descongelar las muestras inmediatamente antes de la extracción con el fin de evitar la posible degradación de los ácidos nucleico.

Nota: cuando se realiza la extracción del ADN desde muestras de sangre entera con **ELiTe InGenius** y con **ELiTe InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores equivalentes) utilizar los protocolos de extracción **HHV8 ELiTe_WB_200_100**. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, agrega **CPE** con 10 µL / extracción y diluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de sangre se realiza con el instrumento **ELiTe BeGenius** y la versión **2.0.0** del **software ELiTe BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **HHV6 ELiTe_Be_WB_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Cuando se usa el tubo primario, el volumen de la muestra varía dependiendo del tipo de tubo que se ha cargado. Para más información para configurar y ejecutar el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Plasma recolectado en EDTA

Las muestras de plasma destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas en 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 dividir en diferentes alícuotas las muestras para conservarlas congeladas y no

someterlas a repetidos ciclos de congelación / descongelación. Cuando está utilizando muestras congeladas, descongelar las muestras inmediatamente antes de la extracción con el fin de evitar la posible degradación de los ácidos nucleico.

Nota: cuando se realiza la extracción del ADN desde muestras de plasma con **ELITE InGenius** y con **ELITE InGenius Software** versión 1.3 (o versiones posteriores equivalentes) utilizar los protocolos de extracción **HHV8 ELITE_PL_200_100**. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, agrega **CPE** con 10 µL / extracción y diluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de sangre se realiza con el instrumento **ELITE BeGenius** y la versión **2.0.0** del **software ELITE BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **HHV8 ELITE_Be_PL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Cuando se usa el tubo primario, el volumen de la muestra varía dependiendo del tipo de tubo que se ha cargado. Para más información para configurar y ejecutar el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Otras muestras:

No hay datos disponibles sobre el rendimiento del producto con el ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: líquido cefalorraquídeo y biopsias cutáneas.

Sustancias interferentes

El ADN extraído de la muestra de partida no debe contener heparina 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

Previo al análisis de una muestra, es necesario generar y aprobar la curva de calibración y los controles de amplificación para cada lote del reactivo de amplificación:

como valores de calibración, utilizar los cuatro niveles de concentración del **HHV8 ELITE Standard**, en asociación con el protocolo «**HHV8 ELITE_STD**» para **ELITE InGenius** y «**HHV8 ELITE_Be_STD**» para **ELITE BeGenius**,

como Control Positivo de amplificación utilizar **HHV8- ELITE Positive Control**, en asociación con el protocolo «**HHV8 ELITE_PC**» para **ELITE InGenius**, y «**HHV8 ELITE_Be_PC**» para **ELITE BeGenius**,

como Control Negativo de amplificación utilizar agua de grado molecular (no suministrada con el kit), en asociación con el protocolo «**HHV8 ELITE_NC**» para **ELITE InGenius**, y «**HHV8 ELITE_Be_NC**» para **ELITE BeGenius**.

Nota: Los sistemas ELITE InGenius y ELITE BeGenius requieren resultados aprobados y válidos de curva de calibración y controles de amplificación para cada lote de reactivo de amplificación almacenado en su base de datos.

Las curvas de calibración, aprobadas y almacenadas en la base de datos, caducarán a los 60 días. En la fecha de caducidad es necesario volver a ejecutar los estándares de Q-PCR en asociación con el lote de reactivo de amplificación.

Los resultados de los controles de amplificación, aprobados y almacenados en la base de datos, expirarán después de 15 días. En la fecha de caducidad es necesario volver a ejecutar los controles positivos y negativos en asociación con el lote de reactivos de amplificación.

Además, los calibradores y los controles de amplificación deben volver a realizarse cuando

- se inicie un nuevo lote de reactivos,
- los resultados del análisis de control de calidad (véase el párrafo siguiente) estén fuera de las especificaciones,
- se realice cualquier servicio de mantenimiento importante en el instrumento.

Controles de calidad

- Se recomienda la validación planificada del procedimiento de extracción y amplificación. Pueden utilizarse muestras probadas o material de referencia certificado. Se utilizarán controles externos de acuerdo con las organizaciones de acreditación locales, estatales y federales, según corresponda.

ELITE InGenius PROCEDIMIENTO

El procedimiento de uso de «**HHV8 - 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 que los calibradores (Calibration- **HHV8 Q-PCR Standard**) hayan sido ejecutados, aprobados y no estén vencidos (status). Estos controles se pueden ejecutar desde el menú "Calibration" de la "Home page". Si no hay calibradores aprobados o válidos, ejecútelos como se describe en los párrafos siguientes;
- verificar que los controles de amplificación (**HHV8 Positive Control**, **HHV8 Negative Control**) hayan sido ejecutados, aprobados y no estén vencidos (status). Estos controles se pueden ejecutar desde el menú "Control" de la "Home page". Si no hay Controles de amplificación aprobados o válidos, ejecútelos como se describe en los párrafos siguientes;
- seleccionar el tipo de ciclo y configurarlo siguiendo las instrucciones para configurar la sesión, utilizando los protocolos de los ensayos suministrados por ELITechGroup. Estos protocolos IVD han sido validados específicamente con los kits ELITE MGB y el instrumento **ELITE InGenius** y las citadas matrices.

El protocolo de l'ensayo disponible para el kit «**HHV8 ELITE MGB® Kit**» se describe en la siguiente tabla.

Protocolo de l'ensayo para el « HHV8 ELITE MGB® Kit »			
Nombre	Matriz	Relación unitaria	Características
HHV8 ELITE_WB_200_100	Sangre entera	copias/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
HHV8 ELITE_PL_200_100	Plasma	copias/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Sonicación: NO Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL

Si el protocolo de l'ensayo buscado no se encuentra en el sistema, comunicarse con el Servicio al Cliente local de ELITechGroup.

Los protocolos para el análisis cualitativo están disponibles bajo petición.

Configuración de la sesión

El **HHV8 ELITE MGB Kit** asociado con **ELITE InGenius** se puede utilizar para ejecutar:

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

Todos los parámetros necesarios para la sesión están incluidos en el Protocolo de Ensayo disponible en el instrumento y se recuperan automáticamente cuando se selecciona el Protocolo de Ensayo.

Nota: el sistema Elite InGenius se puede conectar a la "Información sobre la ubicación del servidor" (LIS) a través de que se puede enviar la información de configuración de la sesión. para obtener más detalles Consulte el manual de instrucciones del instrumento.

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

A Ciclo integrado

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

1. Descongelar los tubos de HHV8 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.
2. 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.
3. Seleccionar "Perform Run" desde la pantalla "Home".
4. Asegurarse de que el volumen de extracción inicial sea de 200 µL y que el volumen del Eluato extraído sea de 100 µL.
5. Para cada pista completar el "SampleID" (SID) ingresando o leyendo el código de barras de la muestra.
6. Seleccionar el protocolo del test que se debe utilizar en la columna "Assay" (HHV8 ELITE MGB Kit_PL_200_100_cp).
7. Asegurarse de que el "Protocol" visualizado sea: "Extract + PCR".
8. Seleccionar la posición de carga de la muestra en la columna "Sample Position":
 - si se utiliza un tubo primario, seleccionar "Primary Tube";
 - si se utiliza un tubo secundario, seleccionar "Extraction Tube".
 - Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
9. Cargar el CPE y la HHV8 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.
10. Cargar y 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.
11. 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.
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: 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 los materiales de consumo y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: Al finalizar el ciclo se puede conservar la PCR mix en el bloque refrigerado hasta 16 horas.

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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:

1. Descongelar los tubos de HHV8 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.
2. Seleccionar "Perform Run" desde la pantalla "Home".
3. Asegurarse de que el volumen de extracción inicial sea de 200 µL y que el volumen del Eluato extraído sea de 100 µL.
4. Para cada pista completar el "SampleID" (SID) ingresando o leyendo el código de barras de la

muestra.

5. Seleccionar el protocolo del test que se debe utilizar en la columna "Assay" (HHV8 ELITE MGB Kit_PL_200_100_cp).
6. Seleccionar "PCR Only" en la columna "Protocol".
7. Asegurarse de cargar la muestra eluida en "ExtraTube (posición 1)" en la columna "Sample Position". Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
8. Cargar la HHV8 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.
9. Cargar y 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.
10. Cargar las muestras de los ácidos nucleicos extraídos 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 el pulsador "Next" para continuar con el procedimiento.
11. Cerrar la portezuela del instrumento.
12. 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 los materiales de consumo y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: Al finalizar el ciclo se puede conservar la PCR mix en el bloque refrigerado hasta 16 horas.

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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 **HHV8 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.
- Nota:** Descongele el HHV8 Q - PCR Mix en la oscuridad porque este reactivo es sensible a la luz.
2. Descongelar los tubos de **HHV8 ELITE Standard** (Cal1:HHV8 Q-PCR Standards 10², Cal2: HHV8 Q-PCR Standards 10³, Cal3: HHV8 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HHV8 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 y que el volumen del Eluato extraído sea de 100 µL.
 5. En el Track de interés, seleccione el Protocolo de Ensayo a utilizar en la columna "Ensayo".
 6. Seleccione el protocolo de ensayo "HHV8 ELITE STD" en la columna "Ensayo" y rellene el número de lote y la fecha de caducidad del estándar Q-PCR para el VHB.
 7. Presionar en "Siguiente" para continuar con la configuración.
 8. Cargue la mezcla HHV8 Q-PCR en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la GUI. Haga clic en "Siguiente" para continuar la configuración.
 9. Cargue y compruebe los bastidores de puntas en el "Área de Inventario" seleccionada siguiendo las instrucciones de la GUI. Haga clic en "Siguiente" para continuar la configuración.
 10. Cargue los "PCR Cassettes" y los tubos HHV8 Q-PCR Standard siguiendo las instrucciones de la GUI. Haga clic en "Siguiente" para continuar con la configuración.
 11. Cerrar la portezuela del instrumento.
 12. 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 los materiales de consumo y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: Al finalizar el ciclo se puede conservar la PCR mix en el bloque refrigerado hasta 16 horas.

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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 **HHV8 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.

Nota: Descongele el **HHV8 Q - PCR Mix** en la oscuridad porque este reactivo es sensible a la luz.

2. Descongelar el producto **HHV8 ELITE Positive Control** a temperatura ambiente (~+25°C) durante 30 minutos para la amplificación del Control Positivo. Descongelar un tubo a temperatura ambiente. Cada tubo es suficiente para 4 extracciones. Mezclar delicadamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter por lo meno 50 µL de 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. Aunque no se vaya a realizar ninguna extracción, asegúrese de que el "Volumen de entrada de extracción" es de 200 µL y el "Volumen de elución extraída" es de 50 µL.
6. A partir de la pista de interés, seleccionar el protocolo de dosificación que se debe utilizar en la columna "Assay".
7. Para el control positivo, seleccione el protocolo de ensayo "HHV8 ELITE_PC" en la columna "Ensayo" y rellene el número de lote y la fecha de caducidad del control positivo HHV8.
8. Para el control negativo, seleccione el protocolo de ensayo "HHV8 ELITE_NC" e introduzca el número de lote y la fecha de caducidad del agua de grado de biología molecular.
9. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
10. Cargar la HHV8 Q-PCR Mix en el Inventory Block seleccionado siguiendo las instrucciones de la GUI. Hacer clic en "Next" para continuar con el procedimiento.
11. Cargar y 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.
12. 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.
13. Cerrar la portezuela del instrumento.
14. 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 los materiales

de consumo y eliminarlos sin contaminar el medio ambiente. Evitar que los reactivos se derramen.

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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 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 «**HHV8 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 HHV8 ("HHV8"), 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 l'ensayo "HHV8 ELITE MGB Kit_Calibrator".

La curva de calibración para el lote del reactivo de amplificación se almacena 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 cada muestra, es absolutamente 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 "Aprobado" se muestran en la ventana "Calibración" 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 el caso en el que se carga la curva de calibración junto con las muestras y el resultado es inválido, toda la sesión es nula y la amplificación de todas las muestras se debe repetir.

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

Las señales fluorescentes emitidas por la sonda específica para HHV8 ("HHV8"), 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 l'ensayo "HHV8 ELITE_PC" y "HHV8 ELITE_NC".

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**. Si no hay un resultado del control positivo y negativo de la amplificación aprobado y válida, crearlo como se describió anteriormente.

Nota: Cuando el Control Positivo o el Control Negativo 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 o del Control Negativo.

Nota: Cuando se ejecuta el Control Positivo o el Control negativo 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 HHV8 ("HHV8") y por la sonda específica para el Control Interno ("IC"), en cada reacción de amplificación, son analizadas automáticamente e interpretadas por el software del instrumento con los parámetros incluidos en el protocolo de l'ensayo.

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
HHV8 Q-PCR Standard	APPROVED
2) Control Positivo	Status
HHV8 Positive Control	APPROVED
3) Control Negativo	Status
HHV8 Negative Control	APPROVED

Para cada muestra el sistema ejecuta automáticamente el cálculo de la carga vira cómo determinado por el algoritmo de **ELITE InGenius software** y por los parámetros del protocolo de ensayo.

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

Resultado del ciclo de la muestra	Interpretación
HHV8: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL	La cantidad de ADN de HHV8 detectado coincide con el intervalo de medición de l'ensayo, como se indica.
HHV8: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL	El ADN de HHV8 detectado está por debajo del límite inferior de cuantificación de l'ensayo.
HHV8: DNA Detected, quantity beyond ULQ copies / mL	El ADN de HHV8 detectado supera el límite superior de cuantificación de l'ensayo.
HHV8: DNA Not Detected or below LoD copies / mL	ADN de HHV8 no detectado o inferior al límite de detección de l'ensayo.
Invalid - Retest Sample	El resultado de l'ensayo no es válido por un error de control interno (extracción equivocado o la presencia de un inhibidor).

Las muestras no calificadas para el análisis son identificadas por el software del sistema como "Invalid - Retest Sample". En este caso, el control interno de ADN no fue detectado posiblemente por problemas en la etapa de extracción o amplificación (degradación del ADN, pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el eluido) que pueden causar resultados incorrectos o falsos negativos.

Cuando el volumen de eluido es suficiente, la muestra extraída puede ser analizada nuevamente mediante amplificación en modo ciclo "PCR Only". En caso de un segundo resultado inválido, se debe volver a probar la muestra a partir de la extracción utilizando el modo ciclo "Extract + PCR".

Las muestras utilizadas en las que no fue posible detectar el ADN HHV8 son reportados como "DNA Not Detected or below LoD". En este caso no se puede excluir que el ADN de HSV1 está presente a un título inferior al límite de detección del producto (ver "Características de las prestaciones").

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

Los resultados del ciclo de la muestra se almacenan 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 almacenan 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 "Track Report" puede ser impreso y firmado por personal autorizado

ELITE BeGenius PROCEDURE

Configuración de la sesión

El producto **HHV8 ELITE MGB Kit** puede utilizarse en combinación con el **ELITE BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

- 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 login "CLOSED";
- verificar que los calibradores (Calibration- **HHV8 Q-PCR Standard**) hayan sido ejecutados, aprobados y no estén vencidos (status). Estos controles se pueden ejecutar desde el menú "Calibration" de la "Home page". Si no hay calibradores aprobados o válidos, ejecútelos como se describe en los párrafos siguientes,
- verificar que los controles de amplificación (**HHV8 Positive Control, HHV8 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 los ensayos suministrados por ELITechGroup. Estos protocolos IVD han sido validados específicamente con los kits ELITE MGB y el instrumento **ELITE InGenius** y las citadas matrices.

El protocolo de l'ensayo disponible para el kit « **HHV8 ELITE MGB® Kit** » se describe en la siguiente tabla.

Protocolo de l'ensayo para el « HHV8 ELITE MGB® Kit » y ELITE BeGenius			
Nombre	Matriz	Relación unitaria	Características
HHV8 ELITE_Be_WB_200_100	Sangre entera	copias/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL
HHV8 ELITE_Be_PL_200_100	Plasma	copias/mL	Volumen de extracción inicial: 200 µL Volumen de Eluato extraído: 100 µL Control Interno: 10 µL Volumen PCR Mix: 20 µL PCR volumen inicial de la muestra: 20 µL

Si el protocolo de l'ensayo buscado no se encuentra en el sistema, comunicarse con el Servicio al Cliente local de ELITechGroup.

1. Configuración de la sesión

El producto **HHV8 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»).
- Sesión del control positivo y del control negativo (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 cargar la información de la sesión de trabajo. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones 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**.

- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla de Q-PCR de HHV8 para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de CPE para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Extraer las gradillas de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
- Seleccionar el modo de procesamiento «Extract + PCR».
- Cargar las muestras en el área de refrigeración comenzando a partir de la gradilla de muestras L5.
- 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, escribir manualmente el ID de las muestras.

- Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., HHV8 ELITE_Be_WB_200_100). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Si se realiza una segunda extracción, repetir los pasos del 6 al 9 utilizando la gradilla de muestras L4.
- 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.

- Insertar la gradilla de elución L3 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Repetir los pasos 11 y 12 utilizando la gradilla de reactivos/elución L2.
- Cargar el CPE y la mezcla de Q-PCR de HHV8 en el área de refrigeración.
- Insertar la gradilla de reactivos L1 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

- Cargar la gradilla de PCR con un cartucho de PCR («PCR Cassette») en el área de inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- 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.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Presionar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el instrumento **ELITE BeGenius** permite al usuario 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 de PCR que contiene los productos de reacción y demás consumibles deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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.

- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla de Q-PCR de HHV8 para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
- Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only».
- Cargar las muestras en el área de refrigeración comenzando a partir de la gradilla de elución L3.
- Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Aunque no se vaya a realizar la extracción, asegurarse de todas formas de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., HHV8 ELITE_Be_WB_200_100). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar la mezcla de Q-PCR de HHV8 en el área de refrigeración.
- Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar la gradilla de PCR con un cartucho de PCR («PCR Cassette») en el área de inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Presionar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el instrumento **ELITE BeGenius** permite al usuario 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 de PCR 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 de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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 estándares de Q-PCR, 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 de Q-PCR de HSV1 para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar las probetas de estándar de Q-PCR de HHV8 (Cal1: estándares de Q-PCR de HHV8 10², Cal2: estándares de Q-PCR de HHV8 10³, Cal3: estándares de Q-PCR de HHV8 10⁴, Cal4: estándares de Q-PCR de HHV8 10⁵). Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y 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 «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 se vaya a realizar la extracción, asegurarse de todas formas 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 «HHV8 ELITE_Be_STD». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla de Q-PCR de HHV8 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 siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho de PCR («PCR Cassette») en el área de inventario 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 al usuario 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 estándares Q-PCR.

Nota: Al finalizar la sesión, el cartucho de PCR 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 de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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 control positivo y del control negativo

Para configurar los ciclos de control positivo y control negativo, 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 de Q-PCR de HHV8 para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar el producto «HHV8- ELITE Positive Control», para la amplificación del control positivo. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua de calidad para biología molecular (como control negativo) 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 «PCR Only».
7. Cargar las probetas de control positivo y control negativo 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 se vaya a realizar la extracción, asegurarse de todas formas de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
10. En la columna «Assay», seleccionar los protocolos de ensayo «HHV8 ELITE_Be_PC» y «HHV8 ELITE_Be_NC». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar la mezcla de Q-PCR de VHH6 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 siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
14. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho de PCR («PCR Cassette») en el área de inventario 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 al usuario mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

Nota: Al finalizar la sesión, el control positivo 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 de PCR 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 de PCR se puede utilizar para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar 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 esta pantalla se muestran los resultados de la muestra/calibrador/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»).

El sistema **ELITE BeGenius** genera los resultados con el producto «HHV8 ELITE MGB Kit» mediante el siguiente procedimiento:

HHV8 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS038PLD

- A. Validación de la curva de calibración
- B. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo 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 detalles.

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES
ELITE InGenius y ELITE BeGenius

Sensibilidad analítica: límite de detección

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección, permite detectar la presencia de aproximadamente 10 copias de ADN en las 20 µL de ADN agregadas a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección, ha sido probada utilizando un ADN plasmídico que contiene el producto de amplificación, cuya concentración inicial ha sido medida con un espectrofotómetro. El ADN plasmídico ha sido diluido con un título de 10 copias / 20 µL en ADN plasmídico que contiene control interno en un título de 150,000 copias / 20 µL. Esta muestra fue utilizada en 18 repeticiones para realizar la amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A en dos instrumentos diferentes.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias ADN plasmídico + 150,000 copias de control interno	18	18	0

El límite de detección (LoD) del kit HHV8 ELITE MGB® se verificó en asociación con muestras de plasma y sangre total recogidas en EDTA y en los sistemas **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** (modo Extr + PCR).

Para sangre total:

La carga de este ensayo se verificó probando 20 réplicas de muestras de sangre entera con 117 copias/mL en los sistemas **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** en modo "Extracto + PCR". Las muestras se enriquecieron con el material de referencia Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation).

La LoD se confirma si al menos 18 de 20 réplicas dan un resultado positivo según la directriz EP17-A del CLSI.

Los resultados se recogen en las siguientes tablas.

Límite de detección para muestras de sangre total y ELITE InGenius						
Sample	LoD	N	Valid	Positive	Negative	
Sangre Total	117 copias / mL	20	20	20	0	

Límite de detección para muestras de sangre total y ELITE BeGenius						
Sample	LoD	N	Valid	Positive	Negative	
Sangre Total	117 copias / mL	20	20	20	0	

El valor de LoD para el objetivo HHV8 se confirmó en 117 copias / mL para la Sangre Total recogida en EDTA.

Para el plasma:

La LoD de este ensayo se verificó probando 20 réplicas de muestra de plasma con 98 copias / mL en los sistemas **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** en modo "Extracto + PCR". Las muestras se enriquecieron con el material de referencia Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid (ZeptoMetrix Corporation).

La LoD se confirma si al menos 18 de 20 réplicas dan un resultado positivo según la directriz CLSI EP17-A.

Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

HHV8 ELITE MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS038PLD

Límite de detección para muestras de Plasma y ELITE InGenius					
Sample	LoD	N	Valid	Positive	Negative
Plasma	98 copias / mL	20	20	20	0

Límite de detección para muestras de Plasma y ELITE BeGenius					
Sample	LoD	N	Valid	Positive	Negative
Plasma	98 copias / mL	20	20	20	0

El valor de LoD para el objetivo HHV8 se confirmó en 98 copias / mL para el plasma recogido en EDTA.

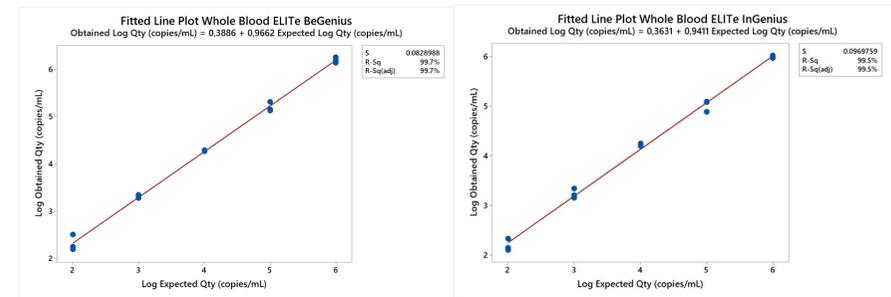
Rango de medición lineal y límites de cuantificación

El rango de medición lineal del kit HHV8 ELITE MGB® utilizado en asociación con **sangre total** y **plasma** recogidos en EDTA y **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** fue verificado con un panel de diluciones de HHV8. El panel se preparó diluyendo el fluido de cultivo del Virus del herpes humano tipo 8 (HHV-8) inactivado por calor (ZeptoMetrix), en matrices de ADN HSV1 - negativo. El panel consistió en diez puntos de dilución desde 1 x 10⁶ copias / mL hasta aproximadamente 2 x 10² copias / mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 réplicas.

Para sangre entera:

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante un análisis de regresión lineal, demostró que el ensayo en asociación con muestras de Sangre Total muestra una respuesta lineal para todas las diluciones con un Coeficiente de Correlación Cuadrada (R²) igual a 0,995 para ELITE InGenius y 0,997 para ELITE BeGenius.

Los resultados se presentan en los siguientes gráficos.



El Límite Inferior de Cuantificación (LLOQ) se fijó en, la concentración LoD, que da resultados cuantitativos precisos (Desviación Estándar igual a 0.1839 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y 0.3488 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**) y exactos (Sesgo igual a 0,0014 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y 0,1329 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**): 117 copias / mL.

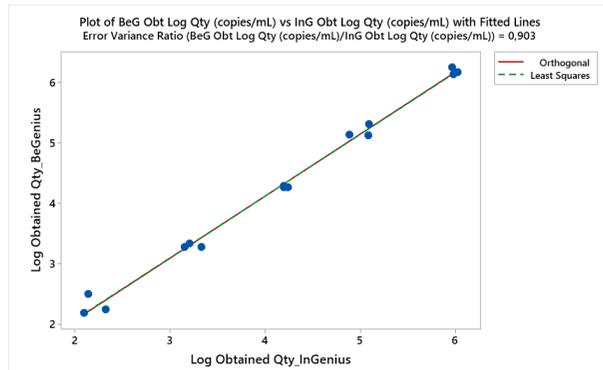
El límite superior de cuantificación (ULOQ) se fijó en la concentración más alta probada, que da resultados cuantitativos precisos (desviación estándar igual a 0,0302 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y 0,06107 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**) y exactos (sesgo igual a 0,0078 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y -0,1914 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**): 1.000.000 de copias / mL.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Rango de medición lineal para muestras de sangre total y ELITE InGenius® y ELITE BeGenius®		
Unit of measure	lower limit	upper limit
copies / mL	117	1,000,000

Los resultados obtenidos por ELITE InGenius y ELITE BeGenius se analizaron mediante regresión ortogonal y lineal para calcular la correlación entre los métodos.

Los resultados se resumen en la siguiente figura.

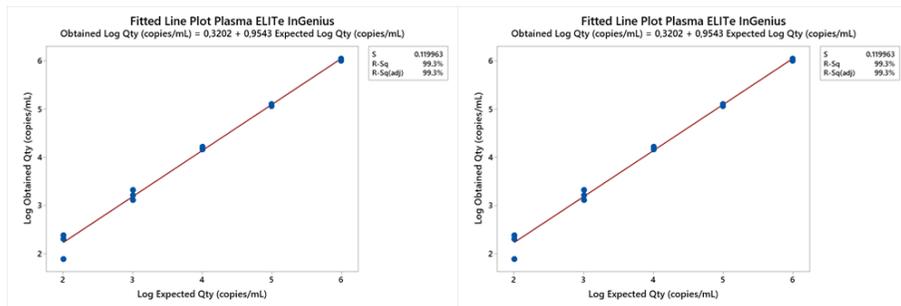


En esta prueba, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente igual a 1,02622 (IC 95%: 0,9798; 1,0726) y un intercepto igual a 0,018 (IC 95%: - 0,1839; 0,2109). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,993.

Para Plasma:

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante análisis de regresión lineal, demostró que el ensayo en asociación con muestras de Sangre Total muestra una respuesta lineal para todas las diluciones con un Coeficiente de Correlación Cuadrada (R2) igual a 0,993 para **ELITE InGenius** y 0,988 para **ELITE BeGenius**.

Los resultados se presentan en los siguientes gráficos.



El Límite Inferior de Cuantificación (LLOQ) se fijó en, la concentración LoD, que da resultados cuantitativos precisos (Desviación Estándar igual a 0,1971 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y 0,090 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**) y exactos (Sesgo igual a 0,1537 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y 0,2693 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**): 98 copias / mL.

El Límite Superior de Cuantificación (ULOQ) se fijó en, la mayor concentración probada, que da resultados cuantitativos precisos (Desviación Estándar igual a 0,0245 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y 0,1731 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**) y exactos (Sesgo igual a -0,0249 copias Log / mL para **ELITE InGenius** y -0,1647 copias Log / mL para **ELITE BeGenius**): 1.000.000 de copias / mL.

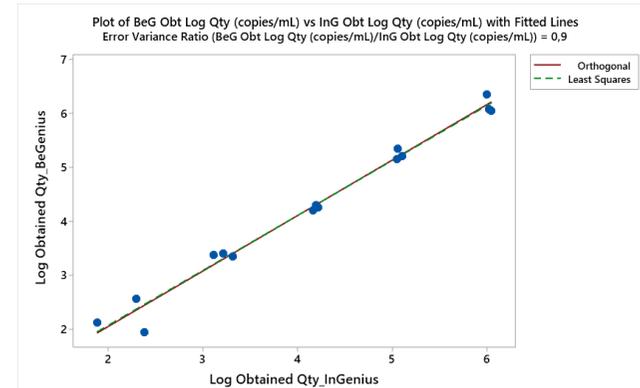
Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Rango de medición lineal para muestras de plasma y ELITE InGenius® y ELITE BeGenius®

Unit of measure	lower limit	upper limit
copies / mL	98	1,000,000

Los resultados obtenidos por **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se analizaron mediante regresión ortogonal y lineal para calcular la correlación entre los métodos.

Los resultados se resumen en la siguiente figura.



En esta prueba, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente igual a 1,027 (IC 95%: 0,9533; 1,0998) y un intercepto igual a 0,004 (IC 95%: - 0,3144; 0,3227). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,983.

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos por el producto **HHV8 ELITE MGB Kit** en asociación con los sistemas **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se comprobó analizando un panel de muestras de sangre total recogidas en EDTA. El panel incluía una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado para HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid ZeptoMetrix) a una concentración de 3 x LoD (unas 351 copias / mL) y de 10 x LoD (unas 1170 copias / mL).

La repetibilidad intra-sesión en **ELITE InGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en dos corridas por día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento, por el mismo operador, en el mismo día. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

La repetibilidad entre sesiones en **ELITE InGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en dos ejecuciones por día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento, por el mismo operador, en dos días diferentes. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

Los valores Ct del objetivo y del control interno se utilizaron para calcular el %CV a fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión.

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

Intra – Session Repeatability ELITE InGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25.39	0.44	1.75
3 x LoD	8 / 8	35.66	0.39	1.10				
10 x LoD	8 / 8	33.95	0.28	0.84				

Inter – Session Repeatability ELITE InGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	25.22	0.93	3.69
3 x LoD	16 / 16	35.58	0.51	1.44				
10 x LoD	16 / 16	33.93	0.56	1.65				

En la prueba de repetibilidad en **ELITE InGenius**, el ensayo detectó la diana HSV1 como se esperaba y mostró un bajo %CV de los valores Ct que no superó el 1,65% para HHV8 y el 3,69% para el control interno.

La repetibilidad intra-sesión en **ELITE BeGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en una corrida por día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento, en el mismo día. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

La repetibilidad entre sesiones en **ELITE BeGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en una ejecución por día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento, en dos días diferentes. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

Los valores Ct de la diana y del control interno 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.

Intra – Session Repeatability ELITE BeGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24/24	28.70	0.95	3.29
3 x LoD	8 / 8	36.36	0.42	1.16				
10 x LoD	8 / 8	34.43	0.11	0.31				

Inter – Session Repeatability ELITE BeGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	48 / 48	28.54	1.16	4.05
3 x LoD	16 / 16	36.10	0.52	1.44				
10 x LoD	16 / 16	34.25	0.32	0.93				

En la prueba de repetibilidad en **ELITE BeGenius**, el ensayo detectó la diana HHV8 como se esperaba y mostró un bajo %CV de los valores Ct que no superó el 1,44% para el HHV8 y el 4,05% para el control interno.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos por el producto HHV8 ELITE MGB Kit en asociación con los sistemas **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se comprobó analizando un panel de muestras de sangre total. El panel incluía una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado HHV8 (Human Herpes Virus Type 8 (HHV-8) Infectious Culture Fluid ZeptoMetrix) a una concentración de 3 x LoD (unas 351 copias / mL) y de 10 x LoD (unas 1170 copias / mL).

La reproducibilidad interinstrumental en **ELITE InGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en una ejecución por día, en dos días, con dos instrumentos diferentes y por dos operadores diferentes. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias en el sistema **ELITE InGenius**

en modo "Extracto + PCR".

La Reproducibilidad Inter-Lotes en **ELITE InGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en dos corridas por día, con dos lotes diferentes y el mismo instrumento. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias en el sistema **ELITE InGenius** en modo "Extracto + PCR".

Los valores Ct de la diana y del Control Interno 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.

Inter – Instrument Reproducibility ELITE InGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	24.40	1.49	6.11
3 x LoD	8 / 8	35.27	0.28	0.78				
10 x LoD	8 / 8	33.87	0.37	1.09				

Inter – Batch Repeatability ELITE InGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	25.69	1.03	3.99
3 x LoD	8 / 8	35.47	0.49	1.38				
10 x LoD	8 / 8	33.84	0.31	0.92				

En la prueba de Reproducibilidad en **ELITE InGenius**, el ensayo detectó la diana HHV8 como se esperaba y mostró un bajo %CV de los valores Ct que no superó el 1,38% para HHV8 y el 6,11% para el Control Interno.

La Reproducibilidad Interinstrumental en **ELITE BeGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en una corrida por día, en dos días, con dos instrumentos diferentes por dos operadores diferentes. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias en el sistema **ELITE BeGenius** en modo "Extracto + PCR".

La reproducibilidad entre lotes en **ELITE BeGenius** se obtuvo mediante el análisis de muestras de panel en ocho réplicas, en dos ejecuciones por día, con dos lotes diferentes y el mismo instrumento. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias en el sistema **ELITE BeGenius** en modo "Extracto + PCR".

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

En el cuadro siguiente se muestra un resumen de los resultados.

Inter – Instrument Repeatability ELITE BeGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28.39	1.37	4.82
3 x LoD	8 / 8	36.19	0.61	1.70				
10 x LoD	8 / 8	24.24	0.42	1.22				

Inter – Batch Repeatability ELITE BeGenius								
Sample	HHV8				Internal Control			
	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV	Pos. / Rep.	Mean Ct	SD	% CV
Negative	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	24 / 24	28.83	1.02	3.55
3 x LoD	8 / 8	35.79	0.58	1.73				
10 x LoD	8 / 8	34.10	0.40	1.17				

En la prueba de reproducibilidad en **ELITE BeGenius**, el ensayo detectó la diana HHV8 como se esperaba y mostró un bajo %CV de los valores Ct que no superó el 1,7% para el HHV8 y el 4,8% para el control interno.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de muestras positivas

La sensibilidad de diagnóstico de l'ensayo, como confirmación de muestras clínicas positivas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras de sangre entera recogida en EDTA y plasma recogido en EDTA positivas para el ADN de HHV8 en asociación con ELITE InGenius. Dado que ELITE BeGenius mostró rendimientos analíticos equivalentes a los de ELITE InGenius, cabe suponer que los resultados de la sensibilidad de diagnóstico obtenidos en asociación con ELITE InGenius son aplicables también a ELITE BeGenius.

La sensibilidad diagnóstica se ha evaluado utilizando 30 muestras de sangre entera recogida en EDTA negativo para ADN de HHV8, positivizado para HHV8 con el fluido de cultivo de HHV8 (ZeptoMetrix Corporation) a un título de 750 copias / mL y 30 muestras de plasma recogida en EDTA negativo para ADN de HHV8, positivizado para HHV8 con el fluido de cultivo de HHV8 (ZeptoMetrix Corporation) a un título de 750 copias / mL.

Cada muestra fue utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción, amplificación e interpretación de los resultados con **ELITE InGenius** y con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recogida en EDTA positivizado para ADN de HSV2	30	30	0
Plasma recogida en EDTA positivizado para ADN de HSV2	30	30	0

Todas las muestras fueron detectadas correctamente.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo fue igual al 100%.

Especificidad de diagnóstico: confirmación de muestras negativas

La especificidad de diagnóstico de l'ensayo, como confirmación de muestras clínicas negativas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras de sangre entera recogida en EDTA y plasma recogido en EDTA negativas para el ADN de HHV8 en asociación con ELITE InGenius. Dado que ELITE BeGenius mostró rendimientos analíticos equivalentes a los de ELITE InGenius, cabe suponer que los resultados de la sensibilidad de diagnóstico obtenidos en asociación con ELITE InGenius son aplicables también a ELITE BeGenius.

La especificidad diagnóstica se ha evaluado utilizando 32 muestras de sangre entera recogida en EDTA de donantes sanos todas negativas para el ADN de HHV8 y 32 muestras de plasma recogido en EDTA de donantes sanos todas negativas para el ADN de HHV8.

Cada muestra fue utilizada para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción, amplificación e interpretación de los resultados, con **ELITE InGenius** y con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recogida en EDTA negativas para ADN de HSV2	32	0	32
Plasma recogida en EDTA negativas para ADN de HSV2	32	0	32

Todas las muestras fueron detectadas correctamente.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo fue igual al 100%.

OTROS SISTEMAS

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe ser utilizado con **DNA extraído** de las siguientes muestras de sangre entera recolectada en EDTA, líquido cefalorraquídeo (líquido).

Sangre entera recolectada en EDTA

Las muestras de sangre entera destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas en 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 -70C° 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.

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 (2 millones de células como máximo), recuperar el ADN con **100 µL** de tampón de elución.

Nota: Cuando se ejecuta la extracción del ADN 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; cuando 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 **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 **50 µL** de tampón de elución.

Nota: cuando se realiza la extracción del ADN de muestras de sangre entera con el equipo «**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 equipo tiene la capacidad de utilizar directamente el tubo primario, el volumen de muestra retirado para la extracción es **200 µL**, siempre se requiere 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 a **60 µL** (la elución se produce en 90 µL efectivos de los cuales 60 µL son recuperados). Para conocer detalles sobre el procedimiento de extracción, seguir 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 lleva a cabo la extracción del ADN a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», utilizar el protocolo de extracción **Generic 2.0.1** seguir estas indicaciones: distribuir **500 µL** de muestra en la tira de 8 pocillos, cargar la tira en el instrumento y comenzar con la extracción; al concluir los 10 minutos de incubación, agregar **10 µL** de **CPE-DNA** para el control interno antes de agregar el **EasyMAG® Magnetic Silica** al contenido de la tira con la pipeta multicanal y el programa 3; continuar con la extracción y recuperar el ADN con **100 µL** de tampón de elución.

Plasma recolectado en EDTA

Las muestras de plasma destinadas a la extracción de los ácidos nucleicos deben ser recolectadas en 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.

Nota: cuando se realiza la extracción de ARN de muestras de plasma usando el **ELITE STAR System**, con **versión de software 3.4.13** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción **"UUNI_E100S200_ELI"**, que emplea 200 µL de muestra y eluye el ARN recolectado en 100 µL (la elución se realiza en 115 µL efectivos, de los cuales se recuperan 100 µL). Las muestras en las tubos primarios pueden cargarse directamente en el «**ELITE STAR**». Es necesario siempre un volumen mínimo de 400-600 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 el **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 tubos

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.

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) agregándola a la reacción en lugar del ADN extraído de la muestra.

Para el control positivo utilizar el producto «HHV8 - ELITE Positive Control» o el producto «HHV8 ELITE 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)

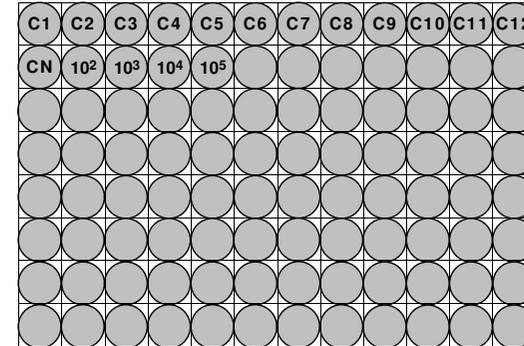
Si se utiliza un equipo **7300 Real-Time PCR System**:

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 HHV8 con el "reporter" = "FAM" y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "HHV8";
- 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 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 "**Ciclo térmico**";
- 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 (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 HHV8 con el "reporter" = "FAM" y el "quencher" = "none" (no fluorescente) y denominarlo "HHV8";
- 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" = "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 del ADN en la muestra de partida es necesario preparar una serie de reacciones con los **Q - PCR Standard** (10⁵ copias, 10⁴ copias, 10³ copias, 10² copias) para obtener la **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**;

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 "**Ciclo térmico**";
- 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	50C°	2 min.
Desnaturalización inicial	94C°	2 min.
Amplificación y detección (45 ciclos)	94C°	15 seg.
	60C° (adquisición de la fluorescencia)	45 seg.
	72C°	15 seg.
Disociación(opcional)	95C°	15 seg.
	40C°	1 min.
	80C°	15 seg.
	60C°	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 **HHV8 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 **HHV8 - Positive Control** o bien las probetas de **HHV8 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.

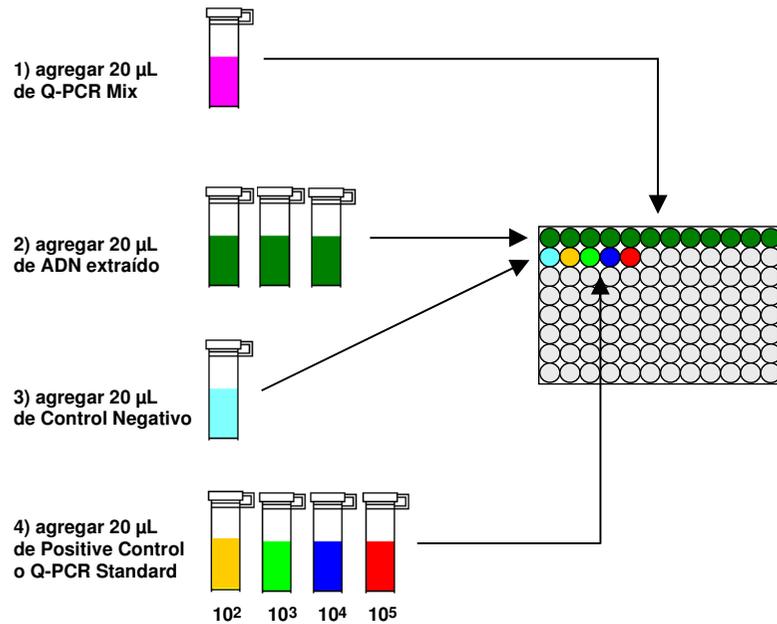
1. Transferir, depositándolos cuidadosamente en el fondo sin crear burbujas, **20 µL** de mezcla de reacción **HHV8 Q - PCR MIX** en los pocillos de la **Amplification microplate** como fue establecido previamente en el **Plan de trabajo**.

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

2. Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **ADN extraído** 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 reacción. Prestar atención a no crear burbujas. Proceder del mismo modo con todos los otros **ADN extraídos**.
3. Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **Agua bidestilada estéril** (no provista en el producto) en el pocillo de la **Amplification microplate** de control negativo de amplificación como fue establecido previamente en el **Plan de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando tres veces el **agua bidestilada estéril** en la mezcla de reacción. Prestar atención a no crear burbujas.
4. En base al tipo de resultado requerido (cualitativo o cuantitativo), seguir una de las dos opciones:
 - En caso de que se requiera un resultado **cualitativo** del análisis (detección del ADN de HHV8): Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **HHV8 - Positive Control** en el pocillo correspondiente de la **Amplification microplate** como fue establecido previamente en el **Plan de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando tres veces el **HHV8 - Positive Control** en la mezcla de reacción. Prestar atención a no crear burbujas.
 - En caso de que se requiera un resultado **cuantitativo** del análisis (cuantificación del ADN de HHV8): Transferir, depositándolos cuidadosamente en la mezcla de reacción, **20 µL** de **HHV8 - PCR Standard 10²** en el pocillo correspondiente de la **Amplification microplate** como fue establecido previamente en el **Plan de trabajo**. Mezclar bien el estándar pipeteando tres veces el **HHV8 Q - PCR Standard 10²** en la mezcla de reacción. Prestar atención a no crear burbujas. Proceder de igual manera con los **HHV8 Q - PCR Standard 10³, 10⁴, 10⁵**.
5. Sellar cuidadosamente la **Amplification microplate** con la **Amplification Sealing Sheet**.
6. Transferir la **Amplification microplate** en el thermal cycler para real time ubicado en el área de "amplificación / detección" de los productos de amplificación e iniciar el ciclo térmico de amplificación, guardando la programación de la sesión con una identificación unívoca y reconocible (por ej. "año-mes-día-HHV8-ELITECHGROUP").

Nota: Al finalizar el ciclo térmico, se debe quitar la Amplification microplate con los productos de reacción 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 reacción.

En la siguiente figura se ilustra de manera sintética el procedimiento para la preparación de las reacciones de amplificación.



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

Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica para HHV8 (detector FAM "HHV8") y por la sonda específica para el Control Interno (detector VIC "CI") en las reacciones de amplificación deben ser analizados con el software del equipo.

Antes de efectuar el análisis, tomando como referencia la documentación del equipo, es necesario:
- programar manualmente (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) el intervalo de cálculo del **Nivel de fluorescencia de fondo (Baseline)** desde el ciclo 6 al ciclo 15;

Nota: En caso de una muestra positiva con alto título de HHV8, la fluorescencia FAM de la sonda específica para HHV8 puede comenzar a crecer antes del 15º ciclo. En este caso el intervalo de cálculo 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 "HHV8" 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 "HHV8" en **0,2**;
- 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 HHV8 (Results > Report) se utiliza para confirmar la amplificación y la detección como se describe en la tabla siguiente:

Reacción Positive Control detector FAM "HHV8"	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 HHV8, 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.

***Nota:** Cuando se utiliza este producto para la cuantificación del ADN de HHV8, en lugar de la reacción con el **Positive Control** se ha preparado la serie de reacciones con los **Q - PCR Standard**. En este caso para convalidar la amplificación y la detección se debe tomar como referencia la reacción de amplificación del **Q - PCR Standard 10⁵ (Ct ≤ 25)**.

En la reacción de amplificación del **Control negativo**, el valor de **Ct** para HHV8 (Results > Report) se utiliza para confirmar la amplificación y la detección como se describe en la siguiente tabla:

Reacción Control negativo detector FAM "HHV8"	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 HHV8, 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 HHV8 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 capacidad para detectar una cantidad mínima de 10 copias de ADN del gen que codifica la minor capsid protein (ORF 26) de HHV8 por reacción de amplificación, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción (límite de detección del producto, ver apartado sobre las Características de las prestaciones en la página 16).

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

Reacción muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado de la prueba	ADN de HHV8
detector FAM "HHV8"	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 HHV8 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 HHV8 y **Ct ≤ 35** para el Control Interno, el ADN de HHV8 no ha sido detectado en el ADN extraído de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de HHV8 esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (ver apartado sobre las Características de las prestaciones en la página 16). 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 HHV8, 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 HHV8. 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 HHV8 en las reacciones de amplificación de los cuatro **Q - PCR Standard** se utilizan para calcular la **Curva estándar** (Results > Standard Curve) de la sesión de amplificación y para confirmar la amplificación y la detección como se describe en la siguiente tabla:

Curva estándar detector FAM "HHV8"	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, ha ocurrido un problema en la fase de amplificación o de detección (dispensación incorrecta de la mezcla de reacción o de los estándares, degradación de la mezcla de reacción o de los estándares, programación incorrecta de la posición de los estándares, programación incorrecta del ciclo térmico) que pueden causar resultados incorrectos. La sesión no es válida y se debe repetir a partir de la fase de amplificación.

Los valores de **Ct** para HHV8 en las reacciones de amplificación de cada **muestra** y la **Curva estándar** 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.

Este producto tiene capacidad para cuantificar de 1.000.000 a 10 copias de ADN del gen que codifica la minor capsid protein (ORF 26) de HHV8 por reacción de amplificación, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción (intervalo de medición lineal del producto, ver apartado sobre las Características de las prestaciones en la página 16), como se describe en la siguiente tabla:

Resultado de la muestra detector FAM "HHV8"	genomas Equivalentes de HHV8 por reacción
Cantidad > 1 x 10 ⁶	SUPERIORES A 1.000.000
1 x 10 ¹ ≤ Cantidad ≤ 1 x 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad < 1 x 10 ¹	INFERIORES A 10

Los resultados (**Cantidad**) de cada **muestra** (Results > Report) son utilizados para calcular los genomas Equivalentes (**gEq**) de HHV8 presentes en la muestra de partida (**Nc**) según esta fórmula:

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = \frac{Ve \times \text{Cantidad}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Donde:

Vc es el volumen de la muestra usado en la extracción **expresado en mL**;
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 correspondiente a la muestra **expresado en gEq por reacción**.

Quando se utilizan muestras de sangre entera o plasma recolectadas en EDTA o y el sistema de extracción **ELITE STAR System** y se desea obtener el resultado **expresado en gEq / mL**, la fórmula es:

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

Quando se utilizan muestras de sangre entera o plasma recolectadas en EDTA y el sistema de extracción **ELITE GALAXY System** y se desea obtener el resultado **expresado en gEq / mL**, la fórmula es:

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

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 gEq / mL**, la fórmula es:

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

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

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

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

$$Nc \text{ (gEq / mL)} = 23 \times \text{Cantidad}$$

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

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

Cálculo de los límites del intervalo de medición lineal

Los límites del intervalo de medición lineal como gEq / mL de muestra, cuando se utiliza una metodología de extracción en particular, pueden calcularse a partir del intervalo de medición lineal de la reacción de amplificación según la siguiente fórmula:

$$\text{Límite inferior (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

$$\text{Límite superior (gEq / mL)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ gEq}}{V_c \times V_a \times E_p}$$

Quando se utiliza el sistema de extracción **ELITE STAR System** con muestras de sangre entera o plasma recolectadas en EDTA, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con ELITE STAR System
Límite inferior (gEq / mL) = 28 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 28 x 1.000.000 gEq
de 280 a 28.000.000 gEq / mL

Quando se utiliza el sistema de extracción **ELITE GALAXY System** con muestras de sangre entera o plasma, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con ELITE GALAXY System
Límite inferior (gEq / mL) = 35 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 35 x 1.000.000 gEq
de 350 a 35.000.000 gEq / mL

Quando se utiliza el sistema de extracción «**NucliSENS® easyMAG®**» con muestras de sangre entera, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con «NucliSENS® easyMAG®»
Límite inferior (gEq / mL) = 50 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 50 x 1.000.000 gEq
de 500 a 50.000.000 gEq / mL

Quando se utiliza el sistema de extracción «**NucliSENS® easyMAG®**» con muestras de líquido cefalorraquídeo, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con «NucliSENS® easyMAG®»
Límite inferior (gEq / mL) = 10 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 10 x 1.000.000 gEq
de 100 a 10.000.000 gEq / mL

Quando se utiliza el kit de extracción «**QIASymphony® SP/AS**» con muestras de sangre entera, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal con «QIASymphony® SP/AS»
Límite inferior (gEq / mL) = 23 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 23 x 1.000.000 gEq
de 230 a 23.000.000 gEq / mL

Quando se utiliza el kit de extracción «**EXTRAblood**» con muestras de sangre entera, la fórmula es:

Límites del intervalo de medición lineal (gEq / mL) con «EXTRAblood»
Límite inferior (gEq / mL) = 25 x 10 gEq
Límite superior (gEq / mL) = 25 x 1.000.000 gEq
de 250 a 25.000.000 gEq / mL

CARACTERÍSTICAS DE LAS PRESTACIONES

Sensibilidad analítica: límite de detección

La sensibilidad analítica de esta prueba permite detectar la presencia de aproximadamente 10 moléculas de ADN blanco en las 20 µL de ADN agregadas 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 del ensayo se verificó usando un panel de diluciones de HHV8 dentro de la concentración límite utilizada en combinación con muestras de sangre completa y «**ELITE GALAXY**». El panel se preparó diluyendo el fluido de cultivo de HHV8 (ZeptoMetrix Corporation) en sangre completa recogida en EDTA y negativa para ADN de HHV8. Las concentraciones virales variaron desde 10 gEq / mL a 560 gEq / mL. Cada muestra de panel se probó en doce repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y configuración de PCR con el sistema de extracción automática «**ELITE GALAXY**» y amplificación, con ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó con la regresión Probit. El límite de detección se definió como la concentración a la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%.

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

Límite de detección con muestras de sangre entera y ELITE GALAXY (gEq / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor superior
95% resultado positivo	117 gEq / mL	72 gEq / mL	326 gEq / mL

La sensibilidad analítica del ensayo se verificó mediante un panel de diluciones de HHV8 dentro de la concentración límite utilizada en asociación con muestras de plasma y «**ELITE GALAXY**». El panel se preparó diluyendo el fluido de cultivo de HHV8 (ZeptoMetrix Corporation) en plasma recogido en EDTA y negativo para ADN de HHV8. Las concentraciones virales variaron de 10 gEq / mL a 560 gEq / mL. Cada muestra de panel se probó en doce repeticiones para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción y configuración de PCR con el sistema de extracción automática y amplificación «**ELITE GALAXY**», con ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó con la regresión Probit. El límite de detección se definió como la concentración a la cual la probabilidad de obtener un resultado positivo es del 95%.

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

Límite de detección con muestras de plasma y ELiTe GALAXY (gEq / mL)			
		Intervalo de fiabilidad del 95%	
		Valor inferior	Valor inferior
95% resultado positivo	98 gEq / mL	58 gEq / mL	336 gEq / mL

Sensibilidad analítica: intervalo de medición lineal

La sensibilidad analítica de esta prueba permite cuantificar de 1.000.000 a 10 moléculas de ADN blanco en los 20 µL de ADN agregados a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de la prueba, como intervalo de medición lineal, ha sido determinada 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 realizar 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 superior del intervalo de medición lineal ha sido fijado en 10⁶ moléculas por reacción, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción, en torno a un logaritmo del valor del estándar de amplificación Q - PCR Standard de concentración más alta, (10⁵ moléculas / 20 µL).

El límite inferior del intervalo de medición lineal ha sido fijado en 10 moléculas por reacción, correspondientes a los genomas Equivalentes por reacción, en torno a un logaritmo del valor del estándar de amplificación Q - PCR Standard de concentración más baja, (10² moléculas / 20 µL).

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Intervalo de medición lineal (gEq / reacción)	
Límite superior	1.000.000 gEq / reacción
Límite inferior	10 gEq / reacción

En la página 24 están calculados los límites del intervalo de medición lineal gEq / mL referidos al kit de extracción utilizado.

Sensibilidad analítica: Precisión y Exactitud

La precisión de la prueba, entendida como variabilidad de los resultados obtenidos en una misma sesión de amplificación con distintas repeticiones de una muestra, permitió determinar un Coeficiente de Variación porcentual (CV %) promedio del 24,5% dentro del intervalo de 10⁶ moléculas a 10 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 con distintas repeticiones de una muestra y el valor teórico de la concentración de la muestra, permitió obtener una Inexactitud porcentual promedio del 8,8% dentro del intervalo lineal de medición de 10⁶ moléculas a 10 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 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 análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los oligonucleótidos primers y de la sonda fluorescente sobre la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos del gen que codifica la minor capsid protein (ORF 26) de HHV8 ha demostrado su conservación y la ausencia de mutaciones significativas.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de muestras positivas

La sensibilidad de diagnóstico de la prueba, como confirmación de muestras clínicas positivas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras clínicas positivas para el ADN de HHV8.

La sensibilidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 19 muestras de sangre entera recolectada en EDTA positividad para el ADN de HHV8 (testadas con un método de amplificación real time). Cada muestra fue 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 positividad para el ADN de HHV8	19	18	1

Una muestra de plasma normal de donante ha dado un resultado no válido con los productos ELiTechGroup S.p.A. Esta discordancia puede explicarse para una muestra con un título muy bajo de HHV8 (aproximadamente 250 gEq / mL), título inferior al límite de detección del producto en cuestión.

La sensibilidad diagnóstica de la prueba fue 94.7%

La sensibilidad diagnóstica del ensayo se evaluó utilizando 30 muestras de plasma recogidas en EDTA, negativas para ADN HHV8, positividad para ADN HHV8 mediante la adición de fluido de cultivo a la muestra HHV8 (ZeptoMetrix, Estados Unidos) y 30 muestras de sangre completa recogida en EDTA negativo para el ADN HHV8, positividad para el ADN HHV8 mediante la adición de fluido de cultivo a la muestra HHV8 (ZeptoMetrix, Estados Unidos). Cada muestra se usó para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción con «ELiTe STAR» y amplificación, con ELiTechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recogida en EDTA positividad para ADN HHV8	30	30	0
Plasma recogido en EDTA positividad para ADN HHV8	30	30	0

Todas las muestras positivizadas para ADN de HHV8 se detectaron correctamente como positivas. La sensibilidad diagnóstica del ensayo fue igual al 100%.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo se evaluó utilizando 31 muestras de plasma recogidas en EDTA, negativo para ADN de HHV8 y positividad para ADN HHV8 mediante la adición de fluido de cultivo a la muestra HHV8 (ZeptoMetrix, Estados Unidos) y 30 muestras de sangre completa se recogió en EDTA negativo para el ADN de HHV8 y se positivizó para el ADN de HHV8 añadiendo fluido de cultivo a la muestra de HHV8 (ZeptoMetrix, Estados Unidos). Cada muestra se usó para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción con «ELiTe GALAXY» y amplificación, con ELiTechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recogida en EDTA positividad para ADN HHV8	30	30	0
Plasma recogido en EDTA positividad para ADN HHV8	31	30	0

Se excluyó una muestra de plasma del estudio porque dio un resultado no válido durante la amplificación. Este resultado fue confirmado por una segunda amplificación y probablemente se deba a la presencia de un inhibidor.

30 muestras de plasma fueron válidas para el análisis y todas fueron positivas confirmadas. Todas las muestras positivizadas para ADN de HHV8 se detectaron correctamente como positivas.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo fue 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.

El análisis de la alineación de las secuencias de los oligonucleótidos primers y de la sonda fluorescente con las secuencias disponibles en la base de datos de organismos distintos del HHV8, entre

HHV8 ELiTe MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS038PLD

los cuales se encuentran las de los genomas completos de EBV, el herpesvirus humano más parecido al HHV8, 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 HHV8 pero positivas para el ADN de otros herpesvirus.

La especificidad analítica ha sido verificada utilizando como material de referencia 20 muestras de sangre entera recolectada en EDTA, negativas para el DNA de HHV8 pero positivas para el ADN de BKV, EBV, CMV (testadas con un método de amplificación real time). Cada muestra fue 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 positiva para el ADN de BKV	4	0	4
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el ADN de EBV	7	0	7
Sangre entera recolectada en EDTA positiva para el ADN de CMV	9	0	9

No se ha detectado ninguna reactividad cruzada con las muestras positivas para el ADN otros patógenos.

Especificidad de diagnóstico: confirmación de muestras negativas

La especificidad de diagnóstico de la prueba, como confirmación de muestras clínicas negativas, ha sido evaluada utilizando algunas muestras clínicas negativas para el ADN de HHV8.

La sensibilidad diagnóstica ha sido evaluada utilizando como material de referencia 20 muestras de sangre entera recolectada en EDTA negativas para el ADN de HHV8 (testadas con un método de amplificación real time). Cada muestra fue 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 HHV8	20	0	20

La especificidad diagnóstica del ensayo fue superior al 95%.

La especificidad diagnóstica del ensayo se evaluó utilizando 30 muestras de plasma recogidas en EDTA, presumiblemente negativas para el ADN HHV8 y 30 muestras de sangre entera recogidas en EDTA, presumiblemente negativas para el ADN HHV8 (probado con un método de amplificación en tiempo real). Cada muestra se usó para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción con «ELiTe STAR» y amplificación, con ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recogida en EDTA negativo para ADN HHV8	30	0	27
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN HHV8	30	0	30

Tres muestras fueron inválidas.

La especificidad diagnóstica del ensayo fue igual al 100%.

La especificidad diagnóstica del ensayo se evaluó utilizando 30 muestras de plasma recogidas en EDTA, presumiblemente negativas para el ADN HHV8 y 30 muestras de sangre entera recogidas en EDTA, presumiblemente negativas para el ADN HHV8 (probado con un método de amplificación en tiempo real). Cada muestra se usó para realizar todo el procedimiento de análisis, extracción con «ELiTe GALAXY» y amplificación, con ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recogida en EDTA negativo para ADN HHV8	30	0	30
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN HHV8	30	0	30

HHV8 ELiTe MGB® Kit
reactivo por Amplificación Real Time del ADN

REF RTS038PLD

Todas las muestras eran negativas para el ADN de HHV8. La especificidad diagnóstica del ensayo fue igual al 100%.

Nota: Los datos y los resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar las características de las presentaciones del producto con las matrices y los equipos están señaladas en el Fascículo Técnico del Producto "HHV8 ELiTe MGB® Kit", FTP RTS038PLD.

BIBLIOGRAFÍA

B. Bigoni et al (1996) *J Inf Dis* 173: 542 - 549
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: plasma recolectado en EDTA, orinas recolectadas sin conservantes y líquido cefalorraquídeo.

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 están disponibles datos referidos a las prestaciones de este producto con el ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: sangre entera recolectada en EDTA.

No son disponibles datos 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 BKV, 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 indumentaria de trabajo e 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 HHV8 no ha sido detectado en el ADN extraído de la muestra, pero no se puede excluir que el ADN de HHV8 esté presente con un título inferior al límite de detección del producto (ver Características de las prestaciones en la página 16); 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 HHV8.

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 de Positive Control / o del 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 de control positivo o los estándar distribuidos.
Degradación de la sonda.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de amplificación.
Degradación del control positivo o estándar.	Utilizar una nueva alícuota de control positivo o estándar.
Error en la programación del equipo.	Controlar la posición de las reacciones del control positivo o 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 control positivo o estándar en la microplaca siguiendo el plan de trabajo.
Error durante la programación del equipo.	Controlar la posición de muestras, control negativo y control positivo o 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 control positivo o 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.

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*.
- CE** Conforme a los requisitos de la Directiva Europea 98\79\CE correspondiente a los dispositivos médicos diagnósticos *in vitro*.
-  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.

«QIA Symphony®» es una marca registrada de QIAGEN.

«Ficoll®» es una marca registrada de GE Healthcare.

HHV8 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS038PLD



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 HHV8 ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification of Herpes human virus 8 (HHV8)**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HHV8	minor capsid protein gene (ORF26)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

HHV8 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 BeGenius instrument:** INT040
- › **ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge:** INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette:** INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set:** INT032CS
- › **CPE - Internal Control:** CTCRCPE
- › **HHV8 ELITE Standard :** STD038PLD
- › **HHV8 - ELITE Positive Control :** CTR038PLD
- › **ELITE InGenius Waste Box :** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen :** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

- | | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|---------|
| › Sample volume | 200 µL | › Unit of quantitative result | cp/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | | |
| › HHV8 Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	117 cp/mL	100% 30/30*	100% 32/32*
Plasma	98 cp/mL	100% 30/30*	100% 32/32*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (copies/mL)
Whole Blood	117 – 1,000,000
Plasma	98 – 1,000,000

H. Procedures ELITE InGenius

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: HHV8 Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: HHV8 pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the HHV8 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 handheld 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>

I. Procedures ELITE BeGenius

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius 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.

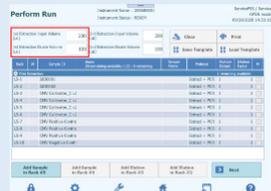
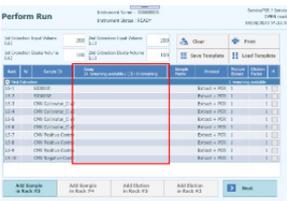
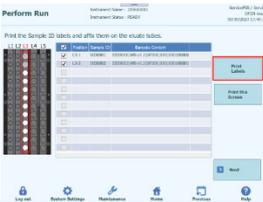
Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: HHV8 Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: HHV8 pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the HHV8 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 and then click on the run mode «Extraction and PCR»

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", Elute: "100 µL"

4. Select the "Assay protocol" of interest

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»
2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area
3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack
5. Close the door.
Start the run
6. 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" in the Assay Protocol selection screen.
6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack
8. Close the door
Start the run
9. Archive the eluate sample

HHV8 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument



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 HHV8 ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Herpes human virus 8 (HHV8)**.

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
HHV8	minor capsid protein gene (ORF26)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HHV8 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

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITE STAR: INTO10
- › ELITE STAR 200 extraction kit: INTO11EX
- › ELITE GALAXY: INTO20
- › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INTO21EX

- › HHV8 ELITE Positive Control: CTR038PLD
- › HHV8 ELITE Standard: STD038PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › 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	–	100% (30/30)*	100% (27/30)*
	Plasma	–	100% (30/30)*	100% (30/30)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole Blood	117 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	98 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (30/30)*

System	Linearity	Conversion factor cp/reaction to cp/mL
ELITE STAR - ABI	280 → 28 x 10 ⁶ (WB, PL)	28 (WB, PL)
ELITE GALAXY - ABI	350 → 35 x 10 ⁶ (WB, PL)	35 (WB, PL)
easyMAG - ABI	500 → 50 x 10 ⁶ (WB)	50 (WB)
QIASymphony - ABI	230 → 23 x 10 ⁶ (WB)	23 (WB)
	120 → 12 x 10 ⁶ (PL)	12 (PL)
EXTRAblood - ABI	250 → 25 x 10 ⁶ (WB)	25 (WB)

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	Whole Blood, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200µL
ELiTe Galaxy	Whole Blood, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF	500 µL	-	100 µL	5 µL
EasyMAG	Whole Blood	100	-	50	
QIAsymphony	Whole Blood,	200 µL	400 µL	95 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

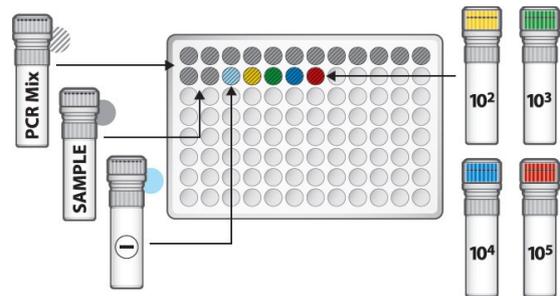
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HHV8" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition 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
45 cycles	72°C	20 sec

The melt curve analysis is optional, refer to the complete IFU

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HHV8 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 **20µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, **20 µL** of the Positive Control, if qualitative. 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	HHV8 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

HHV8 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 HHV8 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.