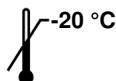


Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit

reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING



ÍNDICE

USO PREVISTO

PRINCIPIO DEL ENSAYO

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

MUESTRAS Y CONTROLES

PROCEDIMIENTO

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

BIBLIOGRAFÍA

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

SÍMBOLOS

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

página 1
página 2
página 3
página 3
página 3
página 4
página 4
página 5
página 6
página 13
página 17
página 18
página 19
página 21
página 22

USO PREVISTO

El producto «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» forma parte de un ensayo cualitativo múltiple de retrotranscriptasa y amplificación de ácidos nucleicos para la detección y la identificación del ARN del **virus de la gripe A (FluA)**, del **virus de la gripe B (FluB)**, del **virus respiratorio sincicial (VRS)** y del **metaneumovirus humano (hMPV)** en muestras clínicas.

El ensayo se ha validado con el sistema **ELITE InGenius®** y con exudados respiratorios y muestras de lavados broncoalveolares (LBA).

El producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico de infecciones respiratorias, junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit

reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo consiste en una retrotranscriptasa múltiple y una reacción de amplificación en tiempo real (con un método de un solo paso).

Empezando por el ARN extraído en cada muestra analizada, se realizan diferentes reacciones de retrotranscriptasa y amplificación en el cartucho de PCR con el fin de amplificar las siguientes dianas:

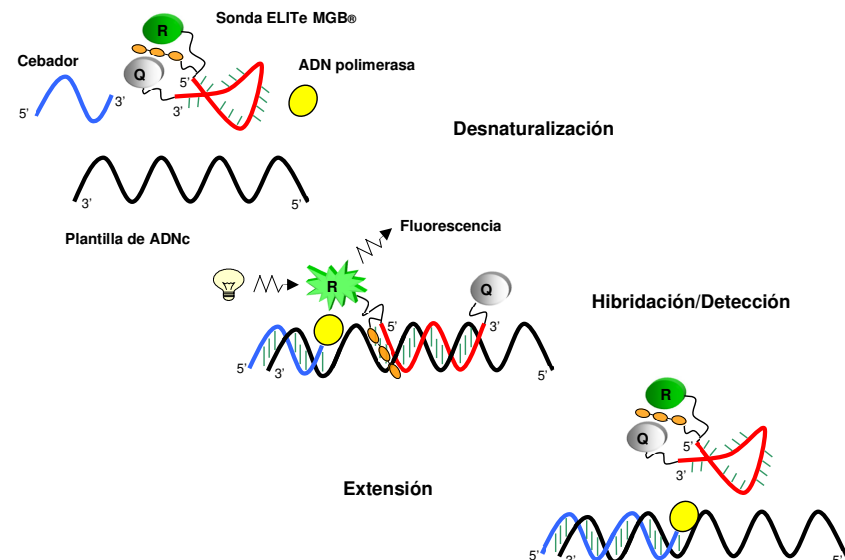
- Secuencia del gen de la proteína de la matriz del FluA, detectada mediante la sonda específica del canal **FluA** (canal 5).
- Secuencia del gen de la proteína de la matriz del FluB, detectada mediante la sonda específica del canal **FluB** (canal 1).
- Secuencia del gen de la proteína de la matriz del VRS, detectada mediante la sonda específica del canal **VRS** (canal 4).
- Secuencia del gen de la proteína de la matriz del hMPV, detectada mediante la sonda específica del canal **hMPV** (canal 6).

La mezcla de PCR también amplifica el control interno de extracción e inhibición basado en una región del ARN genómico del bacteriófago MS2 y detectado mediante la sonda específica del canal **IC** (canal 2).

Las sondas con tecnología ELITE MGB®, marcadas con el fluoróforo FAM, se activan cuando se hibridan con el producto específico de la reacción de amplificación. El instrumento mide y registra la emisión de fluorescencia. Al finalizar el ciclo de amplificación, los gráficos de fluorescencia se analizan para identificar los ciclos umbral (Ct). La interpretación de los resultados permite detectar la presencia de los patógenos de interés en la muestra inicial.

El ensayo se ha validado con el **ELITE InGenius**, un sistema integrado e automatizado para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, así como para la interpretación de resultados.

En la siguiente ilustración se muestra de manera esquemática el mecanismo de activación y emisión de fluorescencia de la sonda con tecnología ELITE MGB®. Tenga en cuenta que la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación.



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» incluye los siguientes componentes:

• Mezcla de PCR de RV PLUS

Una mezcla optimizada y estabilizada de oligonucleótidos y reactivos para la retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real, **dividida previamente en alícuotas en cuatro probetas** (tapón blanco). Cada probeta contiene **600 µL** de solución, suficiente para **24 análisis** (procesando al menos 5 muestras por sesión) cuando se utiliza el sistema **ELITE InGenius**.

La mezcla de PCR de RV PLUS contiene los cebadores y la sonda específicos para:

- La secuencia del gen de la **proteína de la matriz** del FluA. La sonda **FluA** se marca con el fluoróforo AP639, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- La secuencia del gen de la **proteína de la matriz** del FluB. La sonda **FluB** se marca con el fluoróforo FAM, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- La secuencia del gen de la **proteína de la matriz** del VRS. La sonda **VRS** se marca con el fluoróforo AP593, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- La secuencia del gen de la **proteína de la matriz** del hMPV. La sonda **hMPV** se marca con el fluoróforo AP690, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- La secuencia del ARN genómico del **bacteriófago MS2** del control interno (IC) exógeno. La sonda **IC** se marca con el fluoróforo AP525, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.

La mezcla de PCR de RV PLUS PCR también contiene la solución tampón, cloruro de magnesio, los nucleótidos-trifosfatos, los estabilizadores y la enzima Taq ADN polimerasa con activación térmica («hot start»).

• Mezcla RT EnzymeMix

Una mezcla optimizada y estabilizada de enzimas para la retrotranscriptasa, **dividida previamente en alícuotas en dos probetas** (tapón con inserto negro). Cada probeta contiene **20 µL** de solución, suficiente para **48 análisis** cuando se utiliza el **ELITE InGenius**.

El producto permite realizar **96 análisis cuando se utiliza el sistema ELITE InGenius**, inclusive los controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
Mezcla de PCR de RV PLUS	Mezcla de reactivos para la retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real tapón blanco	4 × 600 µL	-
Mezcla RT EnzymeMix	Retrotranscriptasa tapón con inserto negro	2 × 20 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitadora vorticial.
- Microcentrifugadora de sobremesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Probeta Sarstedt de 2,0 mL con tapón roscado bordeado (Sarstedt ref. 72.694.005).
- Agua de calidad para biología molecular.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

El volumen de suministro de este producto **no** incluye los reactivos para la extracción del ARN de las muestras que van a analizarse, el control interno de extracción e inhibición, el control positivo de amplificación ni los consumibles.

Para la extracción automática del ARN, la retrotranscriptasa, la amplificación en tiempo real y la interpretación de resultados, es necesario utilizar el instrumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes protocolos de ensayo específicos:

- parámetros para la amplificación del control positivo «**RV PLUS ELITE_PC**»,
- parámetros para la amplificación del control negativo «**RV PLUS ELITE_NC**»,
- parámetros para las muestras de exudados respiratorios que van a analizarse «**RV PLUS ELITE_RsS_200_100**»,
- parámetros para las muestras de LBA que van a analizarse «**RV PLUS ELITE_BAL_200_100**».

Con el instrumento «**ELITE InGenius**» se necesitan los siguientes productos genéricos:

- cartuchos de extracción «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumibles para extracción «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificación «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- puntas «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- cajas «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Como plantilla de control interno de extracción e inhibición, es necesario utilizar el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE). Se trata de una solución estabilizada que contiene ADN plasmídico y bacteriófago con ARN genómico.

Como plantilla del control positivo de amplificación, es necesario utilizar el producto específico «**Respiratory Viral PLUS - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR160ING). Se trata de una solución estabilizada que contiene ADN plasmídico.

Como dispositivo de recogida para muestras de exudados respiratorios, es necesario utilizar el producto genérico «**UTM® kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 360C or 305C) o un dispositivo equivalente.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado para uso *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran potencialmente infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No derramar ni rociar ningún producto. Los materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse durante al menos 30 minutos con hipoclorito de sodio al 3 %, o procesarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de su eliminación.

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran potencialmente infecciosos. Evitar el contacto directo con los reactivos. No derramar ni rociar ningún producto. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material combustible desechable debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de eliminarlos.

Usar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.

Antes de realizar el ensayo, leer atentamente todas las instrucciones que se incluyen con el producto.

Para realizar el ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.

No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.

Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el volumen de suministro del producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

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

Es necesario disponer de batas, guantes y herramientas expresamente destinados a la sesión de trabajo de que se trate.

Es necesario tener disponibles áreas independientes para las pruebas de biología molecular y las pruebas de cultivo microbiológico. No manipular nunca cultivos líquidos o sólidos en el área designada para las reacciones de extracción/amplificación.

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

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

Los cartuchos de PCR deben manipularse evitando en lo posible la dispersión del producto de amplificación hacia el entorno para que no se produzca una contaminación de las muestras ni de los reactivos.

Advertencias y precauciones específicas de los componentes

La mezcla **RV PLUS PCR Mix** debe conservarse a -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La **mezcla de PCR de RV PLUS** puede congelarse y descongelarse un máximo de **cinco veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

Mezcla RT EnzymeMix

La mezcla **RT EnzymeMix** debe conservarse a -20 °C.

La mezcla **RT EnzymeMix** no debe exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos. Puede congelarse y descongelarse un máximo de **diez veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Exudado respiratorio

Las muestras de exudado respiratorio para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en medio UTM de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse y conservarse a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) durante un máximo de 24 horas, o de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cinco días; de lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de un mes o a -70 °C durante períodos más largos. Los 200 µL de medio deben transferirse a la probeta ultrasónica que se incluye en el volumen de suministro del producto «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

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

Nota: El pipeteado de muestras desde la probeta primaria de exudados hasta la probeta ultrasónica puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en el apartado «Advertencias y precauciones».

Nota: Para realizar la extracción del ARN de los exudados respiratorios mediante el sistema ELITE InGenius y la versión 1.3 del software ELITE InGenius (o versiones posteriores), utilizar el protocolo de ensayo **RV PLUS ELITE RsS_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** (control interno) a 10 µL por extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

Lavado broncoalveolar (LBA)

Las muestras de lavado broncoalveolar (LBA) deben recogerse en una solución fisiológica estéril o en una solución tamponada con fosfato (PBS) de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse y conservarse a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) durante un máximo de 24 horas, o de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cinco días; de lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de un mes o a -70 °C durante períodos más largos. Los 200 µL de medio deben transferirse a la probeta ultrasónica que se incluye en el volumen de suministro del producto «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

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

Nota: El pipeteado de muestras desde la probeta primaria de exudados hasta la probeta de extracción puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en el apartado «Advertencias y precauciones».

Nota: Para realizar la extracción del ARN del LBA utilizando el sistema **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de ensayo **RV PLUS ELITE_BAL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** (control interno) a 10 µL por extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Sustancias interferentes

Una cantidad de ADN o ARN genómicos humanos superior a 1 µg por reacción puede inhibir la reacción de retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real.

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias interferentes» del apartado «Características de rendimiento».

Controles de amplificación

Antes de analizar una muestra, es obligatorio preparar y aprobar los controles de amplificación correspondientes para el lote de reactivos de amplificación que se desea utilizar en el ensayo:

- Como control positivo de amplificación, utilizar el reactivo **Respiratory Viral PLUS – ELITE Positive Control** (no incluido en el volumen de suministro del kit) junto con el protocolo de ensayo **RV PLUS ELITE_PC**.
- Como control negativo de amplificación, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro del kit) junto con el protocolo de ensayo **RV PLUS ELITE_NC**.

Nota: El sistema **ELITE InGenius** necesita resultados aprobados y válidos de los controles de amplificación para cada lote de reactivos guardado en su base de datos.

Los resultados de los controles de amplificación, aprobados y guardados en la base de datos caducan **después de 15 días**. Al llegar la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar los controles positivo y negativo con el lote de reactivos de amplificación utilizado.

Además, los controles de amplificación también deben volver a procesarse en los siguientes casos:

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación.
- Los resultados de los controles de calidad (consultar el apartado siguiente) se encuentran fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento **ELITE InGenius**.

Controles de calidad

Se recomienda validar periódicamente todo el procedimiento de extracción y amplificación. Se pueden utilizar muestras ya analizadas o material de referencia certificado.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento para utilizar el producto «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» con el sistema **ELITE InGenius** comprende tres pasos:

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

Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el instrumento **ELiTe InGenius** y seleccionar el modo de inicio de sesión «**CLOSED**».
- Comprobar que los controles de amplificación (controles, control positivo de RV PLUS y control negativo de RV PLUS) se hayan procesado con el lote de reactivos de amplificación pertinente y que los resultados se hayan aprobado y sean válidos («Status»). Si no se dispone de resultados aprobados o válidos para los controles de amplificación, generarlos tal como se indica en los siguientes apartados.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario para configurar la sesión y utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELiTechGroup S. p. A. Estos protocolos de diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits ELiTe MGB®, el instrumento **ELiTe InGenius** y la matriz mencionada.

En la siguiente tabla, se describen los protocolos de ensayo disponibles para el análisis de muestras con el producto «**Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit**».

Protocolo de ensayo para el producto «Respiratory Viral ELiTe MGB® Kit»			
Nombre	Matriz	Informe	Características
RV PLUS ELiTe_RsS_200_100	Exudado respiratorio	Positivo/ Negativo	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Control interno: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 10 µL
RV PLUS ELiTe_BAL_200_100	LBA	Positivo/ Negativo	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 100 µL Control interno: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 10 µL

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

Configuración de la sesión

El producto «**Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit**» puede utilizarse con el sistema **ELiTe InGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
- B. Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
- C. Sesión de amplificación para el control positivo y el 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 InGenius** 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.

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

1. En caso necesario, descongelar a temperatura ambiente (de +18 °C a 25 °C) las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Mezclar en una agitadora vorticial a baja velocidad durante 10 segundos, centrifugar las probetas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.
2. Descongelar durante 30 minutos a temperatura ambiente (de +18 °C a 25 °C) las probetas de mezcla **RV PLUS PCR Mix** (tapón blanco) que se necesitan para la sesión, teniendo en cuenta que el contenido de cada una de ellas es suficiente para **24 análisis**. Mezclar en una agitadora vorticial a baja velocidad tres veces durante 10 segundos y, después, centrifugar las probetas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en un bloque frío.

Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

3. Tomar las probetas de **RT EnzymeMix** (tapón negro) necesarias para la sesión, teniendo en cuenta que el contenido de cada una de ellas es suficiente para configurar **48 análisis**. Agitar suavemente las probetas, centrifugarlas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en un bloque frío.

Nota: La mezcla **RT EnzymeMix** no debe exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos.

4. Preparar una probeta de 2 mL con tapón roscado (Sarstedt Ref. 72.694.005, no incluida en el kit) para la **mezcla completa de reacción** y etiquetarla de forma identificable con un rotulador permanente.
5. Calcular los volúmenes de los dos componentes proporcionados con el kit que se necesitan para preparar la **mezcla completa de reacción** basándose en el número de muestras que van a analizarse, tal como se describe en la siguiente tabla.

Nota: Para calcular los volúmenes de los dos componentes que van a utilizarse para preparar la **mezcla completa de reacción**, es necesario definir el número de muestras (N) que van a analizarse en la sesión y seguir las indicaciones de la tabla siguiente.

Número de muestra (N)	Mezcla de PCR de RV PLUS	Mezcla RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) × 20 µL	(N + 1) × 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 12	(N + 2) × 20 µL	(N + 2) × 0,3 µL

6. Preparar la **mezcla completa de reacción** añadiendo a la probeta dedicada de 2 mL los volúmenes calculados de los dos componentes.
7. Mezclar en una **agitadora vorticial a baja velocidad** tres veces durante 10 segundos, centrifugar la probeta durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.

Nota: La mezcla completa de reacción tiene que prepararse en el momento para cada sesión de trabajo y **no puede** reutilizarse ni conservarse.

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

A. Sesión integrada

Para configurar una sesión integrada con la extracción y amplificación de la muestra, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Descongelar las probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar cuidadosamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
4. Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra («Sample ID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
5. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., RV PLUS ELiTe_RsS_200_100).
6. Asegurarse de que el protocolo que se muestra sea «Extract + PCR».
7. En la columna «Sample Position», seleccionar «Sonication Tube» como posición de carga para la muestra. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar el CPE y la **mezcla completa de reacción** en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos de PCR, los cartuchos de extracción «ELiTe InGenius SP 200», todos los consumibles necesarios y las muestras que van a extraerse en las posiciones indicadas en el paso 7, siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que ha quedado en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

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

Nota: Al finalizar la sesión, la mezcla completa de reacción **no puede** reutilizarse ni conservarse.

B. Sesión de amplificación

Para configurar la sesión de amplificación a partir del ARN extraído, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
2. Aunque no se vaya a realizar ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
3. Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
4. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., RV PLUS ELiTe_RsS_200_100).
5. En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
6. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» sea «Elution Tube (fila inferior)». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
7. Cargar la **mezcla completa de reacción** en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar los cartuchos de PCR y las muestras del ácido nucleico extraído siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cerrar la puerta del instrumento.
11. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que ha quedado en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, así como taparse y conservarse a -20 °C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

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

Nota: Al finalizar la sesión, la mezcla completa de reacción **no puede** reutilizarse ni conservarse.

C. Sesión de amplificación para los controles positivo y negativo

Para configurar la sesión de amplificación para el control positivo y el control negativo, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Descongelar la probeta de **control positivo de RV PLUS** para la sesión. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar cuidadosamente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Verter al menos 50 µL de agua de calidad para biología molecular en una probeta de elución, incluida en el volumen de suministro del producto «ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set».
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. En la pista deseada, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
5. Aunque no vaya a realizarse la extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL, y «Extracted Eluate Volume», a 100 µL.
6. Para el control positivo, seleccionar «RV PLUS ELiTe_PC» en la columna «Assay» e introducir el número de lote y la fecha de caducidad del **control positivo de RV PLUS**.
7. Para el control negativo, seleccionar «RV PLUS ELiTe_NC» e introducir el número de lote y la fecha de caducidad del agua de calidad para biología molecular.
8. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar la **mezcla completa de reacción** en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar/revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», la probeta de **control positivo de RV PLUS** y la probeta de control negativo siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: Al finalizar la sesión, el control positivo que queda debe extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída. El control negativo que queda debe eliminarse.

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

Nota: Al finalizar la sesión, la mezcla completa de reacción **no puede** reutilizarse ni conservarse.

Evaluación y aprobación de los resultados

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», en la que se muestran los resultados de la muestra/los controles y la información relativa a la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar el resultado, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

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

El sistema **ELITE InGenius** genera los resultados con el producto «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» mediante el siguiente procedimiento:

- Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación.
- Validación de los resultados de las muestras.
- Generación del informe de resultados de la muestra.

A. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación

El software del instrumento analiza e interpreta automáticamente las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de genes patógenos (canales **FluA**, **FluB**, **VRS** y **hMPV**) utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «RV PLUS ELITE_PC» y «RV PLUS ELITE_NC».

Los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación utilizado, se guardan en la base de datos («Controls»). El personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario.

Los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación caducan **después de 15 días**.

El software del instrumento utiliza los resultados de las sesiones de amplificación de los controles positivo y negativo para configurar los gráficos de control, lo que permite controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

Nota: Si el resultado de los controles positivo o negativo de amplificación no cumple los criterios de aceptación, el instrumento muestra el mensaje «Failed» en la pantalla «Controls» y no es posible aprobarlo. En este caso, es necesario repetir la reacción de amplificación de los controles positivo o negativo.

Nota: Si el control positivo o el control negativo se procesan junto con las muestras que van a analizarse y el resultado no es válido, se invalida la sesión entera. En este caso, también es necesario repetir la amplificación de todas las muestras.

B. Validación de los resultados de las muestras

El software del instrumento analiza automáticamente las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los genes patógenos (canales **FluA**, **FluB**, **VRS** y **hMPV**) y por la sonda del control interno (canal **IC**) en las reacciones de amplificación utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «RV PLUS ELITE_RsS_200_100» y «RV PLUS ELITE_BAL_200_100».

Los resultados se muestran en los informes generados por el instrumento («Result Display»).

La sesión de la muestra puede aprobarse cuando se cumplen las dos condiciones que se indican en la siguiente tabla.

1) Control positivo	Estado
RV PLUS Positive Control	APROBADO
2) Control negativo	Estado
RV PLUS Positive Control	APROBADO

Por cada muestra, el sistema interpreta automáticamente el resultado del ensayo según el algoritmo del **software ELITE® InGenius** y los parámetros del protocolo del ensayo.

En la siguiente tabla, se muestran los posibles mensajes de los resultados. Para cada muestra, el sistema muestra una combinación de los siguientes mensajes y especifica si los ARN de los patógenos se han detectado o no.

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
FluA: RNA detected.	Se ha detectado ARN del FluA en la muestra.
FluB: RNA detected.	Se ha detectado ARN del FluB en la muestra.
VRS: RNA detected.	Se ha detectado ARN del VRS en la muestra.
hMPV: RNA detected.	Se ha detectado ARN del hMPV en la muestra.
FluA: RNA not detected or below LoD.	No se ha detectado ARN del FluA en la muestra. La muestra es negativa para este patógeno o su concentración está por debajo del límite de detección del ensayo.
FluB: RNA not detected or below LoD.	No se ha detectado ARN del FluB en la muestra. La muestra es negativa para este patógeno o su concentración está por debajo del límite de detección del ensayo.
VRS: RNA not detected or below LoD.	No se ha detectado ARN del VRS en la muestra. La muestra es negativa para este patógeno o su concentración está por debajo del límite de detección del ensayo.
hMPV: RNA not detected or below LoD.	No se ha detectado ARN del hMPV en la muestra. La muestra es negativa para este patógeno o su concentración está por debajo del límite de detección del ensayo.
Invalid - Retest Sample.	Resultado no válido del ensayo debido a un error en el control interno, como una extracción incorrecta o un arrastre de inhibidores. Es necesario repetir el análisis.

Las muestras que el **software ELITE InGenius** notifica como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de resultados. En este caso, el ARN del control interno no ha podido detectarse correctamente debido a problemas en el paso de amplificación o de extracción (degradación del ARN, pérdida de este durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only». Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de la extracción de una nueva alícuota en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Las muestras que se indican como «FluA: RNA not detected or below LoD», «FluB: RNA not detected or below LoD», «RSV: RNA not detected or below LoD» y «hMPV: RNA not detected or below LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar los ARN diana. En este caso, no puede descartarse que los ARN diana estén presentes en una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar el apartado «Características de rendimiento»).

Nota: Los resultados obtenidos con este ensayo deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Los resultados de la sesión de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados («Result Display») por personal que tenga la cualificación de administrador («Administrator») o analista («Analyst») y siga las instrucciones de la interfaz de usuario. La ventana «Result Display» permite imprimir y guardar los resultados de la sesión de la muestra como «Sample Report» y como «Track Report».

C. Exportación de los resultados de la muestra

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

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

El «Track Report» muestra los detalles de una sesión de trabajo ordenados por la pista seleccionada. El personal autorizado puede imprimir y firmar los informes «Sample Report» y «Track Report».

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del producto «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit» se definió utilizando exudados respiratorios en UTM, muestras de lavados broncoalveolares (LBA) y el sistema ELITE InGenius.

El LoD se definió analizando un panel de muestras de exudados respiratorios recogidas en UTM (COPAN Italia S.p.A.) y enriquecidas con material de referencia (Qnostics and Vircell) de virus de la gripe A (FluA), virus de la gripe B (FluB), virus respiratorio sincicial (VRS) y metaneumovirus humano (hMPV) a un título conocido. Se prepararon seis niveles de dilución empezando por una concentración más alta que el valor esperado para el límite de detección. Cada nivel de dilución se procesó en 12 duplicados utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». El nivel de detección se calculó mediante el análisis de regresión Probit de los datos como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Límite de detección (copias/mL) para muestras de exudados respiratorios y el sistema ELITE InGenius			
Diana	Límite de detección	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
FluA	433	318	837
FluB	409	317	725
VRS	359	267	688
Metaneumovirus humano	333	288	496

El valor del LoD calculado se verificó analizando 20 duplicados de muestras de exudados respiratorios y de LBA enriquecidas con materiales de referencia (Qnostics and Vircell) de FluA, FluB, VRS y hMPV a las concentraciones declaradas. Los resultados obtenidos respaldan las concentraciones declaradas de FluA, FluB, RSV y hMPV para las muestras de exudados respiratorios. En el caso de las muestras de LBA, el LoD se confirmó para el FluB, el VRS y el hMPV y, para el FluA, se verificó a 500 copias/mL.

Eficacia de detección (inclusividad)

La eficacia de detección de las diferentes cepas o colonias aisladas de FluA, FluB, VRS y hMPV del producto «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit» se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos de EBI ENA. Las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes se comprobaron en la alineación de las secuencias para el gen de la matriz (FluA, FluB y VRS) y el gen de la nucleoproteína (hMPV). Las regiones de hibridación presentaron conservación de la secuencia y ausencia de mutaciones importantes, por lo que cabe esperar una amplificación eficaz de todos los microorganismos analizados.

La eficacia de detección de diferentes cepas o colonias aisladas de FluA, FluB, VRS y hMPV también se evaluó analizando un panel de materiales certificados analizados a bajas concentraciones (aprox. 100 copias/reacción).

Se diluyeron y analizaron por triplicado muestras de ARN genómico certificado de ATCC (EE. UU.) y Zeptomatrix (EE. UU.) utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only».

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Inclusividad				
Muestras	Proveedor	Pos./Dup.	Ct medio	Resultado
FluA H1N1	ATCC	3/3	33,65	Positivo
FluA H3N2	ATCC	3/3	33,49	Positivo
FluA H1N1 (2009)	Zeptomatrix	3/3	30,78	Positivo
FluB Florida (Yamagata)	ATCC	3/3	35,92	Positivo
FluB Wisconsin (Yamagata)	ATCC	3/3	36,22	Positivo
FluB Victoria	Qnostics	3/3	31,07	Positivo
RSVA2	ATCC	3/3	35,84	Positivo
VRSA	Vircell	3/3	36,12	Positivo
VRSB	Vircell	3/3	31,12	Positivo
hMPVA	Zeptomatrix	3/3	33,39	Positivo
hMPVB	Zeptomatrix	3/3	32,46	Positivo

Todas las muestras analizadas se detectaron como positivas para el patógeno correcto cuando se utilizó el producto «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit».

Marcadores potencialmente interferentes (reactividad cruzada)

La reactividad cruzada potencial con otros microorganismos no intencionados del ensayo se evaluó mediante una comparación informática de las secuencias disponibles en las bases de datos de nucleótidos.

Las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de las sondas fluorescentes se revisaron en la alineación de las secuencias de otros microorganismos. El análisis de las regiones de hibridación demostró ausencia de homologías reseñables y no indicó ninguna reactividad cruzada potencial.

La ausencia de reactividad cruzada con otros microorganismos que puede encontrarse en las muestras clínicas de exudados respiratorios también se verificó analizando un panel de materiales de referencia certificados.

Las muestras de ADN o ARN genómicos de diferentes marcadores potencialmente interferentes (ATCC, ZeptoMatrix) se analizaron en tres duplicados utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only». Los ADN y ARN de cada microorganismo se enriquecieron con 500 ng por reacción de ADN genómico humano (Promega) con el fin de imitar la muestra clínica extraída.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada		
Microorganismos	Cepa	Resultado
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Bordetella pertussis</i>	Tohama I	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Bordetella parapertussis</i>	12822	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Colonia clínica aislada	Negativo, sin reactividad cruzada
CMV	ATCC, AD-169	Negativo, sin reactividad cruzada
Virus ECHO 4	ATCC, Pesascek	Negativo, sin reactividad cruzada
ADV	ATCC, Adenoid 6	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>P. jirovecii</i>	Colonia clínica aislada	Negativo, sin reactividad cruzada
Coronavirus SARS	Zeptomatrix	Negativo, sin reactividad cruzada
Coronavirus OC43	Zeptomatrix, OC43	Negativo, sin reactividad cruzada
Coronavirus E229	Zeptomatrix, E229	Negativo, sin reactividad cruzada
SARS-CoV-2	Zeptomatrix	Negativo, sin reactividad cruzada
Rinovirus 1A	Zeptomatrix, 1A	Negativo, sin reactividad cruzada
Virus paragripal 1	Zeptomatrix, Tipo 1	Negativo, sin reactividad cruzada
Virus paragripal 2	Zeptomatrix, Tipo 2	Negativo, sin reactividad cruzada
Virus paragripal 3	Zeptomatrix, Tipo 3	Negativo, sin reactividad cruzada
Virus de Coxsackie A9	ATCC, A9	Negativo, sin reactividad cruzada

Todas las muestras analizadas se detectaron como positivas para el patógeno correcto cuando se utilizó el producto «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit».

Marcadores potencialmente interferentes (interferencia)

La ausencia de inhibición debido a otros microorganismos no deseados encontrados en las muestras respiratorias se verificó analizando un panel de ADN y ARN genómico certificado de ATCC.

Las muestras de ADN y ARN genómico a altas concentraciones se enriquecieron con ADN genómico de FluA, FluB, VRS y hMPV a bajas concentraciones (aproximadamente 100 copias por reacción) y se analizaron por triplicado para cada marcador potencialmente interferente utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only».

Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Marcadores potencialmente interferentes: interferencia		
Microorganismos	Cepa	Resultado
Coronavirus SARS	Zeptomatrix	Positivo, sin inhibición
Coronavirus OC43	Zeptomatrix, OC43	Positivo, sin inhibición
Coronavirus E229	Zeptomatrix, E229	Positivo, sin inhibición
SARS-CoV-2	Zeptomatrix, USA-WA1/2020	Positivo, sin inhibición
Rinovirus 1A	Zeptomatrix, 1A	Positivo, sin inhibición
Virus paragripal 1	Zeptomatrix, Tipo 1	Positivo, sin inhibición
Virus paragripal 2	Zeptomatrix, Tipo 2	Positivo, sin inhibición
Virus paragripal 3	Zeptomatrix, Tipo 3	Positivo, sin inhibición
Virus de Coxsackie A9	ATCC, A9	Positivo, sin inhibición

Todos los patógenos de interés se detectaron correctamente en presencia de los microorganismos potencialmente interferentes mencionados anteriormente cuando se analizaron con el producto «Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB Kit».

Sustancias interferentes

Un panel de sustancias potencialmente interferentes a las concentraciones pertinentes más altas se analizó con el producto «Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit». Las sustancias analizadas fueron mucina, sangre humana, el antibiótico azitromicina, el corticoide beclometasona, el antihistamínico ebastina y el mucolítico hidrocloreto de ambroxol.

Las sustancias se añadieron individualmente a muestras de exudados respiratorios enriquecidas con los materiales de referencia de FluA, FluB, VRS y hMPV a concentraciones de 3 veces el LoD. Las muestras se procesaron en 3 duplicados utilizando el sistema ELiTe InGenius® en el modo de procesamiento «Extraction + PCR».

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Análisis de sustancias interferentes, %CV para las dianas						
Sustancia	Concentración	Pos./Dup.	FluA	FluB	VRS	Metaneumovirus humano
Sangre	10% v/v	3/3	2,56	1,92	1,14	3,88
Mucina	1 % m/v (10 mg/mL)	3/3	3,94	0,83	0,76	1,17
Azitromicina	0,2 µg/mL	3/3	2,93	1,29	2,17	1,31
Ambroxol	0,6 µg/mL	3/3	2,01	0,62	2,17	0,75
Beclometasona	64 ng/mL	3/3	3,85	1,36	2,22	1,46
Ebastina	0,4 µg/mL	3/3	3,96	0,89	3,20	2,92

Todas las muestras resultaron ser positivas para la diana de interés, tal como se esperaba. El coeficiente de variación porcentual (%CV) de los valores Ct fue inferior al 4 %.

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto «Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit» junto con el sistema ELiTe InGenius se evaluó analizando un panel de muestras de exudados respiratorios. El panel incluyó muestras enriquecidas con material de referencia (Qnostics and Vircell) de FluA, FluB, VRS y hMPV a una concentración de aproximadamente 3 veces el LoD.

La repetibilidad se obtuvo analizando las muestras del panel en tres duplicados, en dos sesiones al día, con el mismo lote de producto. Se utilizaron tres lotes de producto en tres días distintos con el mismo instrumento y con el mismo operador. Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELiTe InGenius en el modo «Extract + PCR». Los valores Ct de las dianas y del control interno se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión.

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

Repetibilidad entre lotes					
Muestra	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	% positivas
3 veces el LoD para FluA	18/18	33,22	0,59	1,79	100 %
3 veces el LoD para FluB	18/18	31,98	0,51	1,60	100 %
3 veces el LoD para VRS	18/18	32,84	0,60	1,84	100 %
3 veces el LoD para hMPV	18/18	32,38	0,69	2,12	100 %
IC	72/72	29,27	0,34	1,17	100 %

En el análisis de repetibilidad, el ensayo detectó las dianas esperadas y mostró un %CV bajo de valores Ct que no superó el 3 %.

Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto «Respiratory Viral PLUS ELiTe MGB® Kit» junto con el sistema ELiTe InGenius se evaluó analizando un panel de muestras de exudados respiratorios. El panel incluyó muestras enriquecidas con material de referencia (Qnostics and Vircell) de FluA, FluB, VRS y hMPV a una concentración de aproximadamente 3 veces el LoD.

La reproducibilidad se obtuvo analizando las muestras del panel en tres duplicados, en dos sesiones al día. Se analizaron tres lotes diferentes de producto en tres días distintos, en tres instrumentos distintos y con tres operadores distintos. Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELiTe InGenius en el modo «Extract + PCR». Los valores Ct de las dianas y del control interno se utilizaron para calcular el %CV, con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión.

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

Reproducibilidad					
Muestra	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	% positivas
3 veces el LoD para FluA	18/18	32,49	1,06	3,26	100 %
3 veces el LoD para FluB	18/18	31,64	0,56	1,76	100 %
3 veces el LoD para VRS	18/18	32,11	0,31	0,95	100 %
3 veces el LoD para hMPV	17/17	33,64	1,06	3,16	100 %
IC	72/72	28,83	0,39	1,36	100 %

En el análisis de reproducibilidad, el ensayo detectó las dianas esperadas y mostró un %CV bajo de valores Ct que no superó el 4 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando muestras clínicas de exudados respiratorios recogidas en UTM (COPAN Italia S.p.A.) y de LBA certificadas como negativas mediante un ensayo de diagnóstico *in vitro* con marcado CE.

Las muestras se analizaron en el ensayo utilizando el sistema ELiTe InGenius.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	Positivas	Negativas	Especificidad diagnóstica
Exudado respiratorio negativo recogido en UTM	41	0	41	100 %
LBA negativo	40	0	40	100 %

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando muestras clínicas de exudados respiratorios recogidas en UTM (COPAN Italia S.p.A.) y de LBA certificadas como positivas mediante un ensayo de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para FluA, FluB, VRS o hMPV.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo se evaluó analizando muestras clínicas positivas y muestras clínicas negativas enriquecidas con material certificado de FluA, FluB, VRS y hMPV. Las muestras artificiales FluA, FluB, VRS y hMPV se enriquecieron a concentraciones de 3 veces, 5 veces y 10 veces el LoD.

Las muestras se analizaron en el ensayo utilizando el sistema ELiTe InGenius.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras de exudados respiratorios recogidas en UTM	N	Positivas	Negativas	Sensibilidad diagnóstica
Positivas para FluA	31	28	3	95,6 %
Enriquecidas con FluA	59	58	1	
Positivas para FluB	30	30	0	
Enriquecidas con FluB	29	29	0	100 %
Positivas para VRS	34	33	1	
Enriquecidas con VRS	30	30	0	
Positivas para hMPV	17	17	0	100 %
Enriquecidas con hMPV	27	27	0	

Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

Muestras de LBA	N	Positivas	Negativas	Sensibilidad diagnóstica
Positivas para FluA	28	28	0	96,5 %
Enriquecidas con FluA	29	27	2	
Positivas para FluB	13	12	1	97,7 %
Enriquecidas con FluB	30	30	0	
Positivas para VRS	18	18	0	100 %
Enriquecidas con VRS	30	30	0	
Positivas para hMPV	3	3	0	100 %
Enriquecidas con hMPV	28	28	0	

Nota: Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con la matriz y el instrumento se incluyen en la documentación técnica del producto «Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit», FTP 160ING.

BIBLIOGRAFÍA

- W. Zhang et al. (1991) *J. Virol. Methods* 33: 165 - 189
J. Stockton et al. (1998) *J. Clin. Microbiol.* 36: 2990 - 2995
E. J. Kuypers et al. (2005) *J. Clin. Virology* 33: 299-305
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit
reactivos para la retrotranscriptasa del ARN y
la amplificación en tiempo real del ADN complementario

REF RTS160ING

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este producto está diseñado para uso exclusivo *in vitro*.

Utilizar este producto únicamente con muestras clínicas de exudados respiratorios y de LBA. En la actualidad, no se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con las siguientes muestras clínicas: esputo, gárgaras de garganta, aspirados nasofaríngeos y sobrenadante de cultivo celular.

No utilizar este producto con una cantidad de ADN o ARN extraído superior a 1 µg, pues una alta cantidad de ácidos nucleicos puede inhibir las reacciones de retrotranscriptasa y de amplificación y dar lugar a resultados no válidos.

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

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

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

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

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

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

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

En caso de coinfección, la sensibilidad de una diana puede verse afectada por la amplificación de una segunda diana.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden ser no válidos debido a un error del control interno. En este caso, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de extracción, lo que puede provocar retrasos a la hora de obtener los resultados finales.

Asimismo, los posibles polimorfismos, así como las eliminaciones o inserciones existentes en la región del ARN diana cubierto por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección del ARN diana.

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

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, existe un riesgo residual de obtener con él resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos. Este riesgo residual no puede eliminarse ni reducirse aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Reacción no válida del control positivo	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como del control positivo. Comprobar los volúmenes de la mezcla completa de reacción, así como del control positivo.
Error en la preparación de la mezcla completa de reacción.	Comprobar los volúmenes de los reactivos utilizados durante la preparación de la mezcla completa de reacción.
Degradación de la mezcla completa de reacción o de sus componentes.	No utilizar la mezcla completa de reacción para más de una sesión (3 horas en el área de inventario). No dejar la mezcla completa de reacción a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Volver a preparar la mezcla completa de reacción. Utilizar una nueva alícuota de los componentes.
Degradación del control positivo.	Utilizar una nueva alícuota de control positivo.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Reacción no válida del control negativo	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como del control negativo. Comprobar los volúmenes de la mezcla completa de reacción, así como del control negativo.
Contaminación de la mezcla completa de reacción o de sus componentes.	Volver a preparar la mezcla completa de reacción. Utilizar una nueva alícuota de los componentes.
Contaminación del control negativo	Utilizar una nueva alícuota de agua de calidad para biología molecular.
Contaminación del área de extracción, de las gradillas o del bloque de inventario.	Limpia las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

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

Reacción no válida de la muestra	
Posibles causas	Soluciones
Error de la configuración de la sesión.	Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como de la muestra. Comprobar los volúmenes de la mezcla completa de reacción, así como de la muestra.
Error en la preparación de la mezcla completa de reacción.	Comprobar los volúmenes de los reactivos utilizados durante la preparación de la mezcla completa de reacción.
Degradación de la mezcla completa de reacción o de sus componentes.	No utilizar la mezcla completa de reacción para más de una sesión. No dejar la mezcla completa de reacción a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. No exponer la mezcla RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos. Volver a preparar la mezcla completa de reacción. Utilizar una nueva alícuota de los componentes.
Degradación del control interno.	Utilizar nuevas alícuotas del control interno.
Inhibición debido a sustancias interferentes con las muestras.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua de calidad para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only». Repetir la extracción con una dilución de 1:2 en agua de calidad para biología molecular de la muestra primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».
Degradación de la muestra.	Repetir la extracción con una dilución 1:2 en agua de calidad para biología molecular de la muestra principal en una ejecución en el modo «Extract + PCR». Utilizar una nueva alícuota de la muestra
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Error 30103	
Posibles causas	Soluciones
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra.	Si se observa una amplificación notable en el gráfico de PCR: - Seleccionar la pista relativa a la muestra y aprobar manualmente el resultado. Si se necesita un valor Ct: - Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua de calidad para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» o - Repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua de calidad para biología molecular de la muestra primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Error de TH	
Posibles causas	Soluciones
Muestra con una concentración demasiado alta de la diana.	Si se observa una amplificación notable en el punto de referencia negativo del gráfico de PCR: - Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua de calidad para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» o - Repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua de calidad para biología molecular de la muestra primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

SÍMBOLOS

REF

Número de catálogo



Límite superior de temperatura

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad (último día del mes)

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*.



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



Contenido suficiente para «N» análisis.



Atención: Consúltense las instrucciones de uso.

CONT

Contenido



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

Este producto contiene reactivos fabricados por Life Technologies Corporation, que se venden conforme a acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus afiliadas y Life Technologies Corporation. La compra de este producto incluye derechos limitados, no transferibles para usar únicamente esta cantidad de producto exclusivamente para las actividades del comprador directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre la compra de una licencia de este producto para fines distintos de los establecidos anteriormente, contactar con Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Teléfono: +1 (760) 603-7200. Fax: +1 (760) 602-6500. Correo electrónico: outlicensing@thermofisher.com.

Los reactivos de detección ELITE MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 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, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256, así como por patentes europeas, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 y por solicitudes de patentes actualmente pendientes.

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