Instructions for use

CMV RNA ELITe MGB® Kit

Reactivos para retrotranscriptasa de ARN y PCR en tiempo real

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTS115ING

UDI 08033891487324

CE 0123

IVD

HISTORIAL DE CAMBIOS

<table>
<tr><th>Rev.</th><th>Información del cambio</th><th>Fecha (dd/mm/aa)</th></tr>
<tr><td>05</td><td>Actualización del apartado: «Otros productos necesarios»
Actualización del apartado: «Nota para los usuarios»
Actualización del apartado: «Bibliografía»</td><td>04/09/25</td></tr>
<tr><td>04</td><td>Ampliación del uso del producto durante un período de 60 días después de la primera apertura.
Cambio de probetas y tapones para mejorar el proceso.</td><td>03/06/25</td></tr>
<tr><td>03</td><td>Ampliación del uso con el ELITe BeGenius
Nuevo diseño de los gráficos y del contenido de las instrucciones de uso</td><td>29/11/24</td></tr>
<tr><td>02</td><td>Actualización para el cumplimiento de los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
NOTA!
Los códigos de lote que aparecen en la tabla siguiente, y que siguen en el mercado con la etiqueta «Solo uso en investigación» (RUO, por sus siglas en inglés), no se retirarán. Estos productos pueden utilizarse según las fechas de caducidad indicadas a continuación. Si tiene estos lotes, utilícelos según el uso previsto descrito en las instrucciones de uso para productos RUO y solo en asociación con los productos relacionados STD115ING y CTR115ING (también con la etiqueta RUO). Para obtener las instrucciones de uso para productos RUO, póngase en contacto con el personal de ELITechGroup.
<table>
<tr><th>REF. DEL PRODUCTO</th><th>Código de lote</th><th>Fecha de caducidad</th></tr>
<tr><td>RTS115ING</td><td>U0524-001</td><td>31/03/2025</td></tr>
<tr><td>RTS115ING</td><td>U1123-075</td><td>31/01/2025</td></tr>
</table>
No utilice el nuevo producto RTS115ING comercializado conforme al Reglamento europeo sobre productos de diagnóstico in vitro en asociación con los productos relacionados STD115ING y CTR115ING, que siguen en el mercado con la etiqueta RUO.
El uso del nuevo producto RTS115ING comercializado conforme al Reglamento europeo sobre productos de diagnóstico in vitro requiere el uso de Assay Protocols (protocolos de ensayo) asociados a productos de diagnóstico in vitro con marcado CE. Si desea obtener información adicional, póngase en contacto con el personal de ELITechGroup.</td><td>03/06/24</td></tr>
<tr><td>00–01</td><td>Desarrollo de un nuevo producto con los cambios consiguientes</td><td>-</td></tr>
</table>

INDICE

1 USO PREVISTO 4
2 PRINCIPIO DEL ENSAYO 4
3 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO 4
4 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO 5
5 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO 5
6 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS 5
7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES 6
8 MUESTRAS Y CONTROLES 7
9 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius 9
10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius 17
11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO 24
12 BIBLIOGRAFÍA 34
13 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO 35
14 PROBLEMAS Y SOLUCIONES 36
15 SÍMBOLOS 39
16 NOTA PARA LOS USUARIOS 39
17 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA 39
Appendix A QUICK START GUIDE 41

1 USO PREVISTO

El producto **CMV RNA ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cuantitativo de ácidos nucleicos mediante retrotranscriptasa y PCR en tiempo real para la detección y la identificación de **ARNm del virión de citomegalovirus humano (ARN de CMV)** extraído de muestras clínicas acelulares.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELITe InGenius®** y **ELITe BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la retrotranscriptasa, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados utilizando muestras humanas de plasma recogido en EDTA.

El producto está concebido para su uso como ayuda en el seguimiento de pacientes con una infección por CMV que siguen un tratamiento antivírico con inhibidores del complejo de la terminasa del CMV.

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

El producto no está concebido para utilizarlo con el fin de detectar la presencia de o la exposición a agentes contagiosos en sangre, componentes de la sangre, células, tejidos, órganos o cualquiera de sus derivados a la hora de evaluar su idoneidad para una transfusión, un trasplante o una administración de células. Este producto está concebido para su uso en la detección de infecciones por el CMV en mujeres embarazadas:

2 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este es un ensayo cuantitativo en un solo paso de retrotranscriptasa y PCR en tiempo real para la detección de ARN de CMV aislado de muestras, sometido a retrotranscriptasa y amplificado a continuación utilizando una mezcla completa de reacción que contiene cebadores y sondas con la tecnología ELITe MGB®.

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

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

3 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **CMV RNA ELITe MGB Kit** incluye los siguientes componentes:

- **CMV-RNA PCR Mix**, una mezcla de PCR optimizada y estabilizada que contiene los cebadores y las sondas específicos para:

- ARNm de UL21.5 (región empalmada), detectado en el canal **CMV RNA**; la sonda se estabiliza mediante la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher® y se marca con el colorante FAM.

El Internal Control (**IC**), específico para una región del ARN genómico del bacteriófago MS2, detectado en el canal**IC**; la sonda se estabiliza con la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher y se marca con el colorante AquaPhluor® 525 (AP525).

La mezcla**CMV RNA PCR Mix**también contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot-start»). Cada vial contiene**600 µL**de solución, suficiente para**24 análisis**(procesando al menos 5 muestras por sesión).

- **RT EnzymeMix**, una mezcla optimizada y estabilizada de enzimas para retrotranscriptasa. Cada vial contiene**20 µL**de solución, suficiente para**48 análisis**(procesando al menos 5 muestras por sesión).

El producto**CMV RNA ELITe MGB Kit**contiene suficientes reactivos para**realizar 96 análisis en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius**cuando se utilizan 20 µL de**CMV PCR Mix**y 0,3 µL de**RT EnzymeMix**en cada reacción.

4 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Tabla 1

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
CMV RNA PCR Mix ref. RTS115ING	Mezcla de reactivos para retrotranscriptasa y PCR en tiempo real Probeta con **tapón de color NATURAL**	4×600 µL	-
RT EnzymeMix ref. RTS003-RT	Enzimas de retrotranscriptasa en una probeta con **tapón con inserto negro**	2 x 20 µL	-

5 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.

- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.

- Agitador vórtex.

- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 5000 rpm).

- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 13.000 rpm).

- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (rango de volumen: 0,5–1000 µL).

- Probetas estériles de 2,0 mL con tapón roscado (Sarstedt, ref. 72.694.005).

- Probetas estériles de 0,5 mL con tapón roscado (ref. Sarstedt 72.730.005).

- Agua para biología molecular.

6 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

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

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

Tabla 2

Instrumentos y software	Productos y reactivos
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030) **ELITe InGenius Software** versión 1.3.0.19 (o posterior). **CMVRNA ELITe_STD**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores **CMVRNA ELITe_PC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control. **CMVRNA ELITe_NC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) para el análisis del Negative Control. **CMVRNA ELITe_PL_600_50**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de plasma	**CMV RNA ELITe Standard** (EG SpA, ref. STD115ING) **CMV RNA - ELITe Positive Control** (EG SpA, ref. CTR115ING) **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE) **ELITe InGenius SP 1000** (EG SpA, ref. INT033SP1000) Consumibles para el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** (consulte las instrucciones de uso del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius)
ELITe BeGenius (EG SpA, ref. INT040) **ELITe BeGenius Software** versión 2.2.1. (o posterior) **CMVRNA ELITe_Be_STD**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores **CMVRNA ELITe_Be_PC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control. **CMVRNA ELITe_Be_NC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Negative Control **CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de plasma	

7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado exclusivamente para uso in vitro.

7.1 Advertencias y precauciones generales

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

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

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

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

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

Leer atentamente todas las instrucciones incluidas antes de realizar el ensayo.

Durante la realización del ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.

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

Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

7.2 Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

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

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

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

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

Los productos de extracción deben manipularse de forma que se evite su dispersión al medio ambiente y la contaminación de la zona de trabajo del instrumento.

Con el fin de evitar la dispersión del producto de PCR hacia el entorno o la contaminación por arrastre de sustancias, los «PCR Cassettes» deben manipularse con cuidado y no deben abrirse nunca.

7.3 Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

Tabla 3

Componente	Temperatura de almacenamiento	Uso a partir de la primera apertura	Ciclos de congelación y descongelación
CMV RNA PCR Mix	−20 °C o una temperatura inferior (protegido de la luz)	60 días	máximo cinco
RT EnzymeMix	−20 °C o menos	60 días	máximo diez veces, durante un máximo de diez minutos a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C

8 MUESTRAS Y CONTROLES

8.1 Muestras

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

Tabla 4

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	−20 °C ± 10 ° C	−70 °C ± 15 ° C
Plasma	EDTA	≤24 horas	≤24 horas	≤1 mes	No analizado

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!

Las muestras de sangre utilizadas para la preparación del plasma deben recogerse en EDTA, transportarse y conservarse a temperatura ambiente o a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de 24 horas antes de centrifugarlas

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

Tabla 5 Protocolos de ensayo para el producto CMV RNA ELITe MGB Kit

Muestra	Instrumento	Nombre del protocolo de ensayo	Informe	Características
Plasma recogido en EDTA	**ELITe InGenius**	**«CMVRNA ELITe_PL_600_50»**	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 600 µL Volumen de elución de extracción: 50 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1,7 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
	ELITe BeGenius	**CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50**	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 600 µL Volumen de elución de extracción: 50 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1,0 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL

Para todos los protocolos, es preciso verter 600 µL de muestra de plasma en el **«Extraction Tube» (Tubo de extracción)**, en el caso del ELITe InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del ELITe BeGenius.

NOTA!

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

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

No utilizar plasma recogido en heparina, ya que se sabe que es un inhibidor de la retrotranscriptasa y de la PCR.

Consultar «Sustancias potencialmente interferentes» en la sección «11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO page 24» para comprobar los datos relativos a tales sustancias.

8.2 Calibradores y controles de PCR

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

- Para la curva de calibración, utilizar los cuatro niveles del producto **CMV RNA ELITe Standard** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **CMVRNA ELITe_STD** o **CMVRNA ELITe_Be_STD**.

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

- Para el Positive Control, utilizar el producto **CMV RNA - ELITe Positive Control** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **CMVRNA ELITe_PC** o **CMVRNA ELITe_Be_PC**.
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit), junto con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **CMVRNA ELITe_NC** o **CMVRNA ELITe_Be_NC**.

NOTA!

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

Las curvas de calibración caducan **a los 60 días**, después de los cuales es necesario volver a realizar la calibración. Los resultados del control de la PCR caducan **a los 15 días**, después de los cuales es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control.

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

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

8.3 Controles de calidad

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

9 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius

El procedimiento para utilizar el producto **CMV RNA ELITe MGB Kit** con el **ELITe InGenius** comprende tres pasos:

Tabla 6

PASO 1	Verificación de la disponibilidad del sistema	
PASO 2	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
		B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
		C) Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
		D) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Tabla 6 (continued)

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

9.1 PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

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

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

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

9.2 PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **CMV RNA ELITe MGB Kit** puede utilizarse con el instrumento **ELITe InGenius** para realizar las siguientes tareas:

A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)

B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

C. Sesión de calibración en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Todos los parámetros necesarios están incluidos en los Assay Protocols (protocolos de ensayo) disponibles en el instrumento y se cargan automáticamente cuando se selecciona el Assay Protocol (protocolo de ensayo) correspondiente.

NOTA!

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

Antes de configurar una sesión:

1. Descongelar las probetas necesarias de**PCR Mix**a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 análisis en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 5 análisis por sesión). Mezclar mediante vórtex a baja velocidad tres veces durante 10 segundos, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservar en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

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

2. Tomar las probetas de**RT EnzymeMix**que se necesiten. Cada probeta es suficiente para 48 análisis en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 5 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

la mezcla**RT EnzymeMix**no debe exponerse a temperaturas superiores a −20 °C durante más de 10 minutos.

3. Preparar una probeta de 2 mL (Sarstedt ref. 72.694.005, no incluida en el kit) para la**mezcla completa de reacción**y etiquetarla con un rotulador permanente.
4. Calcular los volúmenes necesarios de**PCR Mix**y de**RT EnzymeMix**para preparar la**mezcla completa de reacción**en función del número de muestras (N) que vayan a analizarse, tal como se describe en la tabla siguiente.

Tabla 7

Número de muestras (N)	la mezcla de PCR	RT EnzymeMix
1 ≤N ≤5	(N + 1) × 20 µL	(N + 1) × 0,3 µL
6 ≤N ≤11	(N + 2) × 20 µL	(N + 2) × 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

5. Preparar la**mezcla completa de reacción**vertiendo los volúmenes calculados de los dos componentes en la probeta de 2 mL etiquetada. Mezclar mediante vórtex a baja velocidad tres veces durante 10 segundos, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservar en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

La**mezcla completa de reacción**puede utilizarse en el transcurso de**7** horas si se conserva en un bloque refrigerado (para dos sesiones de 3 horas cada una y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). La mezcla completa de reacción**no puede**guardarse para reutilizarla.

NOTA!

La**mezcla completa de reacción**es fotosensible, por lo que no debe exponerse a la luz directa.

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

Tabla 8

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento«Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
1	**Identificar las muestras**y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente, mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Para este ensayo, es necesario verter 600 µL de muestra en un «Extraction Tube» (tubo de extracción) previamente etiquetado. **Descongelar**las**probetas de CPE**necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	**Descongelar el «Elution Tube»**(Tubo de elución) que contiene los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.
2	Seleccionar**«Perform Run» (Realizar ejecución)**en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar**«Perform Run» (Realizar ejecución)**en la pantalla «Home» (Inicio).

Tabla 8 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento«Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
3	Asegurarse de que el valor mostrado de «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.	Asegurarse de que el valor mostrado de «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.
4	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.
5	**Seleccionar**el**Assay Protocol (Protocolo de ensayo)**en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el**Assay Protocol (Protocolo de ensayo)**en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
6	Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» (Protocolo) sea «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	Seleccionar «PCR Only» en la columna «Protocol» (Protocolo).
7	En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar la posición de carga «Extraction Tube» (Tubo de extracción) para la muestra. Asegurarse de que la opción**«Dilution factor» (Factor de dilución)**esté configurada a**«1,7»**.	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» (Position de la muestra «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]) Asegurarse de que la opción**«Dilution factor» (Factor de dilución)**esté configurada a**«1,7»**.
8	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
9	**Cargar el CPE**y la**mezcla completa de reacción**en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote del CPE y de la mezcla PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	**Cargar**la**mezcla completa de reacción**en el «Inventory Block» (administrador de inventarios), en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la mezcla de PCR, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
12	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
13	**Cargar**el PCR Cassette, los cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 1000, así como todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse.	**Cargar**el PCR Cassette y «Elution Tube» (Tubo de elución) con las muestras extraídas.
14	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
15	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
16	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

Tabla 9

	C. Sesión de calibración «PCR Only» (Solo PCR)	D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control «PCR Only» (Solo PCR)
1	**Descongelar**las probetas de calibrador**Q-PCR Standard tubes**(Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	**Descongelar las probetas de Positive Control**a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. **Prepara**el**Negative Control**vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en el «Elution Tube» (tubo de elución) que se incluye con el ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Seleccionar**«Perform Run» (Realizar ejecución)**en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar**«Perform Run» (Realizar ejecución)**en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Asegurarse de que el valor mostrado de «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.	Asegurarse de que el valor mostrado de «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.
4	Para el calibrador Q-PCR, asignar el carril («Track»), **seleccionar**el**Assay Protocol (protocolo de ensayo)**en la columna «Assay» (Ensayo) y, después, rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de los reactivos.	Para los controles, asignar el carril («Track») y**seleccionar**el**Assay Protocol (protocolo de ensayo)**en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». Introducir el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control y del agua para biología molecular.
5	En la columna «Protocol», asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only».	En la columna «Protocol», asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only».
6	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).
7	**Cargar**la**mezcla completa de reacción**en el «Inventory Block» (administrador de inventarios), en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la mezcla de PCR, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	**Cargar**la**mezcla completa de reacción**en el «Inventory Block» (administrador de inventarios), en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la mezcla de PCR, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
8	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
9	Verificar las puntas en el área de**«Tip Racks» (rack de puntas)**de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	**Cargar**el PCR Cassette y las probetas de Q-PCR Standard.	**Cargar**el PCR Cassette y las probetas de Positive Control y de Negative Control.
12	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
13	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
14	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

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

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en el «Elution Tube» (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior durante un máximo de un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

NOTA!

La**mezcla completa de reacción**puede guardarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 horas (para dos sesiones de 3 horas cada una y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión. La mezcla completa de reacción**no puede**conservarse para reutilizarla.

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

9.3 PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

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

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

NOTA!

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

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

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

Validación de la curva de calibración

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

Las curvas de calibración, específicas para el lote de reactivos de PCR, se guardan en la base de datos («Calibration»), por lo que el personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede verlas siguiendo las instrucciones de la interfaz.

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

NOTA!

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

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

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

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

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

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

NOTA!

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

NOTA!

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

Validación de los resultados de la muestra

El **ELITe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana (canal **CMV RNA**) y para el Internal Control (canal **IC**) con los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) **CMVRNA ELITe_PL_600_50**. Los valores resultantes del Ct de la diana se convierten en concentración.

Los resultados se muestran en la pantalla «Results Display» (Presentación de resultados).

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

Tabla 10

1) Curva de calibración	Estado
Calibradores CMV RNA Q-PCR Standard	APROBADO
2) Positive Control	**Estado**
Positive Control de CMV RNA	APROBADO
3) Negative Control	Estado
Negative Control de CMV RNA	APROBADO

El **ELITe InGenius Software** interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo). En la tabla siguiente se muestran los posibles mensajes de los resultados.

Para cada muestra, el sistema muestra una combinación de los siguientes mensajes y especifica si los ARN de los patógenos se han detectado o no.

Tabla 11

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

NOTA!

La cuantificación de ARN de CMV solo puede expresarse en copias/mL y no puede rastrearse a la unidad internacional de la OMS, pues este estándar se refiere al ADN genómico de CMV.

Muestras notificadas como «Invalid-Retest Sample» (No válido. Volver a probar muestra): en este caso, no se ha detectado correctamente ARN del Internal Control, lo que puede deberse a problemas en los pasos de obtención de la muestra, extracción, retrotranscriptasa o

PCR (por ejemplo, recogida incorrecta de la muestra, degradación o pérdida de ARN durante la extracción o presencia de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si queda un volumen de eluido suficiente, dicho eluido puede volver a analizarse (tal cual o diluido) con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de extracción de una nueva muestra utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR); consultar la sección «14 PROBLEMAS Y SOLUCIONES page 36».

Las muestras que se notifican como «CMV RNA: RNA Not Detected or below LoD copies/mL» (CMV ARN: ARN no detectado o por debajo de LoD copias/mL) son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ARN de CMV. En este caso, puede que la muestra sea negativa para ARN de CMV, o que haya ARN de CMV a una concentración inferior al límite de detección del ensayo (ver sección11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO page 24).

Si se detectan muestras positivas para ARN de CMV a una concentración inferior al límite de detección (y al límite inferior de cuantificación) del ensayo, estas se notifican como «CMV RNA: RNA Detected, quantity below “LLoQ” copies/mL» (ARN de CMV: ARN detectado, cantidad por debajo del LLoQ en copias/mL); consultar la sección «11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO page 24».

Las muestras positivas para ARN de CMV dentro del rango de medición lineal (consultar la sección «11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO page 24») se detectan y notifican como «CMV RNA: RNA Detected, quantity equal to “XXX” copies / mL» (CMV ARN:ARN detectado, cantidad igual a “XXX” copias/mLL).

Las muestras positivas para ARN de CMV que se encuentran por encima del límite superior de cuantificación se notifican como «CMV RNA: RNA detected, quantity beyond ULoQ copies/mL» (ARN de CMV: ARN detectado, cantidad más allá del UloQ copias/ml) y no son aptas para la cuantificación. En caso necesario, es posible diluir la muestra antes de la extracción o de la PCR y volver a analizarla para obtener resultados dentro del rango de medición lineal del ensayo.

NOTA!

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

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

Generación del informe de los resultados de la muestra

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

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

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

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

10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius

El procedimiento para utilizar el producto **CMV RNA ELITe MGB Kit** con el **ELITe BeGenius** comprende tres pasos:

Tabla 12

PASO 1	Verificación de la disponibilidad del sistema	
PASO 2	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
		B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
		C) Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
		D) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

Tabla 12 (continued)

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

PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

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

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

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

PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **CMV RNA ELITe MGB Kit** puede utilizarse con el instrumento **ELITe BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)

B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

C. Sesión de calibración en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

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

NOTA!

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

Antes de configurar una sesión:

1. Descongelar las probetas necesarias de**PCR Mix**a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para**24 análisis**en condiciones óptimas de uso, es decir, realizando al menos 5 análisis por sesión. Mezclar en vórtex a baja velocidad durante 10 segundos tres veces y, a continuación, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

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

2. Tomar las probetas de**RT EnzymeMix**que se necesiten. Cada probeta es suficiente para**48 análisis**en condiciones óptimas de uso, es decir, realizando al menos 5 análisis por sesión. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

la mezcla**RT EnzymeMix**no debe exponerse a temperaturas superiores a −20 °C durante más de 10 minutos.

3. Preparar una probeta de 2 mL (Sarstedt ref. 72.694.005, no incluida en el kit) para la**mezcla completa de reacción**y etiquetarla con un rotulador permanente.
4. Calcular los volúmenes necesarios de**PCR Mix**y de**RT EnzymeMix**para preparar la**mezcla completa de reacción**en función del número de muestras (N) que vayan a analizarse, tal como se describe en la tabla siguiente.

Tabla 13

Número de muestra (N)	la mezcla de PCR	RT EnzymeMix
1 ≤N ≤5	(N + 1) × 20 µL	(N + 1) × 0,3 µL
6 ≤N ≤11	(N + 2) × 20 µL	(N + 2) × 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL
13 ≤N ≤18	(N + 3) × 20 µL	(N + 3) × 0,3 µL
19 ≤N ≤23	(N + 4) × 20 µL	(N + 4) × 0,3 µL
N = 24	580 µL	8,7 µL

5. Preparar la**mezcla completa de reacción**vertiendo los volúmenes calculados de los dos componentes en la probeta de 2 mL etiquetada. Mezclar mediante vórtex a baja velocidad tres veces durante 10 segundos, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservar en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

La**mezcla completa de reacción**puede utilizarse en el transcurso de**7** horas si se conserva en un bloque refrigerado (para dos sesiones de 3 horas cada una y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). La mezcla completa de reacción**no puede**guardarse para reutilizarla.

NOTA!

La**mezcla completa de reacción**es fotosensible, por lo que no debe exponerse a la luz directa.

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

Tabla 14

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento«Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
1	**Identificar las muestras**y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente, mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Para este ensayo, es preciso verter 600 µL de muestra en una probeta Sarstedt de 2 ML previamente etiquetada (no incluida). Cualquier volumen sobrante se dejará en el «Extraction Tube» (Tubo de extracción) utilizando el instrumento ELITe BeGenius. **Descongelar**las**probetas de CPE**necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	En caso necesario,**descongelar los «Elution Tubes»**(Tubos de elución) que contienen los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.
2	Seleccionar**«Perform Run» (Realizar ejecución)**en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar**«Perform Run» (Realizar ejecución)**en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Extraer todas las gradillas de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.
4	Seleccionar el «Run Mode»:**«Extract + PCR» (Extracción + PCR)**.	Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR).
5	**Cargar las muestras**en la «Sample Rack» (rack de muestras). Cuando se cargan probetas secundarias «2 mL Tube», utilizar los adaptadores azules para la «Sample Rack» (rack de muestras).	**Cargar las muestras**en la «Elution Rack» (rejilla de elución).
6	Insertar la «Sample Rack» (rack de muestras) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 5 (L5). Introducir el ID de la muestra para cada posición utilizada. Si se cargan probetas secundarias, marcar la probeta de 2 mL como «2 mL Tube». Si las probetas secundarias no tienen códigos de barras, introducir manualmente el ID de las muestras.	Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit» comenzando por el «Lane» 3 (L3). Para cada «Position» (posición), introducir el «SID» (ID de la muestra), la «Sample matrix» (matriz de la muestra), el «Extraction Kit» (kit de extracción) y el «Extracted Eluate Volume» (volumen de eluido extraído).
7	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
8	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 600 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 600 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.
9	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	Si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6.	Si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6.
12	Cargar los «Elution Tube» (Tubos de elución) en la «Elution Rack» (rejilla de elución); las probetas de elución pueden etiquetarse con un código de barras para mejorar la rastreabilidad.	No aplicable
13	Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). Si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento utilizando el «Lane 2» (L2).	No aplicable
14	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	No aplicable

Tabla 14 (continued)

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento«Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
15	**Cargar el CPE**y la**mezcla completa de reacción**en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	**Cargar la mezcla completa de reacción**en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
16	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/ elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). Para cada PCR Mix o cada CPE, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote) , la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/ elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). Para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie) , el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
17	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
18	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
19	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
20	Cargar la**«PCR Rack»**con el**PCR Cassette**en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la**«PCR Rack»**con el**PCR Cassette**en la «Inventory Area» (área del inventario).
21	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
22	Cargar la**«Extraction Rack» (rejilla de extracción)**con los cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 1000 y los consumibles de extracción necesarios.	No aplicable
23	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
24	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

Tabla 15

	C. Sesión de calibración «PCR Only» (Solo PCR)	D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control «PCR Only» (Solo PCR)
1	**Descongelar**las probetas de calibrador**Q-PCR Standard tubes**(Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	**Descongelar las probetas de Positive Control**a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. **Preparar**el**Negative Control**vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en el «Elution Tube» (tubo de elución) que se incluye con el ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.
4	Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).	Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR).
5	**Cargar las probetas de Q-PCR Standard**en la «Elution Rack» (rejilla de elución).	**Cargar**las**probetas de Positive Control y de Negative Control**en la «Elution Rack» (rejilla de elución).
6	**Insertar**la**«Elution Rack»**(rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo) , el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	**Insertar**la**«Elution Rack»**(rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo) , el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
7	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
8	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 600 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 600 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 50 µL.
9	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	**Cargar**la**mezcla completa de reacción**en la «Reagent/ Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	**Cargar**la**mezcla completa de reacción**en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
12	Insertar la**«Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/ elución)**en el «Lane» 2 (L2) de la «Cooler Unit». Para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie) , el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la**«Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución)**en el «Lane» 2 (L2) de la «Cooler Unit». Para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie) , el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
13	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
14	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
15	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.

Tabla 15 (continued)

	C. Sesión de calibración «PCR Only» (Solo PCR)	D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control «PCR Only» (Solo PCR)
16	Cargar la «**PCR Rack**» con el**PCR Cassette**en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «**PCR Rack**» con el**PCR Cassette**en la «Inventory Area» (área del inventario).
17	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
18	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
19	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

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

NOTA!

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

NOTA!

La**mezcla completa de reacción**puede guardarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 horas (para dos sesiones de 3 horas cada una y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión. La mezcla completa de reacción**no puede**conservarse para reutilizarla.

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

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

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

NOTA!

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

El instrumento **ELITe BeGenius** genera los resultados con el producto **CMV RNA ELITe MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

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

NOTA!

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

11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

11.1 Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del ensayo se determinó con muestras de plasma en el ELITe InGenius utilizando una dilución de material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín). Se realizó un análisis de regresión de Probit en los resultados y el LoD se definió como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 16 Límite de detección para muestras de plasma y el ELITe InGenius

Diana	Límite de detección	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
ARN de CMV	0,19 ufp/mL	0,15 ufp/mL	0,29 ufp/mL
	30 copias/mL	N/A	N/A

El valor calculado para el LoD se verificó analizando muestras de plasma enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a la concentración declarada. Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana.

El valor calculado para el LoD, 30 copias/mL, se verificó analizando en el ELITe BeGenius muestras de plasma enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (NotoVir) a la concentración declarada. Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana.

11.2 Rango de medición lineal

El rango de medición lineal del ensayo se determinó con muestras de plasma en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius utilizando diluciones de material de referencia de ARN de CMV (NoToVir). Se realizó un análisis de regresión lineal en los resultados y se verificó el rango de medición lineal.

Los resultados se muestran en las figuras siguientes.

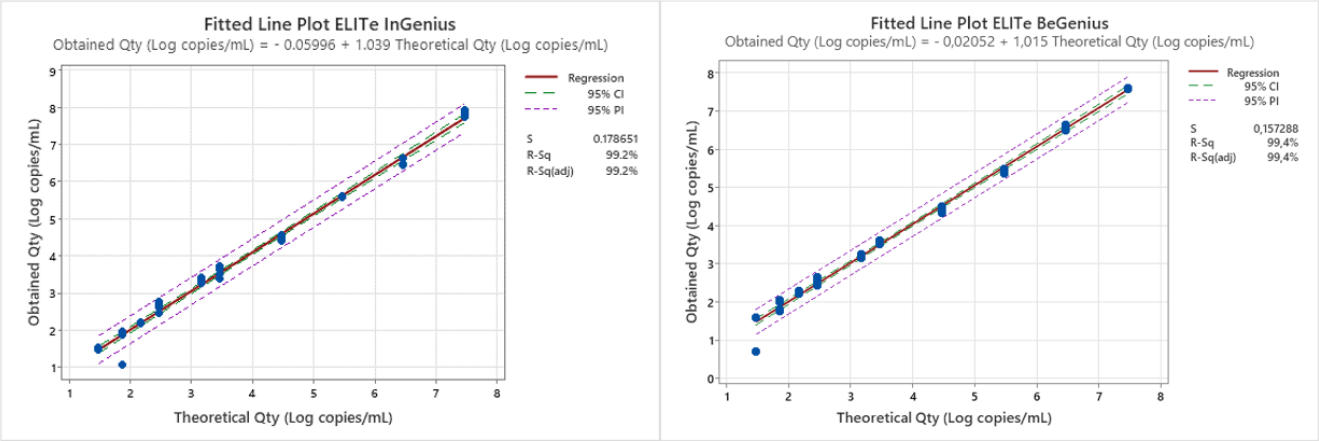


Fig. 1

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 17 Rango de medición lineal para muestras de plasma y los instrumentos ELITe InGenius y ELITe BeGenius

Límite inferior de cuantificación (LLoQ)	Límite superior de cuantificación (ULOQ)
30 copias/mL	29.392.000 copias/mL

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

Los resultados se resumen en la figura siguiente.

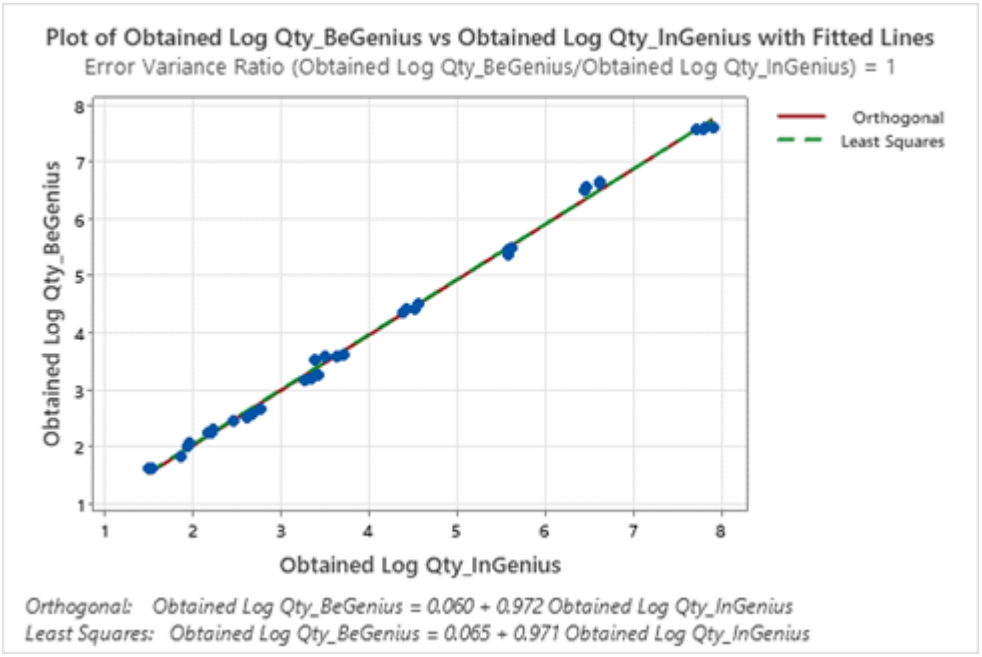


Fig. 2

El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de 0,060 (IC del 95 %: -0,015, 0,135) y una pendiente de 0,972 (IC del 95 %: 0,956, 0,989). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,997.

11.3 Incertidumbre de la curva de calibración

El valor de incertidumbre de la curva de calibración se calculó combinando los errores aleatorios (DE) de todas las cuantificaciones de nivel y multiplicando por el factor de cobertura k = 2 (incertidumbre combinada ampliada) y resultó ser de 0,1588 log copias/reacción.

Tabla 18

Niveles de la curva de calibración	Teóricos Log copias/reacción	DE	Incertidumbre combinada ampliada
CMV RNA Standard 10^5	5,0000	0,0273	0,1588
CMV RNA Standard 10^4	4,0000	0,0234	
CMV RNA Standard 10^3	3,0000	0,0329	
CMV RNA Standard 10^2	2,0000	0,0627	

11.4 Inclusividad: Eficacia de detección y cuantificación en distintos genotipos

La inclusividad del ensayo, definida como la eficacia de detección y la cuantificación de diferentes genotipos y cepa de CMV, se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en las bases de datos de nucleótidos.

El análisis demostró la conservación de la secuencia y la ausencia de mutaciones reseñables en las secuencias de CMV disponibles. Así pues, cabe esperar una detección y una cuantificación eficaces para los genotipos y las cepas de CMV.

La inclusividad del ensayo se verificó en el ELITe InGenius analizando diferentes materiales de referencia de CMV (ATCC y Universidad de Turín) a baja concentración.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 19

Cepa CMV	Pos./Dup.	Resultado
AD169	3/3	Se detectó ARN de CMV
Towne	3/3	Se detectó ARN de CMV
Davis	3/3	Se detectó ARN de CMV
Merlin	3/3	Se detectó ARN de CMV

Todas las muestras se detectaron correctamente como positivas para ARN de CMV cuando el producto CMV RNA ELITe MGB Kit se utilizó en el ELITe InGenius.

11.5 Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La reactividad cruzada potencial del ensayo con ADN genómico de CMV y otros microorganismos no intencionados se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias incluidas en las bases de datos de nucleótidos. El análisis presentó discrepancias **reseñables** con el ADN genómico de CMV, por lo que no cabe esperar que se produzca una reactividad cruzada. El análisis no presentó ninguna homología reseñable con otros microorganismos imprevistos, por lo que no cabe esperar reactividad cruzada.

La reactividad cruzada potencial con otros microorganismos que pueden encontrarse en muestras clínicas de plasma también se verificó analizando en el ELITe InGenius un panel de materiales de referencia certificados (ATCC y NIBSC) a un título alto.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 20

Muestra	de EV	Resultado
VIH1	0/3	Sin reactividad cruzada
VEB	0/3	Sin reactividad cruzada
VHA	0/3	Sin reactividad cruzada
VHB	0/3	Sin reactividad cruzada
VHH6	0/3	Sin reactividad cruzada
VHS1	0/3	Sin reactividad cruzada
VHS2	0/3	Sin reactividad cruzada
VHE	0/3	Sin reactividad cruzada
VRS	0/3	Sin reactividad cruzada
VVZ	0/3	Sin reactividad cruzada
Virus de la gripe A (H1N1)	0/3	Sin reactividad cruzada
Virus de la gripe B (Florida)	0/3	Sin reactividad cruzada
Virus del dengue tipo 3	0/3	Sin reactividad cruzada
Adenovirus 2	0/3	Sin reactividad cruzada
Virus del Nilo Occidental	0/3	Sin reactividad cruzada
Virus ECHO 4	0/3	Sin reactividad cruzada
Parvovirus B19	0/3	Sin reactividad cruzada
VHC	0/3	Sin reactividad cruzada
Aspergillus fumigatus	0/3	Sin reactividad cruzada
Staphylococcus aureus	0/3	Sin reactividad cruzada
Candida albicans	0/3	Sin reactividad cruzada

Ninguno de los marcadores potencialmente interferentes analizados mostró reactividad cruzada para la amplificación de la diana de ARN de CMV cuando se utilizó el producto CMV RNA ELITe MGB Kit.

11.6 Marcadores potencialmente interferentes: Inhibición

La inhibición potencial del ensayo causada por otros microorganismos que pueden encontrarse en muestras clínicas de plasma se verificó analizando un panel de materiales de referencia certificados (ATCC y NIBSC) a un título alto, que se enriquecieron con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a una concentración de 3 veces el LoD.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 21

Muestra	de EV	Resultado
VIH1	3/3	Sin inhibición
VEB	3/3	Sin inhibición
VHA	3/3	Sin inhibición
VHB	3/3	Sin inhibición

Tabla 21 (continued)

Muestra	de EV	Resultado
VHH6	3/3	Sin inhibición
VHS1	3/3	Sin inhibición
VHS2	3/3	Sin inhibición
VHE	3/3	Sin inhibición
VRS	3/3	Sin inhibición
VVZ	3/3	Sin inhibición
Virus de la gripe A (H1N1)	3/3	Sin inhibición
Virus de la gripe B (Florida)	3/3	Sin inhibición
Virus del dengue tipo 3	3/3	Sin inhibición
Adenovirus 2	3/3	Sin inhibición
Virus del Nilo Occidental	3/3	Sin inhibición
Virus ECHO 4	3/3	Sin inhibición
Parvovirus B19	3/3	Sin inhibición
VHC	3/3	Sin inhibición
Aspergillus fumigatus	3/3	Sin inhibición
Staphylococcus aureus	3/3	Sin inhibición
Candida albicans	3/3	Sin inhibición

Ninguno de los microorganismos potencialmente interferentes analizados mostró inhibición de la detección y la cuantificación de la diana de CMV cuando se utilizó el producto CMV RNA ELITe MGB Kit.

11.7 Sustancias potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La reactividad cruzada del ensayo con las sustancias potencialmente interferentes (endógenas y exógenas) que pueden encontrarse en las muestras clínicas de plasma se evaluó analizando un panel de sustancias a la concentración pertinente.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 22

Muestra	de EV	Resultado
Plasma ictérico	0/3	Sin reactividad cruzada
Plasma lipémico	0/3	Sin reactividad cruzada
Sangre hemolítica alta	0/3	Sin reactividad cruzada
Sangre hemolítica media	0/3	Sin reactividad cruzada
Sangre hemolítica baja	0/3	Sin reactividad cruzada
Plasma heparinizado	0/3	Muestra no válida
Plasma recogido en EDTA	0/3	Sin reactividad cruzada

Tabla 22 (continued)

Muestra	de EV	Resultado
Azitromicina	0/3	Sin reactividad cruzada
Ciclosporina A	0/3	Sin reactividad cruzada
Valganciclovir	0/3	Sin reactividad cruzada
Cidofovir	0/3	Sin reactividad cruzada
Abacavir	0/3	Sin reactividad cruzada
Ganciclovir	0/3	Sin reactividad cruzada
Foscarnet	0/3	Sin reactividad cruzada
Ribavirina	0/3	Sin reactividad cruzada
Letermovir	0/3	Sin reactividad cruzada

El análisis demostró que ninguna de las sustancias presentan una reacción cruzada con la amplificación de la diana de ARN de CMV cuando se utiliza el producto CMV RNA ELITe MGB Kit.

Se confirmó que la heparina era capaz de inhibir el ensayo, pues estas muestras presentaron un resultado «Invalid» (No válido) en lugar de negativo debido al fallo del Internal Control (IC Ct >32).

11.8 Sustancias potencialmente interferentes: inhibición

La inhibición del ensayo con sustancias potencialmente interferentes (endógenas y exógenas) que pueden encontrarse en muestras clínicas de plasma se evaluó en el ELITe InGenius, analizando un panel de sustancias a la concentración pertinente, que se enriquecieron con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a una concentración de 3 veces el LoD.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 23

Muestra	de EV	Resultado
Plasma ictérico	3/3	Sin inhibición
Plasma lipémico	3/3	Sin inhibición
Sangre hemolítica alta	3/3	Sin inhibición
Sangre hemolítica media	3/3	Sin inhibición
Sangre hemolítica baja	3/3	Sin inhibición
Plasma heparinizado	0/3	Muestra no válida
Plasma recogido en EDTA	3/3	Sin inhibición
Azitromicina	3/3	Sin inhibición
Ciclosporina A	3/3	Sin inhibición
Valganciclovir	3/3	Sin inhibición
Cidofovir	3/3	Sin inhibición
Abacavir	3/3	Sin inhibición
Ganciclovir	3/3	Sin inhibición

Tabla 23 (continued)

Muestra	de EV	Resultado
Foscarnet	3/3	Sin inhibición
Ribavirina	3/3	Sin inhibición
Letermovir	3/3	Sin inhibición

El análisis demostró que ninguna de las sustancias, a excepción de la heparina, inhiben la detección ni la cuantificación de la diana de ARN de CMV cuando se utiliza el producto CMV RNA ELITe MGB Kit.

Se confirmó que la heparina tenía la capacidad de inhibir el ensayo. No obstante, debido al fallo del Internal Control (Ct del IC >32), esta muestra dio un resultado «Invalid» (No válido) en lugar de un falso negativo.

11.9 Contaminación cruzada

La posible contaminación cruzada durante el análisis se evaluó en el ELITe InGenius, analizando 30 muestras de plasma negativas para ARN de CMV, que se alternaron con 30 muestras de plasma enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a un título alto.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 24

Muestras	N	Negativas	Positivas	Concordancia
Plasma enriquecido con ARN de CMV a aproximadamente 1×10^6 copias/mL	30	0	30	100 %
Plasma negativo para ARN de CMV	30	30	0	100 %

Ninguna de las muestras negativas para ARN de CMV dio resultados falsos positivos. En este análisis, no se detectó contaminación cruzada dentro de las sesiones ni entre sesiones.

11.10 Tasa total de fallos del sistema

La tasa total de fallos del sistema se evaluó en el ELITe InGenius, analizando un panel de muestras enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a una concentración de 3 veces el LoD.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 25

Muestras	N	Negativas	Positivas	Tasa total de fallos del sistema
Plasma enriquecido con ARN de CMV	50	0	50	0 %

Ninguna de las muestras positivas para ARN de CMV analizadas dio resultados falsos negativos. En este análisis, la tasa total de fallos del sistema fue del 0 %.

11.11 Repetibilidad

La repetibilidad dentro de las sesiones y entre sesiones del ensayo se evaluó en el ELITe InGenius analizando un panel de muestras de plasma, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a concentraciones de 3 veces el LoD y 10 veces el LoD.

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de repetibilidad dentro de las sesiones (en un día).

Tabla 26 Repetibilidad dentro de las sesiones en el ELITe InGenius (día 1)

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8/8	33,19	0,43	1,30	100 %
10 veces el LoD	8/8	31,69	0,09	0,27	100 %

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de repetibilidad entre sesiones (en dos días).

Tabla 27 Repetibilidad entre sesiones en el ELITe InGenius (día 1 y día 2)

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	16/16	33,19	0,34	1,03	100 %
10 veces el LoD	16/16	31,62	0,18	0,56	100 %

En la prueba de repetibilidad realizada en el ELITe InGenius, el producto CMV RNA ELITe MGB Kit detectó la diana de ARN de CMV tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

La repetibilidad dentro de las sesiones y entre sesiones del ensayo se evaluó en el ELITe BeGenius analizando un panel de muestras de plasma, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (NoToVir) a concentraciones de 3 veces el LoD y 10 veces el LoD.

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de repetibilidad dentro de las sesiones (en un día).

Tabla 28 Repetibilidad dentro de las sesiones en el ELITe BeGenius (día 1)

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8/8	36,17	0,87	2,40	100 %
10 veces el LoD	8/8	33,64	0,28	0,82	100 %

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de repetibilidad entre sesiones (en dos días).

Tabla 29 Repetibilidad entre sesiones en el ELITe BeGenius (día 1 y día 2)

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	16/16	35,82	0,79	2,22	100 %
10 veces el LoD	16/16	33,54	0,29	0,86	100 %

En la prueba de repetibilidad realizada en el ELITe BeGenius, el producto CMV RNA ELITe MGB Kit detectó la diana de ARN de CMV tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

11.12 Reproducibilidad

La reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos del ensayo se evaluó en el ELITe InGenius analizando un panel de muestras de plasma, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a concentraciones de 3 veces el LoD y 10 veces el LoD.

En las tablas siguientes se incluye un resumen de la reproducibilidad entre lotes (con tres lotes).

Tabla 30 Reproducibilidad entre lotes en el ELITe InGenius

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/48	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	48/48	33,18	0,33	0,99	100 %
10 veces el LoD	48/48	31,47	0,31	1,00	100 %

En las tablas siguientes se incluye un resumen de la reproducibilidad entre instrumentos (con tres instrumentos).

Tabla 31 Reproducibilidad entre instrumentos en el ELITe InGenius

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/24	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	24/24	34,53	0,56	1,63	100 %
10 veces el LoD	24/24	32,28	0,31	0,97	100 %

En la prueba de reproducibilidad realizada en el ELITe InGenius, el producto CMV RNA ELITe MGB Kit detectó la diana de ARN de CMV tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

La reproducibilidad entre lotes y entre instrumentos del ensayo se evaluó en el ELITe BeGenius analizando un panel de muestras de plasma, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (NoToVir) a concentraciones de 3 veces el LoD y 10 veces el LoD.

En las tablas siguientes se incluye un ejemplo de los resultados de la prueba de reproducibilidad entre lotes (en un instrumento con dos lotes).

Tabla 32 Reproducibilidad entre lotes en el ELITe BeGenius

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8/8	34,96	0,16	0,46	100 %
10 veces el LoD	8/8	32,80	0,25	0,75	100 %

En las tablas siguientes se incluye un resumen de los resultados de la prueba de reproducibilidad entre instrumentos (con dos instrumentos).

Tabla 33 Reproducibilidad entre instrumentos en el ELITe BeGenius

Muestra	de EV	Ct medio	DE	%CV	Concordancia
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	16/16	34,48	0,58	1,67	100 %
10 veces el LoD	16/16	32,58	0,34	1,05	100 %

En la prueba de reproducibilidad realizada en el ELITe BeGenius, el producto CMV RNA ELITe MGB Kit detectó la diana de ARN de CMV tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

11.13 Especificidad diagnóstica: Confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, evaluada como porcentaje de concordancia negativa con el método de referencia, se determinó analizando muestras clínicas de plasma negativas para ARN de CMV, que también se analizaron en un laboratorio externo con un método de referencia para diagnóstico molecular *in vitro* con marcado CE (EG SpA).

Como el ELITe BeGenius presenta un rendimiento analítico equivalente al del ELITe InGenius, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la especificidad diagnóstica del ensayo obtenida con el ELITe InGenius también es aplicable al ELITe BeGenius.

Los resultados del estudio de especificidad diagnóstica, después de un análisis con resultado diferente, se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 34

Muestras	N	Positivas	Negativas	No válida	Especificidad diagnóstica
Plasma extraído de sangre negativa para ADN de CMV	100	0	100	0	100 %

La especificidad diagnóstica del producto CMV RNA ELITe MGB Kit fue del 100 %.

El valor de corte para el Ct del Internal Control se ha establecido a 32 para la matriz de plasma validada.

11.14 Sensibilidad diagnóstica: confirmación de muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, evaluada como el porcentaje de concordancia positiva con el método de referencia y con el material de referencia, se verificó analizando lo siguiente:

- Muestras clínicas de plasma positivas para ADN de CMV procedentes de 8 pacientes trasplantados y sometidos a tratamiento antivírico con un inhibidor del complejo terminasa de CMV (Letermovir, PREVYMIS™, Merck & Co.), que se analizaron en un laboratorio externo con un método de referencia para diagnóstico*in vitro*con marcado CE (EG SpA) después del tratamiento con desoxirribonucleasa (I. Cassaniti*et al.*2021).
- Muestras clínicas de plasma enriquecidas con material de referencia de ARN de CMV (Universidad de Turín) a concentraciones de 3 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces y 50 veces el LoD.

Como elELITe BeGeniuspresenta un rendimiento analítico equivalente al delELITe InGenius, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con elELITe InGeniustambién es aplicable alELITe BeGenius.

Los resultados del estudio de sensibilidad diagnóstica, después de un análisis con resultado diferente, se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 35

Muestras	N	Positivas	Negativas	No válida	Sensibilidad diagnóstica
Plasma positivo para ADN de CMV después del tratamiento con desoxirribonucleasa	10	9	1	0	90 %
Plasma enriquecido con ARN de CMV	70	70	0	0	100 %
Todas las muestras de plasma	80	79	1	0	98,75 %

La sensibilidad diagnóstica del productoCMV RNA ELITe MGB Kitfue del 98,75 %.

11.15 Sensibilidad diagnóstica: Concordancia del método

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como concordancia con el método de referencia utilizando el coeficiente kappa de Cohen, se evaluó analizando muestras clínicas de plasma negativas para ADN de CMV y positivas para ADN de CMV procedentes de 27 pacientes trasplantados y sometidos a tratamiento antivírico con un inhibidor del complejo terminasa de CMV (Letermovir, PREVYMIS™, Merck & Co.), que se analizaron en un laboratorio externo con un método de referencia para diagnóstico*in vitro*con marcado CE (EG SpA) después del tratamiento con desoxirribonucleasa (I. Cassaniti*et al.*2021).

Como elELITe BeGeniuspresenta un rendimiento analítico equivalente al delELITe InGenius, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con elELITe InGeniustambién es aplicable alELITe BeGenius.

Los resultados del estudio de sensibilidad diagnóstica, después de un análisis con resultado diferente, se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 36

		ADN de CMV después del tratamiento con desoxirribonucleasa		
		Pos	**Neg**	**Total**
CMV RNA ELITe MGB Kit	**Pos**	9	2	11
	Neg	1	81	82
	Total	10	83	93

El productoCMV RNA ELITe MGB Kitgeneró un área bajo de la curva (AUC) del 96,8 % y un coeficiente kappa de Cohen de 0,839, lo que corresponde a una concordancia perfecta con los resultados obtenidos para el ADN de CMV en plasma tratado con desoxirribonucleasa.

NOTA!

Los datos y resultados completos de los análisis realizados para la evaluación de las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se recogen en la documentación técnica del producto**CMV RNA ELITe MGB Kit**, FTP 115ING.

12 BIBLIOGRAFÍA

W. D. Rawlinson *et al.* (1993) *J. Virology* 67: 5502–5513

D. Wang *et al.* (2004) *PNAS* 101: 16642–16647

W. A. Bresnahan (2000) *Science* 288: 2373–2376

A. E. Greijer *et al.* (2000) *J. Virology* 74: 9078–9082

E. Terhune *et al.* (2004) *J. Virology* 78: 10390–10398

E. Sarcinella *et al.* (2004) *Virus Research* 104: 129–137

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

G. Gerna *et al.* (2019) *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20: 1429–1438

I. Cassaniti *et al.* (2021) *Am. J. Transplantat.* 21: 1622–1628

C. N. Kotton *et al.* (2025) *Transplantation* 1; 109(7):1066-1110

G. Piccirilli *et al.* (2024) *J. Clinical Microbiology* 62(5): e0163023.

13 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con las siguientes muestras clínicas: Plasma recogido en EDTA.

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

El plasma recogido en EDTA debe separarse de la sangre almacenada a temperatura ambiente o a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 ° durante un período no superior a 24 horas.

No utilizar con este producto ARN extraído de muestras que contengan heparina, pues esta sustancia inhibe la reacción de amplificación de ácidos nucleicos y da lugar a resultados no válidos.

El producto no está concebido para utilizarlo con el fin de detectar la presencia de o la exposición a agentes contagiosos en sangre, componentes de la sangre, células, tejidos, órganos o cualquiera de sus derivados a la hora de evaluar su idoneidad para una transfusión, un trasplante o una administración de células.

Este producto está concebido para su uso en la detección de infecciones por el CMV en mujeres embarazadas:

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

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

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

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

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

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

Es necesario tener áreas separadas para la preparación de la mezcla de reacción completa y la extracción/amplificación/detección de los productos de amplificación.

Debido a las diferencias inherentes que existen entre las distintas tecnologías, se recomienda a los usuarios realizar estudios de relación entre los diversos métodos antes de cambiar a un nuevo producto.

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

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

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

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

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, este producto presenta un riesgo residual de obtener resultados no válidos o erróneos. Este riesgo residual no se puede eliminar ni reducir aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente. No obstante, este riesgo residual asociado al uso previsto del producto se ha ponderado con los beneficios potenciales para el paciente y se ha evaluado como aceptable.

14 PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Tabla 37

Reacción no válida del calibrador Q-PCR-Standard, de la curva de calibración o del Positive Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como de los calibradores Q-PCR Standard y del Positive Control. Comprobar el volumen de la mezcla completa de reacción, así como el de los calibradores Q-PCR Standard y el del Positive Control.
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 durante más de 3 sesiones consecutivas: 7 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. 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 de los calibradores «Q-PCR-Standard» o del Positive Control.	No utilizar el Q-PCR Standard para más de 4 sesiones independientes: 2 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit». No utilizar el Positive Control para más de 4 sesiones independientes: 3 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit». Utilizar nuevas alícuotas de los calibradores Q-PCR-Standard o del Positive Control.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 38

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la mezcla completa de reacción, así como del Negative Control. Comprobar el volumen de la mezcla completa de reacción, así como el del Negative Control.
Contaminación del Negative Control.	No utilizar el Negative Control para más de 1 sesión. Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular.
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.

Tabla 38 (continued)

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Contaminación del área de extracción, de las gradillas, del «Inventory Block» (administrador de inventarios) o de la «Cooler Unit».	Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir los probetas y las puntas que se hayan utilizado.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 39

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

Tabla 40

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

Tabla 41

Error en el cálculo del Ct	
Posibles causas	**Soluciones**
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra o muestra con una señal de fluorescencia anómala.	Si se observa una amplificación notable en el gráfico de PCR, proceder de la manera siguiente: - Seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como positivo. Si no se observa ninguna amplificación en el gráfico de la PCR, seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado como negativo, o bien dejarlo como no válido. Si se requiere un valor Ct: - Repetir la amplificación de la muestra eluida con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). - Repetir la extracción de la muestra con una dilución de 1:10 en agua para biología molecular en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).

Tabla 42

Tasa anormalmente alta de resultados positivos dentro de la misma sesión (reacciones con valores de Ct tardíos similares)	
Posibles causas	**Soluciones**
Contaminación entre muestras durante los pasos preanalíticos.	Limpiar la micropipeta con una solución reciente de hipoclorito de sodio (lejía) al 3 % o un limpiador de ADN/ARN después de pipetear cada muestra. No utilizar pipetas de Pasteur. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Introducir las muestras en las últimas posiciones de los instrumentos, tal como se indica en la interfaz. Seguir la secuencia de carga indicada por el software.
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 (lejía) al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN. Realizar un ciclo de descontaminación con radiación UV. Volver a preparar la mezcla completa de reacción o utilizar una nueva alícuota de reactivos o de CPE.

15 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*.
CE 0123	Cumple los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Certificación emitida por la TÜV SÜD Product Service GmbH, Alemania.
UDI	Identificador único del producto
	Contenido suficiente para <<N>> análisis.
	Consulte las instrucciones de uso
CONT	Contenido.
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Fabricante.

16 NOTA PARA LOS USUARIOS

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante y a las autoridades competentes del Estado miembro en el que resida el usuario o el paciente. Para informar a ELITechGroup S. p. A., que es el fabricante de este producto, debe utilizarse la dirección de correo electrónico egspa.vigilance@elitechgroup.com.

No obstante, cuando este sistema informático se encuentre en funcionamiento, se proporcionará un «Resumen de seguridad y rendimiento» a través de la base de datos europea sobre productos sanitarios (Eudamed). Antes de que se publique la declaración de plena funcionalidad de Eudamed, el «Resumen de seguridad y rendimiento» se pondrá a disposición del público sin retrasos indebidos cuando se solicite escribiendo un correo electrónico a la dirección emd.support@elitechgroup.com.

17 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

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

Los reactivos de detección ELITe MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, así como por las patentes europeas 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 y por solicitudes de patentes pendientes en la actualidad.

El «Method for the detection and quantification of human cytomegalovirus by means of virion RNAs» (Método para la detección y cuantificación de citomegalovirus humano mediante diversos ARN de virión) está cubierto por la patente italiana 102020000007357 y por otras solicitudes de patente pendientes.

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

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, el logotipo de ELITe MGB® logo, ELITe InGenius® y ELITe BeGenius® son marcas registradas de ELITechGroup en la Unión Europea. AcroMetrix™ es una marca registrada de Thermo Fisher Scientific Inc. PREVYMIS™ es una marca registrada de Merck & Co.

Appendix A CMV RNA ELITe MGB Kit utilizado junto con las plataformas de la serie Genius®



ATENCIÓN

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

USO PREVISTO

El producto **CMV RNA ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cuantitativo de ácidos nucleicos mediante retrotranscriptasa y PCR en tiempo real para la detección y la identificación de **ARNm del virión de citomegalovirus humano (ARN de CMV)** extraído de muestras clínicas acelulares.

El ensayo se ha validado con los instrumentos **ELITe InGenius®** y **ELITe BeGenius®**, que son sistemas automatizados e integrados para la extracción, la retrotranscriptasa, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados utilizando muestras humanas de plasma recogido en EDTA.

El producto está concebido para su uso como ayuda en el seguimiento de pacientes con una infección por CMV que siguen un tratamiento antivírico con inhibidores del complejo de la terminasa del CMV.

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

El producto no está concebido para utilizarlo con el fin de detectar la presencia de o la exposición a agentes contagiosos en sangre, componentes de la sangre, células, tejidos, órganos o cualquiera de sus derivados a la hora de evaluar su idoneidad para una transfusión, un trasplante o una administración de células. Este producto está concebido para su uso en la detección de infecciones por el CMV en mujeres embarazadas:

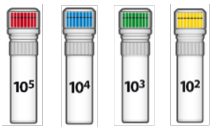
Secuencia amplificada

Secuencia	Gen	Fluoróforo	Canal
Diana	ARNm de UL21.5 (región empalmada)	FAM	ARN de CMV
Internal Control	Bacteriófago MS2	AP525	IC

Matrices validadas

- **Plasma** recogido en EDTA

Contenido del kit y productos relacionados

CMV RNA ELITe MGB Kit (RTS115ING)		CMV RNA ELITe Standard (STD115ING)	CMV RNA - ELITe Positive Control (CTR115ING)
 X 4	 x 2	 X 2	 X 2
PCR Mix para ARN de CMV 4 probetas de 600 µL 96 reacciones por kit 5 ciclos de congelación/ descongelación	RT EnzymeMix 2 probetas de 20 µL 96 reacciones por kit 10 ciclos de congelación/ descongelación	4 niveles listos para el uso: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 conjuntos de 4 probetas de 160 µL 4 ciclos de congelación/ descongelación	Positive Control listo para el uso 2 probetas de 160 µL 8 reacciones por kit 4 ciclos de congelación/ descongelación
Período de estabilidad máximo: **18 meses** Temperatura de almacenamiento: **-20 °C**		Período de estabilidad máximo: **24 meses** Temperatura de almacenamiento: **-20 °C**	Período de estabilidad máximo: **24 meses** Temperatura de almacenamiento: **-20 °C**

Otros productos necesarios no proporcionados con el kit

- Instrumento ELITe InGenius: INT030.
- Instrumento ELITe BeGenius: INT040.
- ELITe InGenius SP 1000: INT033SP1000.
- CPE - Internal Control: CTRCPE
- Consumibles para el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** (consulte las instrucciones de uso del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius)

Protocolos ELITe InGenius y ELITe BeGenius

Tabla 43

› Volumen inicial de extracción › Volumen del CPE › Volumen de elución extraído › Volumen inicial de PCR de la muestra:	600 µL 10 µL 50 µL 20 µL	› Volumen de la PCR Mix › Frecuencia de los controles › Frecuencia de la calibración › Unidad del resultado cuantitativo	20 µL 15 días 60 días copias/mL

Rendimiento del ELITe InGenius y de ELITe BeGenius

Matriz	Límite de detección	Sensibilidad	Especificidad
Plasma recogido en EDTA	30 copias/mL	**98,75 %** *80 muestras analizadas*	**100 %** *100 muestras analizadas*

Preparación de la muestra

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

Tabla 44

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	−20 °C ± 10 ° C	−70 °C ± 15 ° C
Plasma	EDTA	≤24 horas	≤24 horas	≤1 mes	No analizado

Procedimientos con el ELITe InGenius

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

Antes del análisis

1. Encender el ELITe InGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo **«CLOSED»**	**2.** Verificar los calibradores: **Q-PCR Standard** en el menú «Calibration» (Calibración). Verificar los controles: **Positive Control** y **Negative Control** en el menú «Controls» (Controles). Nota: todos los componentes tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados.	**3.** Descongelar las probetas de **PCR Mix** (manteniéndolas protegidas de la luz) y de **CTRCPE**. Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos. Mantener la mezcla **RT EnzymeMix** en hielo o en el bloque refrigerado.

4. Preparar la mezcla completa de reacción.

Número de muestras (N)	la mezcla de PCR	RT EnzymeMix
1 ≤N ≤5	(N + 1) × 20 µL	(N + 1) × 0,3 µL
6 ≤N ≤11	(N + 2) × 20 µL	(N + 2) × 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

5. Agitar suavemente en un vórtex.
Centrifugar durante 5 segundos.
Mantener la mezcla de reacción completa en hielo. No exponer el producto a la luz directa.

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

1.Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	**2.**Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «1000 µL»; «Elution» (Elución): «50 µL»	**3.**Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4.En «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo), seleccionar «CMVRNA ELITe_PL_600_50»	**5.**Seleccionar el método «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y la posición de la muestra: «Extraction Tube» (Tubo de extracción). ». Asegurarse de que la opción «Dilution factor» (Factor de dilución) esté configurada a «1,7».	**6.**Cargar la mezcla completa de reacción en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7.Cargar: Cargar el PCR Cassette, el cartucho de extracción, el «Elution Tube» (Tubo de elución), el cartucho de puntas y las gradillas de «Extraction Tube» (Tubo de extracción).	**8.**Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**9.**Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

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

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

1 a 4. Seguir el Procedimiento 1 que se ha descrito antes; seleccione los Assay Protocols (protocolos de ensayo). CMVRNA ELITe_PC y CMVRNA ELITe_NC o CMVRNA ELITe_STD o CMVRNA ELITe_PL_600_50	**5.**Seleccionar el método «PCR Only» (Solo PCR) y establecer la posición de la muestra «Elution Tube» (Tubo de elución).	**6.**Cargar la mezcla completa de reacción en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7.Cargar: ElPCR Cassettey la rejilla de la «Elution Tube» (Tubo de elución) con el ácido nucleico extraído.	**8.**Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**9.**Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

Procedimientos con el ELITe BeGenius

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

Antes del análisis

1. Encender el ELITe BeGenius. Iniciar sesión con el nombre de usuario y la contraseña correspondientes. Seleccionar el modo **«CLOSED»**	**2.** Verificar los calibradores: **Q-PCR Standard** en el menú «Calibration» (Calibración). Verificar los controles: **Positive Control** y **Negative Control** en el menú «Controls» (Controles). Nota: todos los componentes tienen que haberse procesado y aprobado y no deben estar caducados.	**3.** Descongelar las probetas de **PCR Mix** (manteniéndolas protegidas de la luz) y de **CTRCPE**. Agitar suavemente en un vórtex. Centrifugar durante 5 segundos. Mantener la mezcla **RT EnzymeMix** en hielo o en el bloque refrigerado.

4. Preparar la mezcla completa de reacción.

Número de muestras (N)	la mezcla de PCR	RT EnzymeMix
1 ≤N ≤5	(N + 1) × 20 µL	(N + 1) × 0,3 µL
6 ≤N ≤11	(N + 2) × 20 µL	(N + 2) × 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL
13 ≤N ≤18	(N + 3) × 20 µL	(N + 3) × 0,3 µL
19 ≤N ≤23	(N + 4) × 20 µL	(N + 4) × 0,3 µL
N = 24	580 µL	8,7 µL

5. Agitar suavemente en un vórtex.
Centrifugar durante 5 segundos.
Mantener la mezcla de reacción completa en hielo. No exponer el producto a la luz directa.

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

1.Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	**2.**Insertar la «Sample Rack» (Rack de muestras) con las muestras dotadas de códigos de barras en la «Cooling Unit» (unidad de refrigeración). El escaneado de códigos de barras ya está activo.	**3.**Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «1000 µL», «Eluate» (Eluido): «50 µL»
4.En «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo), seleccionar «CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50» **Nota:**Si es necesario llevar a cabo una segunda extracción, repetir los pasos del 2 al 4.	**5.**Imprimir las etiquetas para incluir el código de barras correspondiente en las probetas de elución vacías. Cargar las probetas en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit».	**6.**Cargar la mezcla completa de reacción y el Internal Control en la «Reagent Rack» (gradilla de reactivos) e insertarla en la «Cooler Unit».
7.Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el «PCR Cassette» y la «Extraction Rack» (rejilla de extracción), con los cartuchos de extracción «ELITe InGeniusSP 200» y los consumibles que se necesitan para la extracción.	**8.**Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**9.**Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

NOTA!

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

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

1.Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).	**2.**Cargar el ácido nucleico extraído o las probetas con códigos de barras de los controles en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit».	**3.**Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «1000 µL», «Eluate» (Eluido): «50 µL»
4.Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo). (CMVRNA ELITe_Be_PC y CMVRNA ELITe_Be_NC o CMVRNA ELITe_Be_STD o CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50)	**5.**Cargar la mezcla completa de reacción en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) e insertarla en la «Cooler Unit».	**6.**Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el «PCR Cassette»
7.Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**8.**Consultar, aprobar y almacenar los resultados.	

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185, 10149 Turín, Italia
Teléfono: +39-011 976 191
Fax: +39-011 936 76 11
Correo electrónico: emd.support@elitechgroup.com
Página web: www.elitechgroup.com