



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

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 22/12/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«EBV ELITe MGB Kit» Ref. RTS020PLD

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

- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section “Diagnostic specificity: confirmation of negative samples”)*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

USO PREVISTO

El producto «**EBV ELITE MGB® Kit**» es parte de un ensayo cualitativo y cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos para la **detección y la cuantificación de ADN de virus del herpes humano o virus de Epstein-Barr (VEB)** en muestras de ADN extraídas de sangre recogida en EDTA, plasma recogido en EDTA y líquido cefalorraquídeo (LCR).

El producto se utiliza para el diagnóstico y la monitorización de infecciones por el VEB junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

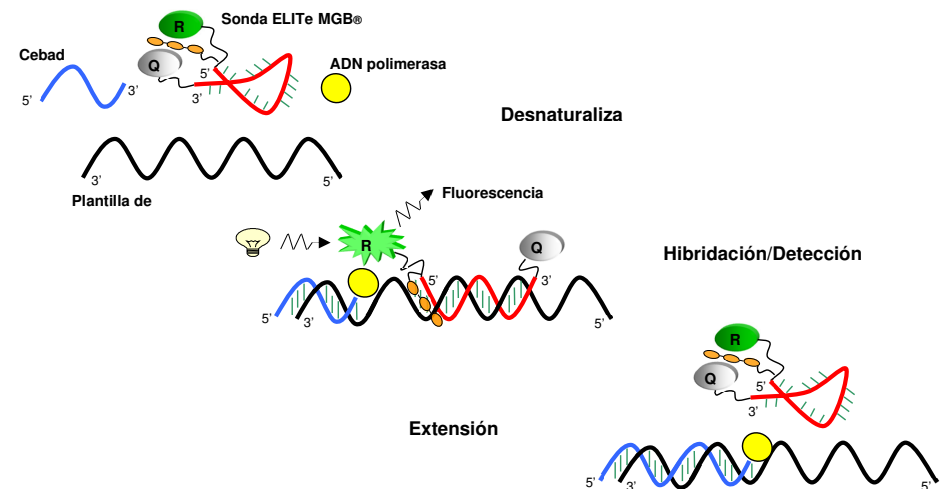
El ensayo consiste en una reacción de amplificación en tiempo real con termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia.

En cada pocillo se realizan dos reacciones de amplificación a partir del ADN extraído de las muestras que se están analizando: una reacción específica de una región del **gen de la globina beta humana** (control interno de inhibición). La sonda ELITE MGB® específica del VEB, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del VEB. La sonda ELITE MGB® específica del control interno, marcada con el fluoróforo AP525 (análogo al VIC), se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del control interno. A medida que aumenta el producto específico de la reacción de amplificación, la emisión de fluorescencia también aumenta y el instrumento la mide y la registra. El procesamiento de los datos permite detectar la presencia y el título del ADN de VEB en la muestra inicial.

Al finalizar la sesión de amplificación, es posible analizar la curva de disociación (curva de fusión) para determinar la temperatura de disociación (temperatura de fusión) y confirmar la presencia de la diana correcta o identificar la presencia de mutaciones.

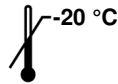
El ensayo se ha validado con los sistemas descritos en estas instrucciones de uso.

En la siguiente ilustración se muestra de manera esquemática el mecanismo de activación y la emisión de fluorescencia de la sonda ELITE MGB®. Tener en cuenta que la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación, por lo que puede utilizarse para el análisis de la curva de disociación.



EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD



ÍNDICE

USO PREVISTO

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

ELITE InGenius® Y ELITE BeGenius®

MUESTRAS Y CONTROLES

PROCEDIMIENTO CON EL ELITE InGenius®

PROCEDIMIENTO CON EL ELITE BeGenius®

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast Dx

Sistema de PCR en tiempo real ABI 7300

MUESTRAS Y CONTROLES

PROCEDIMIENTO

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Analizador Roche cobas z 480

MUESTRAS Y CONTROLES

PROCEDIMIENTO

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

BIBLIOGRAFÍA

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

SÍMBOLOS

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

página 2

página 2

página 3

página 3

página 3

página 3

página 5

página 6

página 6

página 8

página 16

página 22

página 35

página 35

página 37

página 47

página 58

página 58

página 59

página 64

página 69

página 70

página 71

página 74

página 75

EBV ELITE MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**EBV ELITE MGB® Kit**» contiene la mezcla completa «EBV Q - PCR Mix» lista para el uso para la amplificación en tiempo real en una solución estabilizadora, **distribuida en alícuotas en cuatro probetas desechables**. Cada probeta contiene **540 µL** de solución, suficiente para **24 análisis** (procesando al menos 2 muestras por sesión) cuando se utilizan los instrumentos «**ELITE InGenius®**» y «**ELITE BeGenius®**», o bien para **25 análisis** cuando se utilizan otros sistemas.

Los cebadores y la sonda específica del VEB (estabilizados con el grupo MGB®, marcados con el fluoróforo FAM e inactivados con una molécula no fluorescente) son específicos de una región del **gen EBNA-1** del VEB.

Los cebadores y la sonda para el control interno (estabilizados con el grupo MGB®, marcados con el fluoróforo AP525, análogo al VIC, e inactivados con una molécula no fluorescente) son específicos del **activador y de la región 5' UTR del gen de la globina beta humana**.

La mezcla de reacción contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos, el fluoróforo AP593 (utilizado en lugar del ROX o del Cy5) como referencia pasiva para la normalización de la fluorescencia, la enzima N-uracil glucosidasa (UNG) para inactivar la contaminación provocada por el producto de amplificación y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot-start»).

El producto es suficiente para **96 análisis cuando se utilizan los instrumentos «ELITE InGenius®» y «ELITE BeGenius®»**, inclusive los estándares y los controles.

El producto es suficiente para **100 análisis cuando se utilizan otros sistemas**, incluidos los estándares y los controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
Mezcla «EBV Q-PCR Mix»	Mezcla completa de reacción	4x540 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitadora vorticial.
- Microcentrifugadora de sobremesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Agua de calidad para biología molecular.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de fluorescencia, sistema de PCR en tiempo real 7300 o instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx, calibrados conforme a las instrucciones del fabricante.
- Termostato programable con sistema de detección óptica de fluorescencia cobas z 480 analizador, calibrado conforme a las instrucciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Los reactivos para la extracción de ADN de las muestras, el control positivo de la extracción, el control positivo de la amplificación, los estándares de ADN en cantidad conocida y los consumibles **no** están incluidos en el volumen de suministro de este producto.

Para la extracción manual de ADN de las muestras que se van a analizar, se ha validado del uso del producto genérico «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTB01), que es un kit para la extracción de ADN de muestras celulares y no celulares.

EBV ELITE MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Para el análisis automático de muestras con el instrumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030), se ha validado el uso de los siguientes productos genéricos: los cartuchos de extracción «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200) o «**ELITE InGenius® SP 1000**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT033SP1000), los consumibles para la extracción y la amplificación de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS), «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000), «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR) y «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, código TF-350-L-R-S).

Para la extracción automática de ADN, la amplificación y la interpretación de los análisis de las muestras, es necesario utilizar el instrumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) y los siguientes protocolos de ensayo específicos (ELITechGroup S.p.A.):

para los calibradores, «**EBV ELITE STD**» o «**EBV ELITE STD_1000_100**»;

para el control positivo de amplificación «**EBV ELITE PC**» o «**EBV ELITE_PC_1000_100**»;

para el control negativo de amplificación, «**EBV ELITE_NC**» o «**EBV ELITE_NC_1000_100**»;

para el análisis de las muestras, «**EBV ELITE_WB_200_100**», «**EBV ELITE_PL_200_100**» y «**EBV ELITE_PL_1000_100**».

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

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

para los calibradores, «**EBV ELITE_Be STD**»;

para el control positivo de amplificación, «**EBV ELITE_Be PC**»;

para el control negativo de amplificación, «**EBV ELITE_Be NC**»;

para los análisis de muestras, «**EBV ELITE_Be_WB_200_100**» y «**EBV ELITE_Be_PL_200_100**».

Para la extracción automática del ADN de las muestras que se van a analizar, se ha validado el uso del producto genérico «**ELITE STAR 200 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT011EX), que es un kit para la extracción de ácido nucleico de muestras biológicas, con el instrumento «**ELITE STAR**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT010).

Para la extracción automática de ADN y la preparación de las microplacas para la amplificación de las muestras que van a analizarse, se ha validado el uso del producto genérico «**ELITE GALAXY 300 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT021EX), que es un kit para la extracción de ácido nucleico de muestras biológicas, con el instrumento «**ELITE GALAXY**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT020).

Para la extracción automática de ADN de las muestras que van a analizarse, también se ha validado el uso de los productos genéricos «**NucliSENS® easyMAG® Reagents**» (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135), que son kits para la extracción de ácido nucleico de muestras biológicas utilizando el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**» (bioMérieux SA, ref. 200111).

Para la extracción automática de ADN de las muestras que van a analizarse, también se ha validado el uso de los productos «**QIAsymphony® DNA Mini Kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 931236) y «**QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi kit**» (QIAGEN GmbH, ref. 937055), que son kits para la extracción de ácido nucleico a partir de muestras biológicas utilizando el instrumento «**QIAsymphony® SP/AS**» (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301) y los productos genéricos relacionados.

Para la extracción automática de ADN de las muestras que van a analizarse, también se ha validado el uso del producto «**MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit**» (Roche, ref. 07658036001), que es un kit para la extracción de ácido nucleico a partir de muestras biológicas utilizando el instrumento «**MagNA Pure 24 System**» (Roche, ref. 07290519001).

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Como control positivo de la extracción de los ácidos nucleicos de muestras no celulares y control de inhibición, es necesario utilizar el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE), una solución estabilizada que contiene dos ADN plasmídicos y el ARN genómico del bacteriófago MS2.

Cuando se utiliza el sistema de PCR en tiempo real 7300, se recomienda utilizar el producto genérico «**Q-PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC01), que incluye microplacas con pocillos de 0,2 mL y placas de sellado adhesivas para la amplificación en tiempo real.

Para el uso de un instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx, se recomienda utilizar el producto genérico «**Q-PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC02), microplacas con pocillos de 0,1 mL y placas de sellado adhesivas para la amplificación en tiempo real.

Cuando se utiliza un analizador cobas z 480, es necesario utilizar el producto genérico «**AD-plate 0.3ml**» (Roche, ref. 05232724001), que contiene microplacas con pocillos de 0,3 mL y placas selladoras adhesivas para la amplificación en tiempo real.

Si es preciso detectar el ADN de VEB (análisis cualitativo), utilizar el producto «**EBV - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR020PLD) o el producto «**EBV - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR020PLD-R), específico para el uso con el analizador cobas z 480, control positivo de ADN plasmídico.

Si es necesario detectar y cuantificar el ADN de VEB (análisis cuantitativo), utilizar el producto «**EBV ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD020PLD), que contiene cuatro diluciones de ADN plasmídico en una cantidad conocida para obtener la curva estándar.

Un factor de conversión permite expresar los resultados del análisis cuantitativo en las unidades internacionales de VEB del «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (ref. NIBSC 09/260, Reino Unido).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

Advertencias y precauciones generales

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

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

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

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

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

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

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 volumen de suministro del producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Para los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de los ácidos nucleicos, se requiere personal cualificado para evitar el riesgo de resultados incorrectos, especialmente debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o la contaminación de las mismas con productos de amplificación.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de áreas independientes para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No introducir nunca un producto de amplificación en el área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de batas de laboratorio, guantes y herramientas que se empleen exclusivamente para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No llevar nunca batas de laboratorio, guantes ni herramientas del área asignada a la amplificación/detección de productos de amplificación al área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Las muestras deben usarse exclusivamente para este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. No abrir al mismo tiempo probetas que contengan muestras diferentes. 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.

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de extracción deben manipularse reduciendo en la medida de lo posible la dispersión hacia el entorno. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

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

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de amplificación deben manipularse reduciendo en la medida de lo posible la dispersión hacia el entorno.

Advertencias y precauciones específicas de los componentes

La mezcla «**EBV Q - PCR Mix**» debe conservarse a una temperatura inferior -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La mezcla «**EBV Q - PCR Mix**» puede congelarse y descongelarse un máximo de **cinco veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

ELITe InGenius® Y ELITe BeGenius®

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre entera para la extracción del ADN deben recogerse en EDTA e identificarse de acuerdo con las prácticas del laboratorio, transportarse a +2 / +8 °C, y almacenarse a +2 / +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben ser congeladas y almacenadas a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante periodos más largos.

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: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el **ELITe InGenius** y la versión **1.3** del **software ELITe InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **EBV ELITe _WB_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL de agua.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión **2.0** del **software ELITe BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **EBV ELITe _Be_WB_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

Plasma recogido en EDTA

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

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir 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: cuando la extracción de ADN de 200 µL de plasma se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **EBV ELITE_PL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL de agua.

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de 200 µL de plasma se realiza con el **ELITE BeGenius** y la versión 2.0 del **software ELITE BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **EBV ELITE_Be_PL_200_100**, que procesa 200 µL de muestra, añade el control interno **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

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

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

Sustancias interferentes

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias potencialmente interferentes» del capítulo «Eficacia diagnóstica».

Con el fin de evitar la inhibición de la reacción de amplificación y la obtención de resultados no válidos con frecuencia, no utilizar sangre ni plasma recogidos en heparina.

Calibradores de amplificación y controles de amplificación

Antes de analizar cualquier muestra, es imprescindible generar y aprobar la curva de calibración y los controles de amplificación para cada lote de reactivos de amplificación:

Como conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del producto «**EBV ELITE Standard**», junto con el protocolo «**EBV ELITE STD**» o «**EBV ELITE STD_1000_100**» en el caso del **ELITE InGenius**, o bien «**EBV ELITE_Be STD**» en el caso del **ELITE BeGenius**.

Como control positivo de amplificación, utilizar el producto «**EBV - ELITE Positive Control**», junto con el protocolo «**EBV ELITE_PC**» o «**EBV ELITE_PC_1000_100**» en el caso del **ELITE InGenius**, o bien «**EBV ELITE_Be_PC**» en el caso del **ELITE BeGenius**.

Como control negativo de amplificación, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro del kit), junto con el protocolo «**EBV ELITE_NC**» o «**EBV ELITE_NC_1000_100**» en el caso del **ELITE InGenius**, o bien «**EBV ELITE_Be_NC**» en el caso del **ELITE BeGenius**.

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

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

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

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

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

Controles de calidad

Se deben realizar controles de calidad externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda. Existen controles de calidad externos en el mercado.

PROCEDIMIENTO CON EL ELITE InGenius®

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

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

Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el **ELITE InGenius** y seleccionar el modo «**CLOSED**».
- Verificar que los calibradores («**Calibration**», «**EBV Q-PCR Standard**») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede revisar en el menú «**Calibration**» de la página de inicio.
- Verificar («**Controls**») que los controles de amplificación (**EBV Positive Control** y **EBV Negative Control**) se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede revisar en el menú «**Control**» de la página de inicio.
- Elegir el tipo de ciclo y configurarlo, siguiendo las instrucciones de la interfaz para la configuración de la ejecución y usando los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits **ELITE MGB**, las matrices y el instrumento **ELITE InGenius** y el instrumento **ELITE InGenius** y la matriz mencionada.

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

Protocolo de ensayo para el producto «EBV ELITe MGB® kit» y el ELITe InGenius			
Nombre	Matriz	Informe	Características
EBV ELITe_WB_200_100	Sangre	copias/mL o UI/mL	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL
EBV ELITe_PL_200_100	Plasma	copias/mL o UI/mL	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL
EBV ELITe_PL_1000_100	Plasma	copias/mL o UI/mL	Volumen de entrada de extracción: 1000 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL

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

Los protocolos para el análisis cualitativo están disponibles bajo petición.

Configuración de la ejecución

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

- Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
- Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
- Sesión de calibración (modo de procesamiento «PCR Only»).
- Ciclo de control positivo y/o ciclo de control positivo para amplificación (solo PCR).

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

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

Los pasos principales para la configuración de los cuatro tipos de procesamiento se describen a continuación.

A. Sesión integrada

Para configurar el ciclo integrado, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la **interfaz del software**:

- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de «EBV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Seleccione el volumen de entrada de extracción («Extraction Input Volume»): 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 1000 µL de muestra, y asegurarse de que «Extracted Elute Volume» esté configurado en 100 µL.
- Para cada pista deseada, rellenar el ID de la muestra («SampleID» o SID) rellenando o escaneando el código de barras de la muestra.
- Seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse en la columna «Assay» (por ejemplo: EBV ELITe_WB_200_100).
- Asegurarse de que el «Protocolo» que se muestra sea: «Extract + PCR».
- En la columna «Sample Position», seleccionar la posición de carga de la muestra.
 - Si se utiliza una probeta primaria, seleccionar «Primary Tube». La probeta primaria solo puede utilizarse a partir de 200 µL de muestra.
 - Si se utiliza una probeta secundaria, seleccionar «Extraction Tube».
 Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar el CPE y la mezcla EBV Q-PCR Mix en el Inventory Block seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar el cartucho «PCR Cassette», los cartuchos de extracción «ELITe InGenius SP 200» o «ELITe InGenius SP1000», todos los consumibles necesarios y las muestras que van a extraerse en las posiciones indicadas en el paso 8 siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, el ELITe InGenius permite al usuario mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

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

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

Nota: La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de **16 horas** (máximo 5 sesiones o 1 sesión durante toda la noche seguida de 1 configuración solo).

B. Sesión de amplificación

Para configurar el ciclo de amplificación, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de «EBV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Aunque la extracción no vaya a realizarse, seleccionar el volumen de entrada de extracción («Extraction Input Volume»): 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 200 µL de muestra, y asegurarse de que «Extracted Elute Volume» esté configurado en 100 µL.
4. Para cada «Track» deseado, introducir el «SampleID» (SID) tecleando o escaneando el código de barras de la muestra.
5. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., EBV ELITE_WB_200_100).
6. En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
7. Asegurarse de que, en la columna «Sample Position», la posición de carga de la muestra eluida sea «Elution Tube» (fila inferior). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla de Q-PCR de VEB en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos de PCR y las muestras del ácido nucleico extraído siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

Nota: Al final del ciclo, los cartuchos «PCR Cassette» con los productos de reacción y los consumibles deben sacarse del equipo y eliminarse sin que se produzcan contaminaciones ambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de **16 horas** (máximo 5 sesiones o 1 sesión durante toda la noche seguida de 1 configuración solo).

C. Sesión de calibración

Para configurar el ciclo de calibración, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de «EBV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar las probetas de estándar de Q-PCR de VEB (Cal1: estándares de Q-PCR de VEB 10², Cal2: estándares de Q-PCR de VEB 10³, Cal3: estándares de Q-PCR de VEB 10⁴, Cal4: estándares de Q-PCR de VEB 10⁵). Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Aunque la extracción no vaya a realizarse, seleccionar el volumen de entrada de extracción («Extraction Input Volume»): 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 1000 µL de muestra, y asegurarse de que «Extracted Elute Volume» esté configurado en 100 µL.
5. Comenzando por la pista deseada, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que se va a utilizar (p. ej., EBV ELITE_STD o EBV ELITE_STD_1000_100) y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del estándar de Q-PCR de VEB. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
6. Cargar la mezcla de Q-PCR de VEB en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
7. Cargar/revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar las probetas del calibrador y los cartuchos «PCR Cassette» siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración. Asegurarse de cargar los líquidos del estándar de PCR en los tracks correctos, tal como se indica en la interfaz.
9. Cerrar la puerta del equipo.
10. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: Al finalizar el ciclo, los calibradores restantes pueden sacarse del equipo, taparse y conservarse a -20 °C.

Nota: Al final del ciclo, los cartuchos «PCR Cassette» con los productos de reacción y los consumibles deben sacarse del equipo y eliminarse sin que se produzcan contaminaciones ambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de **16 horas** (máximo 5 sesiones o 1 sesión durante toda la noche seguida de 1 configuración solo).

D. Sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control

Para configurar los ciclos de control positivo y control negativo de amplificación, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de «EBV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar el producto «EBV - ELITe Positive Control», para la amplificación del control positivo. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua de calidad para biología molecular para las sesiones en una probeta de elución incluida en el volumen de suministro del conjunto de consumibles «ELITe InGenius SP Consumable Set»..
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Aunque la extracción no vaya a realizarse, seleccionar el volumen de entrada de extracción («Extraction Input Volume»): 200 µL para procesar 200 µL de muestra o 1000 µL para procesar 1000 µL de muestra, y asegurarse de que «Extracted Elute Volume» esté configurado en 100 µL.
6. Para el control positivo, seleccionar «EBV ELITe_PC o EBV ELITe_PC_1000_100» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del control positivo de VEB.
7. Para el control negativo, seleccionar «EBV ELITe_NC o EBV ELITe_NC_1000_100» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del agua de calidad para biología molecular.
8. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar la mezcla de Q-PCR de VEB en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar el cartucho de PCR, el control positivo y/o el control negativo de amplificación, siguiendo las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: El Positive Control y el Negative Control deben procesarse como control de amplificación para poder configurar los gráficos de control («Control Charts»). Se necesitan cuatro resultados de los controles positivo y negativo de cuatro sesiones diferentes para configurar el gráfico de control. Después de esto, los resultados de los controles positivo y negativo se utilizan para controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones.

Nota: Al finalizar el ciclo, el control positivo restante puede extraerse del equipo, taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar el control positivo.

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

Nota: La mezcla de PCR puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de **16 horas** (máximo 5 sesiones o 1 sesión durante toda la noche seguida de 1 configuración solo).

Revisión y aprobación de los resultados

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

Nota: Para obtener información detallada, consultar el manual de uso del equipo **ELITe InGenius**.

El sistema **ELITe InGenius** genera los resultados con el producto «**EBV ELITe MGB® Kit**» mediante el siguiente procedimiento:

- A. Validación de la curva de calibración
- B. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de amplificación
- C. Validación de los resultados de la muestra
- D. Generación del informe de los resultados de la muestra.

A. Validación de la curva de calibración

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica del VEB («EBV») en las reacciones de amplificación del calibrador utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «EBV ELITe_STD» y «EBV ELITe_STD_1000_100».

La curva de calibración, específica para el lote de reactivo de amplificación, se guarda en la base de datos (calibración) tras la aprobación del administrador o del analista, siguiendo las instrucciones de la interfaz.

La curva de calibración, específica del lote de reactivos de amplificación, caduca después de 60 días.

Antes de analizar cualquier muestra, es imprescindible generar y aprobar la curva de calibración para el lote de reactivos de amplificación usado. La disponibilidad de la curva de calibración aparece con estado «Approved» (Aprobado) en la ventana «Calibration» del software **ELITe InGenius**.

Nota: Cuando la curva de calibración no cumple los criterios de aceptación, aparece el mensaje «not passed» en el menú «Calibration» y no es posible aprobar la curva. En este caso, es necesario repetir las reacciones de amplificación del calibrador.

Nota: Cuando la curva de calibración se procesa junto con las muestras y el resultado es no válido, la ejecución entera se considera no válida y es preciso repetir la amplificación de todas las muestras.

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

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica del VEB («EBV») en la reacción de amplificación de los controles positivo y negativo utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «EBV ELITe_PC», «EBV ELITe_PC_1000_100», «EBV ELITe_NC» y «EBV ELITe_NC_1000_100».

Tras la aprobación por parte del administrador o del analista, los resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación, se guardan en la base de datos («Controls»), siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario.

Los resultados del control positivo de la amplificación, específicos del lote de reactivos de amplificación, caducan después de 15 días.

Antes de analizar cualquier muestra y tras la aprobación de la curva de calibración, es imprescindible generar y aprobar los resultados de los controles positivo y negativo de amplificación para el lote de reactivos de amplificación utilizado. La disponibilidad de los resultados de los controles positivo y negativo de una amplificación con estado «Approved» (aprobado) aparece en la ventana «Controls» del software **ELITe InGenius**. Si no se dispone de resultados del control positivo y del control negativo de amplificación, es necesario generarlos como se ha descrito anteriormente.

Nota: Cuando el resultado del control positivo o del control negativo no cumple con los criterios de aceptación, el equipo muestra el mensaje «not passed» (no aprobado) en la pantalla «Controls» y no es posible aprobar el resultado. En este caso se debe repetir la reacción de amplificación del control positivo o del control negativo.

Nota: Cuando el control positivo o el control negativo se ejecuta como control de amplificación junto con las muestras y el resultado es no válido, la ejecución entera se considerará no válida y habrá que repetir la amplificación de todas las muestras.

C. Validación de los resultados de las muestras

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica del VEB («EBV») y por la sonda específica del control interno («IC») en cada reacción de amplificación utilizando los parámetros incluidos en el protocolo de ensayo.

Nota: Antes de analizar cualquier muestra, es imprescindible generar y aprobar la curva de calibración y los controles de amplificación para el lote de reactivos utilizado. Se recomienda, aunque es opcional, procesar los controles positivo y negativo junto con los calibradores. La disponibilidad de una curva de calibración y de resultados de los controles positivo y negativo de la amplificación con estado «Approved» (Aprobado) aparece en las ventanas «Calibration» y «Controls» del software ELITE InGenius y se indican en la sección de los parámetros de ensayo («Assay Parameters»).

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

La ejecución de la muestra es válida cuando se cumplen las tres condiciones que se indican en la siguiente tabla.

1) Curva de calibración	Estado
Estándar Q-PCR de VEB	APROBADO
2) Positive Control	Estado
EBV Positive Control	APROBADO
3) Negative Control	Estado
EBV Negative Control	APROBADO

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

Para cada muestra el sistema ejecuta automáticamente el cálculo de la carga viral. La medida se expresa como «copias/ml» o «UI/ml», según la configuración en el protocolo de ensayo.

En la siguiente tabla se indican los posibles mensajes de los resultados de una muestra.

Resultado del ciclo de la muestra	Interpretación
EBV: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL	Se ha detectado ADN de VEB dentro del rango de medición del ensayo, cantidad mostrada.
EBV: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU / mL	Se ha detectado ADN de VEB por debajo del límite inferior de cuantificación del ensayo
EBV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL	Se ha detectado ADN de VEB más allá del límite superior de cuantificación del ensayo
EBV: ADN no detectado o por debajo LoD copias/ml o UI/ml	No se ha detectado ADN de VEB o se encuentra por debajo del límite de detección del ensayo.
Invalid - Retest Sample	Resultado del ensayo no válido debido a un error del control interno (extracción incorrecta o arrastre de inhibidores).

Las muestras no aptas para la interpretación de los resultados se indican como «Invalid - Retest Sample» en el **software ELITE InGenius**. En este caso, el ADN del control interno no ha podido detectarse correctamente debido a problemas ocurridos durante los pasos de amplificación o extracción (degradación del ADN, reducción del título de ADN durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

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

Las muestras aptas para el análisis pero en las que no ha sido posible detectar el ADN del gen de resistencia se indican como: «ADN no detectado o por debajo del límite de detección (LoD)». En este caso no se puede descartar que el ADN del gen de resistencia esté presente en una concentración por debajo del límite de detección del ensayo (ver «Características de las prestaciones»).

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

Los resultados del ciclo de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados (Result Display) por personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst»), siguiendo las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación. Desde la ventana «Result Display» se pueden imprimir y guardar los resultados del ciclo de la muestra como «Sample Report» y «Track Report».

D. Generación del informe de los resultados de las muestras

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

En «Sample Report» se muestran los detalles de la sesión de una muestra clasificados por el ID de esta (SID).

En «Track Report» se muestran los detalles de un ciclo de una muestra en cada pista.

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

PROCEDIMIENTO CON EL ELITE BeGenius®

El procedimiento para utilizar el producto «EBV ELITE MGB® Kit» con el sistema **ELITE BeGenius** comprende tres pasos:

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

Verificación de la correcta preparación del sistema

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

- Encender el **ELITE BeGenius** y seleccionar el modo «CLOSED».
- Verificar que los calibradores (**estándar Q-PCR de VEB**) se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («Status»). Esto se puede revisar en el menú «Calibration» de la página de inicio.
- Verificar que los controles de amplificación (**EBV - Positive Control, EBV Negative Control**) se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («Status»). Esto se puede revisar en el menú «Control» de la página de inicio.
- Elegir el tipo de ciclo y configurarlo, siguiendo las instrucciones de la interfaz para la configuración del ciclo y usando los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits ELITE MGB, las matrices correspondientes y el instrumento **ELITE BeGenius**.

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

Protocolos de ensayo para el producto «EBV ELITe MGB Kit» y el ELITe BeGenius			
Nombre	Matriz	Informe	Características
EBV ELITe_Be_WB_200_100	Sangre	copias/mL o UI/mL	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL
EBV ELITe_Be_PL_200_100	Plasma	copias/mL o UI/mL	Volumen de entrada de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de entrada de PCR de la muestra: 20 µL

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

Existen protocolos para ensayos cualitativos bajo petición.

Configuración de la sesión

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

- Sesión de la muestra (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
- Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
- Sesión de calibración (modo de procesamiento «PCR Only»).
- Sesión del control positivo y del control negativo (modo de procesamiento «PCR Only»).

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

Nota: El sistema ELITe BeGenius puede conectarse al servidor de información de ubicaciones (LIS, «Location Information Server»), que permite cargar la información de la sesión de trabajo. Para obtener más información, consultar el manual de instrucciones del instrumento.

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

A. Sesión de la muestra

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

- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de «EBV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de CPE para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Extraer todas las gradillas de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.

- Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode»): «Extract + PCR».
- Cargar las muestras en el área de refrigeración comenzando a partir de la gradilla de muestras L5.
- Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

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

- Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- Seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse en la columna «Assay» (por ejemplo: EBV ELITe_Be_WB_200_100). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Si es necesario realizar una segunda extracción, repetir los pasos del 6 al 9 utilizando la gradilla de muestras L4.
- Cargar las probetas de eluido con códigos de barras en el área de refrigeración, comenzando a partir de la gradilla de elución L3.

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

- Insertar la gradilla de elución L3 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Repetir los pasos 11 y 12 utilizando la gradilla de reactivos/elución L2.
- Cargar el CPE y la mezcla de Q-PCR de VEB en el área de refrigeración.
- Insertar la gradilla de reactivos L1 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar la gradilla de PCR con un cartucho de PCR («PCR Cassette») en el área de inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar la gradilla de extracción con los cartuchos de extracción «ELITe InGenius SP 200» y los consumibles de extracción necesarios siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

B. Sesión de amplificación

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

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

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

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

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

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

C. Sesión de calibración

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de «EBV Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar las probetas de estándar de Q-PCR de VEB (Cal1: estándares de Q-PCR de VEB 10², Cal2: estándares de Q-PCR de VEB 10³, Cal3: estándares de Q-PCR de VEB 10⁴, Cal4: estándares de Q-PCR de VEB 10⁵). Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode»): «PCR Only».
6. Cargar las probetas del calibrador en la gradilla de elución L3.
7. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Aunque no se vaya a realizar la extracción, asegurarse de todas formas de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «EBV ELITE_Be_STD»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla de Q-PCR de VEB en la gradilla de reactivos/elución L2.
11. Insertar la gradilla de reactivos/elución L2 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho de PCR («PCR Cassette») en el área de inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
14. Cerrar la puerta del instrumento.
15. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

D. Sesión del control positivo y del control negativo

Para configurar los ciclos de control positivo y control negativo, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

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

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

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

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

Nota: La mezcla de PCR se puede utilizar para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una y se puede conservar en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

Revisión y aprobación de los resultados

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

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

- A. Validación de la curva de calibración
- B. Validación de los resultados de los controles positivo y negativo de amplificación
- C. Validación de los resultados de la muestra
- D. Generación del informe de los resultados de la muestra.

Nota: Consultar los mismos capítulos del **ELITe InGenius** para obtener más detalles.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: Límite de detección

La sensibilidad analítica de este ensayo, expresada como el límite de detección (LoD), asociada a muestras de sangre y plasma recogidos en EDTA y al uso del **ELITe InGenius**, se evaluó con un panel de diluciones de VEB dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de VEB. El panel comprendió al menos seis puntos en torno a la concentración límite. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, configuración de la sesión, extracción de ácidos nucleicos, amplificación en tiempo real e interpretación de los datos con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las siguientes tablas.

Límite de detección con el ELITe InGenius (UI/mL)				
Volumen de la muestra	Matriz	Límite de detección	Intervalo de confianza del 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
200 µL	Sangre	104 UI/mL	75 UI/mL	175 UI/mL
	Plasma	124 UI/mL	77 UI/mL	290 UI/mL
1000 µL	Plasma	18 UI/mL	13 UI/mL	28 UI/mL

La sensibilidad analítica expresada en copias/mL para cada matriz amniótico y el **ELITe InGenius** se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 30.

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

Límite de detección con el ELITe InGenius (copias/mL)				
Volumen de la muestra	Matriz	Límite de detección	Intervalo de confianza del 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
200 µL	Sangre	36 copias/mL	26 copias/mL	60 copias/mL
	Plasma	65 copias/mL	41 copias/mL	153 copias/mL
1000 µL	Plasma	11 copias/mL	8 copias/mL	18 copias/mL

El valor del LoD calculado se verificó con el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** analizando 20 duplicados de sangre recogida en EDTA y 20 duplicados de plasma recogidos en muestras de EDTA enriquecidas con material de referencia de VEB (Primer estándar internacional de la OMS, NIBSC) a la concentración declarada. El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo según la directiva EP17-A del CLSI.

EBV ELITE MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Límite de detección para muestras de sangre y plasma y el ELITE InGenius					
Muestra	Título	Diana	N	Positivas	Negativas
Sangre entera recogida en EDTA	104 UI/mL	VEB	20	20	0
Plasma recogido en EDTA	124 UI/mL	VEB	20	20	0

Límite de detección para muestras de sangre y plasma y el ELITE BeGenius					
Muestra	Título	Diana	N	Positivas	Negativas
Sangre entera recogida en EDTA	104 UI/mL	VEB	20	19	1
Plasma recogido en EDTA	124 UI/mL	VEB	20	20	0

El valor del LoD para la diana del VEB se confirmó en 104 UI/mL en el caso de muestras de sangre recogida en EDTA y a 124 UI/mL en el caso de muestras de plasma recogido en EDTA.

Rango de medición lineal y límites de cuantificación

El rango de medición lineal del producto «EBV ELITE MGB® Kit» utilizado con muestras de sangre y plasma recogidos en EDTA (volumen de la muestra 200 µL) y en los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se verificó con un panel de diluciones de VEB. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de VEB. El panel constaba de cinco puntos de dilución (1 log₁₀ de pasos de dilución) de 10⁶ UI/mL a 10² UI/mL. Cada muestra del panel se evaluó en 3 duplicados. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal en todos los niveles de dilución.

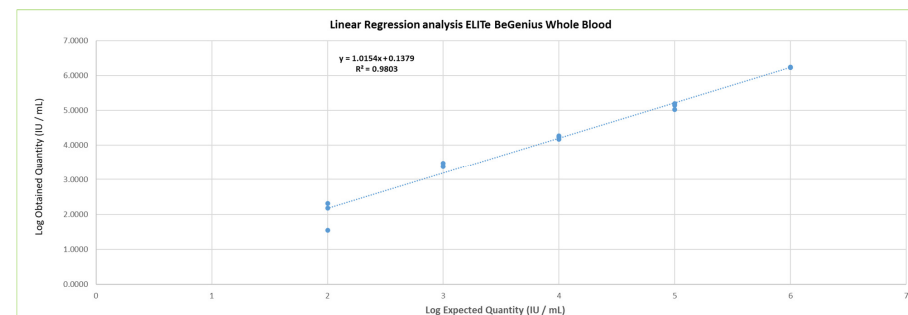
Para sangre:

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de sangre, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,999 para el instrumento **ELITE InGenius** y de 0,980 para el instrumento **ELITE BeGenius**.

EBV ELITE MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.



El límite inferior de cuantificación (LLOq) se estableció en 104 UI/mL, la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2968 log UI/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,2486 log UI mL para el **ELITE BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,4035 log UI mL para el **ELITE InGenius** y de 0,1329 log UI/mL para el **ELITE BeGenius**).

El límite superior de cuantificación (ULOq) se estableció en 1.000.001 UI/mL, la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0299 log UI/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,0079 log UI mL para el **ELITE BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,3459 log UI mL para el **ELITE InGenius** y de 0,2311 log UI/mL para el **ELITE BeGenius**).

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

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Rango de medición lineal para muestras de sangre y los instrumentos ELITE InGenius y ELITE BeGenius			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
200 µL	UI/mL	104	1.000.001
	copias/ml	36	344.828

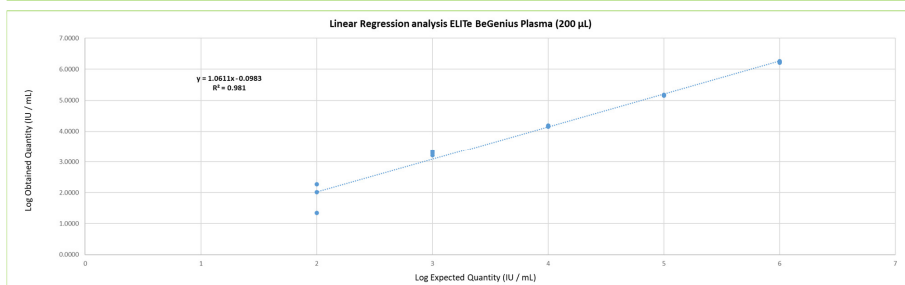
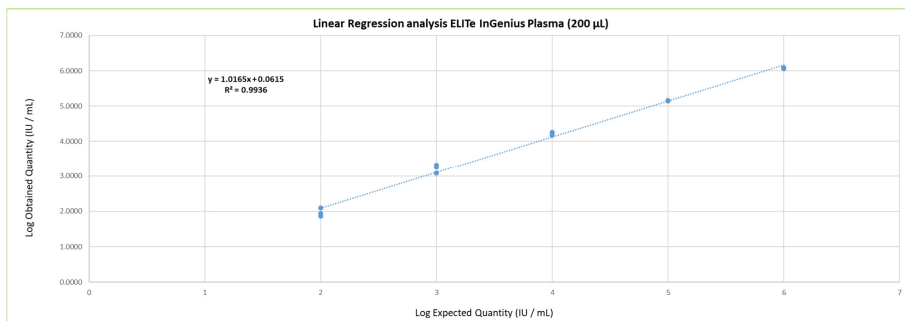
Para plasma (volumen de la muestra 200 µL):

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con el plasma recogido en muestras de EDTA, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,994 para el instrumento **ELITE InGenius** y de 0,981 para el instrumento **ELITE BeGenius**.

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.



El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en la concentración del LoD, que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2728 log UI/mL para el **ELITE InGenius** y 0,3457 log UI/mL para el **ELITE BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,0556 log UI/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,1089 log UI/mL para el **ELITE BeGenius**) dentro del margen de $\pm 0,5$ log UI/mL: 124 UI/mL.

El límite superior de cuantificación (ULoQ) se estableció en la concentración más alta que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar igual a 0,0154 log UI/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,0252 log UI/mL para el **ELITE BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,0761 log UI/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,2348 log UI/mL para el **ELITE BeGenius**) dentro del margen de $\pm 0,5$ log UI/mL: 1.000.000 UI/mL.

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

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Rango de medición lineal para muestras de plasma y los instrumentos ELITE InGenius y ELITE BeGenius (200 µL)

Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	124	1.000.000
copias/ml	65	526.316

Para plasma (volumen de la muestra 1000 µL):

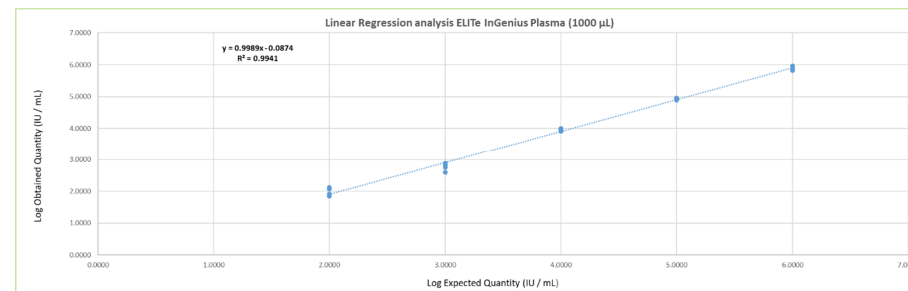
EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

El rango de medición lineal del producto «EBV ELITE MGB® Kit» utilizado con muestras de plasma recogido en EDTA (volumen de la muestra 1000 µL) y en el instrumento **ELITE InGenius** se verificó con un panel de diluciones de VEB. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de VEB. El panel constaba de cinco puntos de dilución (1 log₁₀ de pasos de dilución) de 10⁶ UI/mL a 10² UI/mL. Cada muestra del panel se evaluó en 3 duplicados. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal en todos los niveles de dilución.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de plasma (volumen de la muestra 1000 µL), presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,994 para el instrumento **ELITE InGenius**.

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.



El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció a la concentración más baja que daba resultados cuantitativos precisos (desviación estándar de 0,126 log UI/mL para el **ELITE InGenius**) y exactos (sesgo de -0,015 log UI/mL para el **ELITE InGenius**) en el rango de $\pm 0,5$ log UI/mL: 99 UI/mL.

El límite superior de cuantificación (ULoQ) se estableció a la concentración más alta que daba resultados cuantitativos precisos (desviación estándar de 0,064 log UI/mL para el **ELITE InGenius**) y exactos (sesgo de -0,102 log UI/mL para el **ELITE InGenius**) en el rango de $\pm 0,5$ log UI/mL: 1.000.000 UI/mL.

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

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Rango de medición lineal para muestras de plasma y el ELITE InGenius (1000 µL)			
Volumen de la muestra	Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
1000 µL	UI/mL	99	1.000.000
	copias/ml	62	625.000

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

El límite superior del rango de medición lineal se estableció a la concentración más alta que da resultados cuantitativos suficientemente exactos y precisos.

El rango de medición lineal expresado en copias/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 30.

EBV ELITE MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto «EBV ELITE MGB Kit» en combinación con los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se evaluó analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de VEB (Primer estándar internacional de la OMS para el VEB, NIBSC) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 312 UI/mL) y de 10 veces el LoD (aproximadamente 1040 UI/mL).

Los resultados de repetibilidad dentro de las sesiones con el **ELITE InGenius** se obtuvieron analizando muestras del panel en ocho duplicados, en dos sesiones al día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento, con el mismo operador y en el mismo día. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorias.

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

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

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE InGenius. Lote U0521-016								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N. A.	N. A.	N. A.	24/24	23,97	0,38	1,60
3xLoD	8/8	35,68	0,57	1,60				
10xLoD	8/8	34,22	0,24	0,70				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITE InGenius. Lote U0521-016								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/14	N. A.	N. A.	N. A.	46/46	24,21	0,46	1,91
3xLoD	16/16	35,72	0,53	1,48				
10xLoD	16/16	34,39	0,37	1,07				

En la prueba de repetibilidad con el **ELITE InGenius**, el ensayo detectó la diana del VEB tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 1,6 % en el caso del VEB ni el 1,9 % en el caso del control interno.

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

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

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

EBV ELITE MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE BeGenius. Lote U0521-016								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N. A.	N. A.	N. A.	24/24	27,13	0,76	2,80
3xLoD	8/8	37,32	0,49	1,30				
10xLoD	8/8	35,97	0,43	1,19				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITE BeGenius. Lote U0521-016								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/14	N. A.	N. A.	N. A.	46/46	27,32	0,69	2,53
3xLoD	16/16	37,29	0,67	1,79				
10xLoD	16/16	35,82	0,67	1,86				

En la prueba de repetibilidad con el **ELITE BeGenius**, el ensayo detectó la diana del VEB tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 1,9 % en el caso del VEB ni el 2,8 % en el caso del control interno.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto «EBV ELITE MGB Kit» en combinación con los instrumentos **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se evaluó analizando un panel de muestras de sangre. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de VEB (Primer estándar internacional de la OMS para el VEB, NIBSC) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 312 UI/mL) y de 10 veces el LoD (aproximadamente 1040 UI/mL).

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

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

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

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

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITE InGenius								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N. A.	N. A.	N. A.	24/24	25,25	0,70	2,77
3xLoD	8/8	35,78	0,44	1,24				
10xLoD	8/8	30,38	0,36	1,17				

Repetibilidad entre lotes con el ELITE InGenius								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N. A.	N. A.	N. A.	24/24	25,25	0,70	2,77
3xLoD	8/8	35,91	0,38	1,06				
10xLoD	8/8	34,48	0,15	0,43				

En la prueba de reproducibilidad con el **ELITE InGenius**, el ensayo detectó la diana del VEB tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 1,24 % en el caso del VEB ni el 2,77 % en el caso del control interno.

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

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

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

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

Repetibilidad entre instrumentos con el ELITE BeGenius								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/7	N. A.	N. A.	N. A.	23/23	28,39	0,61	2,14
3xLoD	8/8	36,79	0,86	2,32				
10xLoD	8/8	35,15	0,65	1,84				

Repetibilidad entre lotes con el ELITE BeGenius								
Muestra	VEB				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/7	N. A.	N. A.	N. A.	23/23	28,23	0,57	2,02
3xLoD	8/8	37,45	0,65	1,72				
10xLoD	8/8	35,57	0,42	1,18				

En la prueba de reproducibilidad con el **ELITE BeGenius**, el ensayo detectó la diana del VEB tal como se esperaba y mostró un %CV bajo de valores de Ct que no superó el 2,32 % en el caso del VEB ni el 2,14 % en el caso del control interno.

Reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «EBV Molecular "Q" Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el sistema **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados, obtenidos a partir de 200 µL de muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log ₁₀ IU/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBVMQP01-High	36.577	4,560	2/2	4,835
EBVMQP01-Medium	3.657	3,560	2/2	3,843
EBVMQP01-Low	365	2,560	2/2	2,899
EBVMQP01-Negative	Negativo	-	0/2	-

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

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

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log UI/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados log UI/mL
EBVMQP01-High	36.577	4,560	2/2	4,765
EBVMQP01-Medium	3.657	3,560	2/2	3,795
EBVMQP01-Low	365	2,560	2/2	2,592
EBVMQP01-Negative	negativo	-	0/2	-

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

Se realizaron análisis adicionales utilizando como material de referencia el panel calibrado «AcroMetrix EBV Plasma Panel» (Life Technologies). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el sistema **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados, obtenidos a partir de 200 µL de muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log ₁₀ IU/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
Acrometrix EBV 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	5,791
Acrometrix EBV 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,044
Acrometrix EBV 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	3,776
Acrometrix EBV 1E3	10 ³	3,000	2/2	2,541
Acrometrix EBV 1E2	10 ²	2,000	2/2	2,034

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

Se realizaron más análisis utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2014 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido), un panel de diluciones de VEB. Cada muestra del panel se probó en 2 réplicas con la ejecución del procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados, con el **ELITE InGenius** y los productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados, obtenidos a partir de 200 µL de muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITE InGenius				
Muestra	Consenso conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBVDNA14-01	3,504	0,212	2/2	3,439
EBVDNA14-02	3,169	0,295	2/2	2,876
EBVDNA14-03	2,500	0,310	2/2	2,275
EBVDNA14-04	3,956	0,208	2/2	4,190
EBVDNA14-05	negativas	-	0/2	-
EBVDNA14-06	3,957	0,259	2/2	3,999
EBVDNA14-07	2,962	0,220	2/2	2,953
EBVDNA14-08	3,465	0,221	2/2	3,419

Todas las muestras se detectaron correctamente. Seis (6) de siete muestras positivas se cuantificaron dentro del rango definido mediante el consenso ± 1 desviación estándar (DE) y una muestra (EBVDNA14-04) se cuantificó dentro de ±2 DE. No obstante, esta muestra estaba ligeramente sobrecuantificada (+0,234 log UI/mL, mientras que la DE era de 0,208 log UI/mL).

Se realizaron análisis adicionales, a partir de 1000 µL de muestra, utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2015 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITE InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe InGenius				
Muestra	Consenso conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBVDNA15C1-01	3,418	0,343	2/2	3,220
EBVDNA15C1-02	3,415	0,345	0/2	3,098
EBVDNA15C1-03	Negativo	-	2/2	-
EBVDNA15C1-04	3,955	0,305	2/2	3,697
EBVDNA15C1-05	2,493	0,516	2/2	2,136
EBVDNA15C2-01	3,956	0,350	2/2	3,662
EBVDNA15C2-02	3,942	0,347	2/2	3,697
EBVDNA15C2-03	2,886	0,374	2/2	2,622
EBVDNA15C2-04	3,952	0,377	2/2	3,732
EBVDNA15C2-05	2,912	0,340	2/2	2,723

Todas las muestras se detectaron correctamente. Todas las muestras positivas se cuantificaron dentro del rango definido mediante la desviación estándar (DE) del consenso ± 1.

Se realizaron más análisis utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2014 Epstein-Barr Virus Whole Blood EQA Panel» (Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido), un panel de diluciones de VEB. Cada muestra del panel se analizó en 4 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el sistema **ELITe InGenius** y muestras de sangre y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe InGenius				
Muestra	Consenso conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBVWB14-01	3,361	0,439	4/4	3,242
EBVWB14-02	2,960	0,641	4/4	2,037
EBVWB14-03	3,841	0,367	4/4	3,860
EBVWB14-04	3,845	0,362	4/4	3,786
EBVWB14-05	3,441	0,343	4/4	3,161
EBVWB14-06	4,255	0,451	4/4	4,466
EBVWB14-07	negativas	-	0/4	-
EBVWB14-08	4,889	0,290	4/4	4,955

Todas las muestras se detectaron correctamente. Seis (6) de siete muestras positivas se cuantificaron dentro del rango definido mediante el consenso ± 1 desviación estándar (DE) y una muestra (EBVWB14-02) se cuantificó dentro de ±2 DE. No obstante, esta muestra tenía un título bajo y presentó una DE alta en el estudio de eficacia.

Factor de conversión a unidades internacionales

El factor de conversión que debe utilizarse con este ensayo para transformar el resultado cuantitativo de copias/mL en unidades internacionales/mL se determinó utilizando un panel de material de referencia calibrado aprobado por la OMS, a saber, el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en muestras de sangre y plasma negativas para ADN de VEB y recogidas en EDTA, utilizando para ello el **ELITe InGenius**. El panel tenía al menos 3 pasos de dilución de 1 log. Cada punto del panel se analizó en al menos 10 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

Factor de conversión a unidades internacionales de sangre, Fc = 2,9 UI/copia						
Muestra			Resultado			Diferencia logarítmica (referencia - prueba)
UI/mL	log UI/mL	N	Media de copias/mL	Media de UI/mL	Media de log UI/mL	
100000	5,000	10	47041	135479	5,108	-0,108
10000	4,000	10	4509	12987	4,063	-0,063
1000	3,000	10	223	641	2,746	+0,254

Factor de conversión a unidades internacionales de plasma (volumen de la muestra 200 µL), Fc = 1,9 UI/copia						
Muestra			Resultado			Diferencia logarítmica (referencia - prueba)
UI/mL	log UI/mL	N	Media de copias/mL	Media de UI/mL	Media de log UI/mL	
100000	5,000	10	72352	137469	5,128	-0,128
10000	4,000	10	5092	9674	3,967	0,033
1000	3,000	10	435	826	2,904	0,096

Factor de conversión a unidades internacionales de plasma (volumen de la muestra 1000 µL), Fc = 1,6 UI/copia						
Muestra			Resultado			Diferencia logarítmica (referencia - prueba)
UI/mL	log UI/mL	N	Media de copias/mL	Media de UI/mL	Media de log UI/mL	
316228	5,5	16	182001	291201	5,459	0,041
100000	5	16	57197	91515	4,953	0,047
31623	4,5	16	20626	33002	4,510	-0,010
10000	4	16	6911	11058	4,028	-0,028
3162	3,5	16	2086	3338	3,514	-0,014
1000	3	16	604	966	2,965	0,035

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

Factor de conversión a unidades internacionales con el ELITe InGenius		
Volumen de la muestra	Matriz	Fc (UI copias)
200 µL	Sangre	2,9
	Plasma	1,9
1000 µL	Plasma	1,6

El factor de conversión, para convertir un resultado cuantitativo de copias/mL en unidades internacionales/mL, se verificó para el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** analizando los resultados obtenidos durante la prueba de linealidad.

La precisión de cuantificación de la diana, expresada como la desviación estándar de log UI/mL, fue inferior a 0,5 log tanto en las muestras de sangre como en las de plasma y cumplió los criterios de aceptación del **ELITe InGenius** y del **ELITe BeGenius**.

La exactitud de cuantificación de la diana, expresada como la diferencia entre las concentraciones teóricas y medidas en log UI/mL, fue inferior a 0,5 log tanto en las muestras de sangre como en las de plasma y cumplió los criterios de aceptación del **ELITe InGenius** y del **ELITe BeGenius**.

Estos resultados confirmaron los factores de conversión calculados para cada matriz utilizando el **ELITe InGenius**.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

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

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

- 30 muestras de sangre recogida en EDTA positivas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).
- 12 muestras de plasma recogido en EDTA de pacientes positivas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real) y en 35 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VEB, que se enriquecieron con ADN de VEB añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido).

El análisis, comenzando con 1000 µL de muestra, se realizó en 30 muestras de plasma recogido en EDTA y negativas para ADN de VEB, que se enriquecieron con ADN de VEB añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido).

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

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Volumen de la muestra	Muestras	N	positivas	negativas
200 µL	Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de VEB	30	30	0
	Plasma recogido en EDTA y positivo para ADN de EBV	12	12	0
	Plasma recogido en EDTA y enriquecido con ADN de VEB	35	35	0
1000 µL	Plasma recogido en EDTA y enriquecido con ADN de VEB	30	29	1

Todas las muestras de sangre se confirmaron como válidas y positivas para ADN de VEB. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

Todas las muestras de sangre (200 µL) se confirmaron como válidas y positivas para ADN de VEB. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

De 30 muestras de plasma (1000 µL), 29 se confirmaron como válidas y positivas para ADN de VEB, mientras que una muestra presentó un resultado negativo, diferente del resto. En estos análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 96,7 %.

Todas las muestras, analizadas a partir de 1000 µL de muestra, fueron válidas para el análisis; 29 de 30 muestras de plasma se confirmaron como positivas, mientras que una muestra presentó un resultado negativo, diferente del resto. En estos análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 96,7 %.

En estos análisis, la sensibilidad diagnóstica total del ensayo fue del 99 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

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

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

- 32 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).
- 61 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real).

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

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

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Volumen de la muestra	Muestras	N	positivas	negativas
200 µL	Sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de VEB	32	3	29
	Plasma recogido en EDTA y negativo para ADN de VEB	61	1	60
1000 µL	Plasma recogido en EDTA y supuestamente negativo para ADN de VEB	62	2	60

De 32 muestras de sangre, 29 se confirmaron como negativas para ADN de VEB, mientras que tres muestras presentaron un resultado positivo a bajo título, diferente del resto. Estas muestras tenían un título inferior al límite de detección del método para ADN de VEB; estas muestras pueden presentar resultados aleatorios negativos o positivos. Los resultados diferentes se pueden explicar si se tiene en cuenta que el VEB es un virus ampliamente extendido entre la población de forma latente.

En este análisis con sangre, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 90,6 %.

De 61 muestras de plasma (200 µL), 60 se confirmaron como válidas negativas para ADN de VEB, mientras que una muestra presentó un resultado positivo a bajo título, diferente del resto. Esta muestra tenía un título cercano al límite de detección del método para ADN de VEB; esta muestra puede presentar resultados aleatorios negativos o positivos. El resultado diferente se pueden explicar si se tiene en cuenta que el VEB es un virus ampliamente extendido entre la población de forma latente.

En este análisis con plasma, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 98,4 %.

De 62 muestras de plasma (1000 µL), 60 se confirmaron como válidas negativas para ADN de VEB, mientras que dos muestras presentaron un resultado positivo a bajo título, diferente del resto. Esta muestra tenía un título cercano al límite de detección del método para ADN de VEB; esta muestra puede presentar resultados aleatorios negativos o positivos. El resultado diferente se pueden explicar si se tiene en cuenta que el VEB es un virus ampliamente extendido entre la población de forma latente.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 96,8 %.

En estos análisis, la especificidad total del ensayo fue del 96 %.

El valor de corte del Control Interno Ct (IC Ct) se fija en 35.

Nota: Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «EBV ELITE MGB® Kit», FTP RTS020PLD.

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Instrumento de PCR en tiempo real ABI 7500 Fast Dx
Sistema de PCR en tiempo real ABI 7300

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

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

Sangre recogida en EDTA

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

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir 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: si la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza utilizando el kit «**EXTRAblood**», seguir las instrucciones del manual: comenzar con **200 µL** de muestra (no más de 2 millones de leucocitos) y eluir el ADN en **100 µL** de solución tampón de elución.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «**ELITE STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**UUNI_E100_S200_ELI**», que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL. Las muestras de las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITE STAR**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en el tubo de proteinasa Carrier según se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de muestras de sangre se realiza con el «**ELITE GALAXY**» y la **versión 1.3.1 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**xNA Extraction (Universal)**», que utiliza 300 µL de muestra y eluye el extracto en 200 µL. Las muestras incluidas en las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITE GALAXY**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 400 a 650 µL, según la clase de probeta utilizada. Añadir **10 µL/muestra** de **CPE**. El **CPE** debe añadirse a la solución **IC + Carrier** tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», es necesario utilizar el protocolo de extracción **Generic 2.0.1** y seguir estas instrucciones: verter **100 µL** de muestra en la tira de 8 pocillos, cargar la tira en el instrumento y realizar la extracción sin incubación por lisis. Una vez que el instrumento ha añadido la **solución tampón de lisis EasyMAG®**, sin retirar la tira, mezclar tres veces el contenido de la tira con la pipeta multicanal incluida en el volumen de suministro utilizando el programa número 3. Incubar durante 10 minutos y, después, añadir el **NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica** al contenido de la tira con la pipeta multicanal utilizando el programa número 3 y continuar con la extracción.. Eluir los ácidos nucleicos en **50 µL** de solución tampón de elución.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» y el kit «**QIASymphony® DNA Mini Kit**» con la **versión 3.5 del software**, es necesario utilizar el protocolo de extracción «**Virus Blood 200_V4_default IC**» y seguir estas instrucciones: el instrumento es capaz de utilizar una probeta primaria, el volumen de muestra necesario para la extracción es **200 µL** y siempre se necesita un volumen nuestro mínimo de 100 µL. Cargar en el instrumento, en la ranura para el «control interno», las probetas que contienen la solución, tal como se indica en las instrucciones del manual de usuario del kit; indicar la posición en la que deben distribuirse los eluidos y especificar el volumen de elución de **60 µL** (la elución se lleva a cabo en realidad en 90 µL, de los cuales se recuperan 60 µL). Para obtener información detallada sobre el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones del manual de uso del kit.

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de los ácidos nucleicos debe recogerse en EDTA de acuerdo con las prácticas del laboratorio, transportarse a +2 / +8 °C, y almacenarse a +2 / +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben ser congeladas y almacenadas a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante períodos más largos.

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: cuando la extracción de ADN de plasma se realiza con el «**ELITE STAR**» y con la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**UUNI_E100S_200_ELI**», que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL (la elución se lleva a cabo en realidad en 115 µL, de los cuales se recuperan 100 µL). Las muestras de las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITE STAR**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 400 a 600 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en el tubo de proteinasa Carrier según se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN de plasma se realiza con el «**ELITE GALAXY**» y la **versión 1.3.1 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**xNA Extraction (Universal)**», que utiliza 300 µL de muestra y eluye el extracto en 200 µL (la elución se lleva a cabo realmente en 210 µL, de los cuales se recuperan 200 µL). Las muestras incluidas en las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITE GALAXY**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 400 a 650 µL, según la clase de probeta utilizada. Añadir **10 µL/muestra** de **CPE**. El **CPE** debe añadirse a la solución **IC + Carrier** tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el instrumento «**QIASymphony® SP/AS**» y el kit «**QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi kit**» con la **versión 3.5 del software**, es necesario utilizar el protocolo de extracción «**Virus Cell free 500_V3_DSP_default IC**» y seguir estas indicaciones: el instrumento puede utilizar una probeta primaria, el volumen de muestra necesario para la extracción es de **500 µL** y se necesita siempre un volumen muerto mínimo de 100 µL. Preparar la solución que contiene tampón AVE y ARN Carrier, tal como se indica en el manual de instrucciones del kit de extracción. Añadir **6 µL/muestra** de **CPE** a la solución para cada muestra requerida. Cargar en el instrumento, en la ranura para el «control interno», las probetas que contienen la solución, tal como se indica en las instrucciones del manual de usuario del kit; indicar la posición en la que deben distribuirse los eluidos y especificar el volumen de elución de **85 µL**. Para obtener información detallada sobre el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones del manual de uso del kit.

Líquido ceforraquideo (LCR)

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

Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas.

Sustancias interferentes

Con el fin de evitar problemas de inhibición y el riesgo de resultados no válidos con frecuencia, el ADN extraído de la muestra no debe contener heparina, hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol ni 2-propanol. Una alta cantidad de ADN genómico humano en el ADN extraído de la muestra puede inhibir la reacción de amplificación.

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

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Controles de amplificación

Cada amplificación debe validarse necesariamente con una reacción de control negativo y una de control positivo.

Para el control negativo, utilizar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro de este producto), añadida a la reacción en lugar del ADN extraído de la muestra.

Para el control positivo, utilizar el producto «**EBV ELITE Positive Control**» o el producto «**EBV ELITE Standard**».

Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis de cada ejecución de extracción y amplificación, probando los controles del proceso, como por ejemplo una muestra que haya resultado negativa y una que haya resultado positiva o un material de referencia calibrado.

Se deben realizar controles externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda. Un ejemplo de control externo disponible comercialmente es el producto «EBV Molecular Q Panel» (código EBVMQP01 de Qnostics Ltd, Reino Unido).

PROCEDIMIENTO

Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

Debe realizarse en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación.

Cuando se utiliza el instrumento del **sistema de PCR en tiempo real 7300**.

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

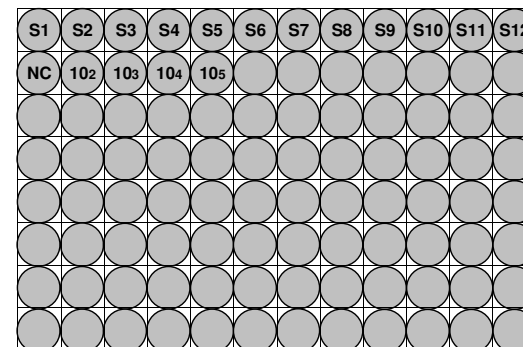
- Encender el termociclador de tiempo real, encender el ordenador, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de «cuantificación absoluta».
- Configurar (administrador del detector) el «detector» para la sonda EBV con el «reporter» = «FAM» y el «quencher» = «none» (no fluorescente) y denominarlo « EBV».
- Configurar (administrador de detectores) el detector para el control interno con el marcador «VIC» (AP525 es análogo a VIC) y el inhibidor «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «IC».
- Para cada pocillo utilizado en la microplaca, configurar el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir), la referencia pasiva («passive reference») o «ROX» (AP593 se utiliza en lugar de ROX, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o estándar en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de este manual o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

NOTA: Para determinar el título del ADN en la muestra inicial, configurar una serie de reacciones con los **estándares Q-PCR** (105 copias, 104 copias, 103 copias, 102 copias) para obtener la **curva estándar**.

EBV ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

A continuación, encontrará un ejemplo de cómo organizar el análisis cuantitativo de 12 muestras.



Leyenda: S1 - S12: Muestras por analizar; NC: Negative Control de amplificación; 102: 102 copias estándar; 103: 103 copias estándar; 104: 104 copias estándar; 105: 105 copias estándar.

Siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento, utilizar el software dedicado («Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile») para definir los parámetros del ciclo térmico:
 - Añadir a la fase de amplificación el paso de **extensión a 72 °C** (opción «Add Step»).

Nota: La adquisición de fluorescencia («Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection») debe configurarse durante el paso de hibridación a 60 °C.

- Modificar la temporización como se indica en la siguiente tabla **«Ciclo térmico»**.
- Establecer el número de ciclos a **45**.
- Configurar el volumen para la emulación del software de la transferencia térmica a la reacción («Sample volume») en **30 µL**.
- Opcional: Añadir la fase de disociación («Add Dissociation Stage») y configurar una temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Fase	Ciclo térmico	
	Temperaturas	Temporización
Descontaminación	50 °C	2 min
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
Amplificación y detección (45 ciclos)	94 °C	10 s
	60 °C (recogida de datos)	30 s
	72 °C	20 s
Disociación (opcional)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

Si se utiliza un **instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx**, tener en cuenta lo siguiente:

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

- Encender el termociclador en tiempo real, encender el ordenador, ejecutar el software específico y abrir una sesión de cuantificación absoluta («absolute quantification») y configurar «Run mode: Fast 7500».
- Configurar (administrador del detector) el «detector» para la sonda EBV con el «reporter» = «FAM» y el «quencher» = «none» (no fluorescente) y denominarlo « EBV».

- Configurar (administrador del detector) el «detector» para la sonda de control interno con el «reporter» = «VIC» (AP525 es similar al VIC) y el «quencher» = «none» (no fluorescente) y denominarlo «IC».
- Para cada pocillo empleado en la microplaca, configurar (inspector de pocillos) el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir), la referencia pasiva («passive reference») o «Cy5» (AP593 se usa en lugar de Cy5, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o estándar en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de este manual o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

Nota: Para determinar el título del ADN en la muestra inicial, configurar una serie de reacciones con los estándares Q-PCR (105 copias, 104 copias, 103 copias, 102 copias) para obtener la **curva estándar**.

La configuración del análisis cuantitativo de 12 muestras se indica, a modo de ejemplo, en el apartado anterior, donde se describe el procedimiento para el **sistema de PCR en tiempo real 7300**.

Siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento, utilizar el software dedicado («Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile») para definir los parámetros del **ciclo térmico**:

- Añadir a la fase de amplificación el paso de **extensión a 72 °C** (opción «Add Step»).

Nota: La adquisición de la fluorescencia («Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection») debe configurarse durante el paso de hibridación a 60 °C.

- Modificar la temporización tal como se indica en la tabla «Ciclo térmico».
- Establecer el número de ciclos a **45**.
- Configurar el volumen para la emulación del software de la transferencia térmica a la reacción («Sample volume») en **30 µL**.
- Opcional: Añadir la fase de disociación («Add Dissociation Stage») y configurar una temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Temporización
Descontaminación	50 °C	2 min
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
Amplificación y detección (45 ciclos)	94 °C	10 s
	60 °C (recogida de datos)	30 s
	72 °C	20 s
Disociación (opcional)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min
	80 °C	15 s
Disociación (opcional)	60 °C	15 s

Configuración de la amplificación

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

Antes de iniciar la sesión, es importante realizar las siguientes operaciones:

- Tomar y descongelar las probetas que contienen las muestras que se van a analizar. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
- Tomar y descongelar las probetas de la mezcla «**EBV Q - PCR Mix**» necesarias para la sesión, recordando que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Mezclar delicadamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
- Tomar y descongelar las probetas de «**EBV - ELITE Positive Control**» o de **estándar Q-PCR de VEB**. Mezclarlos delicadamente, centrifugarlos durante 5 segundos centrifugando el contenido y conservarlos en hielo.
- Tomar la **microplaca de amplificación** que se usará durante la ejecución, prestando atención a manipularla con guantes sin talco y a no dañar los pocillos.

1. Pipetear con precisión **20 µL** de mezcla «**EBV Q - PCR Mix**» en el fondo de los pocillos de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Evitar la formación de burbujas.

Nota: Si no se utiliza toda la mezcla de reacción, conservar el volumen que queda en un lugar protegido de la luz a -20 °C durante un máximo de un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacción un máximo de **5 veces**.

2. Pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de **ADN extraído** de la primera muestra en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma forma con otras muestras del **ADN extraído**.
3. Pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción, **20 µL** de agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro de este producto) en el pocillo de la **microplaca de amplificación** del control negativo de amplificación, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando el **agua de calidad para biología molecular** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
4. Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:

- Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de VEB), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «**EBV - ELITE Positive Control**» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando el producto «**EBV - ELITE Positive Control**» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

- Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación de ADN de VEB), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «**EBV Q - PCR Standard 102**» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el estándar pipeteando el **estándar Q-PCR de VEB** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma manera con los demás **estándares Q-PCR (103, 104, 105)**.

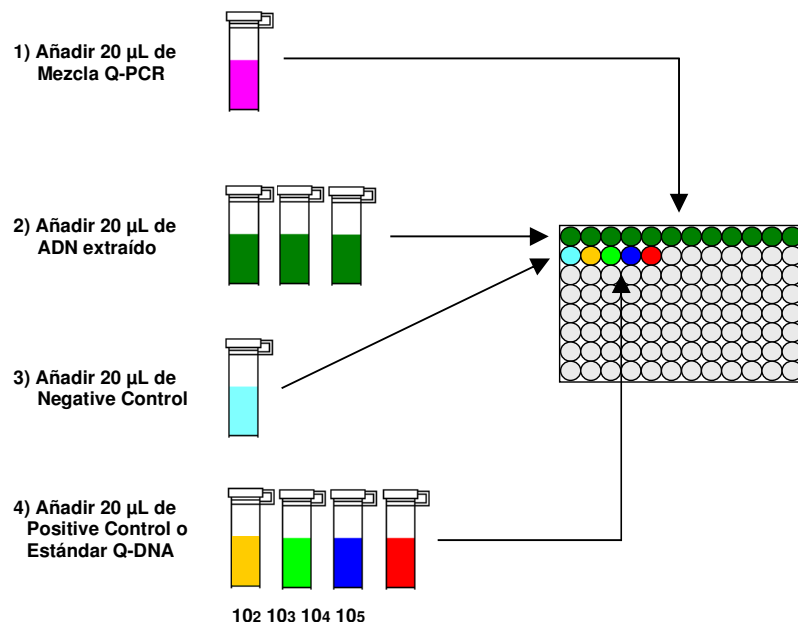
5. Sellar con precisión la **microplaca de amplificación** con la **placa de sellado de amplificación**.
6. Transferir la **microplaca de amplificación** al termociclador en tiempo real en el área de amplificación/detección de productos de amplificación y comenzar el ciclo térmico para la amplificación guardando la configuración de la sesión con un nombre de archivo único y reconocible (por ejemplo «año-mes-día-VEB-EGSpA»).

Nota: Al finalizar el ciclo térmico, la **microplaca de amplificación** y los productos de reacción deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Para evitar derramar los productos de reacción, la **placa de sellado de amplificación no debe quitarse de la microplaca de amplificación**.

La siguiente figura muestra de forma sintética la preparación de la reacción de amplificación.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD



Nota: si la preparación de la amplificación se realiza con el instrumento «QIASymphony® SP/AS», introducir la microplaca que contiene los extractos, los reactivos y la microplaca de amplificación en las ranuras específicas, utilizando adaptadores especiales y, después, seguir las indicaciones en las instrucciones del manual de usuario para la configuración del módulo y los pasos indicados por el software.

Nota: si la preparación de la reacción de amplificación se realiza con el instrumento «ELITE GALAXY», cargar la microplaca de elución, la mezcla de Q-PCR y la microplaca de amplificación tal como se indica en el manual de usuario del instrumento y siguiendo los pasos indicados en la interfaz.

Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica del VEB (detector FAM «EBV») y por la sonda específica del control interno (detector VIC «IC») en las reacciones de amplificación deben analizarse con el software del instrumento.

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

- Configurar manualmente («Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle») el rango de cálculo para el **punto de referencia** (nivel de fondo de fluorescencia) del ciclo 6 al ciclo 15.

Nota: En caso de muestra positiva con un alto título de ADN de VEB, la fluorescencia FAM de la sonda específica del VEB puede empezar a aumentar antes del ciclo 15. En este caso, el rango de cálculo para el **punto de referencia** debe adaptarse del ciclo 6 al ciclo en el que la fluorescencia FAM de la muestra empieza a aumentar, según detecte el software del instrumento («Results > Component»).

Cuando se usa un **sistema de PCR en tiempo real 7300:**

- Configurar manualmente el **umbral** para el «EBV» del detector FAM a **0,1**.
- Configurar manualmente el **umbral** para el «IC» del detector VIC a **0,05**.

Cuando se usa un **equipo de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx:**

- Configurar manualmente el **umbral** para el «EBV» del detector FAM a **0,2**.
- Configurar manualmente el **umbral** para el «IC» del detector VIC a **0,1**.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los valores de fluorescencia emitidos por las sondas específicas en la reacción de amplificación y el valor **umbral** de fluorescencia permiten determinar el **ciclo umbral (Ct)**, es decir, el ciclo en el que la fluorescencia ha alcanzado el valor **umbral**.

En la reacción de amplificación del **control positivo***, el valor **Ct** del VEB («Results > Report») se utiliza para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la siguiente tabla:

Reacción del Positive Control detector FAM «EBV»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Positive Control** es **Ct >25** o **Ct Undetermined** para el VEB, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante los pasos de amplificación o detección (dosificación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La ejecución no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

*** Nota:** Cuando este producto se utiliza para la cuantificación de ADN de VEB, las reacciones del **estándar Q-PCR** se han configurado en lugar de la reacción del **Positive Control**. En este caso, es preciso validar la amplificación y la detección haciendo referencia a la reacción de amplificación del **estándar Q - PCR 105 (Ct ≤ 25)**.

En la reacción de amplificación del **Negative Control**, el valor **Ct** del VEB («Results > Report») se utiliza para validar la amplificación y la detección tal como se describe en la siguiente tabla:

Reacción del Negative Control detector FAM «EBV»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación para el **Negative Control** es diferente de **Ct Undetermined** para el VEB, significa que se ha detectado el ADN diana. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En la reacción de amplificación de cada **muestra**, el valor **Ct** del VEB se utiliza para detectar el ADN diana, mientras que el valor **Ct** del control interno se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

Nota: Utilizar el software del instrumento para verificar («Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle») que el valor **Ct** se haya determinado mediante un aumento rápido y uniforme de los valores de fluorescencia y no mediante picos o un aumento del fondo (fondo irregular o alto).

Este producto puede detectar una cantidad mínima de unas 10 copias de ADN del gen EBNA-1 del VEB en la reacción de amplificación, que corresponde a 10 equivalentes genómicos por reacción (límite de detección para el producto, consultar el apartado «Características de rendimiento»).

Los resultados en términos de **Ct** de las reacciones de amplificación de cada **muestra** («Results > Report») se utilizan tal como se describe en la siguiente tabla:

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ADN de VEB
detector FAM «EBV»	detector VIC «IC»			
Ct no determinado	Ct >35 o Ct Undetermined	no idónea	no válido	-
	Ct ≤35	idónea	Válido, negativo	NO DETECTADO
Ct determinado	Ct >35 o Ct Undetermined	idóneo*	válida, positiva	DETECTADO
	Ct ≤35	idónea	válida, positiva	DETECTADO

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VEB y **Ct > 35** o **Ct Undetermined** para el control interno, significa que ha sido imposible detectar correctamente el ADN para el control interno. En este caso, se han presentado problemas durante el paso de amplificación (amplificación no eficiente o ausente) o durante el paso de extracción (degradación del ADN muestra, muestra con un número demasiado bajo de células, reducción del título de ADN durante la extracción o la presencia de inhibidores en el ADN extraído), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra no es idónea, el ensayo no es válido y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VEB y **Ct ≤35** para el control interno, significa que el ADN de VEB no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VEB tenga un título inferior al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

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

***Nota:** Cuando en la reacción de amplificación de una muestra se detecta ADN de VEB, el control interno puede tener el resultado **Ct > 35** o **Ct Undetermined**. De hecho, la reacción de amplificación de baja eficiencia para el control interno puede desplazarse mediante competencia con la reacción de amplificación de alta eficiencia para ADN de VEB. En este caso, la muestra será de todas maneras idónea y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis cuantitativo de los resultados

Tras el procedimiento de análisis cualitativo de los resultados, se puede llevar a cabo el análisis cuantitativo de los resultados de las muestras positivas.

En las reacciones de amplificación de los cuatro **estándares Q-PCR**, los valores de **Ct** del VEB se utilizan para calcular la **curva estándar** («Results > Standard Curve») para la sesión de amplificación y validar la amplificación y la detección tal como se describe en la siguiente tabla:

Curva estándar detector FAM «EBV»	Rango de aceptabilidad	Amplificación/Detección
Coefficiente de correlación (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTA

Si el **coeficiente de correlación (R2)** no se encuentra dentro de los límites establecidos, querrá decir que se han presentado problemas durante los pasos de amplificación o detección (dosificación incorrecta de la mezcla de reacción o de los estándares, degradación de la mezcla de reacción o de los estándares, configuración incorrecta de la posición de los estándares, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede conllevar resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

Los valores **Ct** del VEB en la reacción de amplificación de cada **muestra** y la **curva estándar** de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ADN diana presente en las reacciones de amplificación de las muestras.

Este producto puede cuantificar de 1.000.000 a 10 copias de ADN del gen EBNA-1 del VEB en la reacción de amplificación, que corresponden a los equivalentes genómicos por reacción (rango de medición lineal del producto, consultar el apartado «Características de rendimiento»), tal como se describe en la siguiente tabla:

Resultado de la muestra detector FAM «EBV»	Equivalentes genómicos del VEB por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1 × 10 ¹ ≤ Cantidad ≤ 1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad <1 × 10 ¹	MENOS DE 10

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados (**cantidad**) de cada **muestra** («Results > Report») se utilizan para calcular los equivalentes genómicos (**gEq**) del VEB presentes en la muestra extraída (**Nc**) según la siguiente fórmula:

$$Nc = \frac{Ve \times Cantidad}{Vc \times Va \times Ep}$$

Donde:

Vc es la cantidad de la muestra usada en la extracción con respecto a la unidad requerida de medición, **Ep** es la eficiencia del procedimiento, extracción y amplificación, **expresada en decimales**, **Ve** es el volumen total del producto de extracción **expresado en µl**, **Va** es el volumen del producto de extracción usado en la reacción de amplificación **expresado en µl**, **Cantidad** es el resultado de la reacción de amplificación de la muestra **expresada en gEq por reacción**.

Cuando el kit «**EXTRAblood**» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «EXTRAblood»

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

Cuando el «**ELITE STAR**» se utiliza con muestras de sangre y plasma recogidos en EDTA y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre, plasma y el ELITE STAR

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

Cuando el «**ELITE GALAXY**» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre, plasma y el ELITE GALAXY

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

Cuando el sistema de extracción «**NucliSENS® easyMAG®**» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «NucliSENS® easyMAG®»

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

Cuando el sistema de extracción «**QIAAsymphony® SP/AS**» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «QIAAsymphony® SP/AS»

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

Cuando el sistema de extracción «**QIAAsymphony® SP/AS**» se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma y el «QIAAsymphony® SP/AS»

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

Cálculo de los límites del rango de medición

Cuando se utiliza un método de extracción concreto, los límites del rango de medición pueden calcularse a partir del rango de medición de la reacción de amplificación de acuerdo con la siguiente fórmula:

$\text{Límite inferior (gEq/mL)} = \frac{Ve \ 10 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$
$\text{Límite superior (gEq/mL)} = \frac{Ve \ 1.000.000 \text{ gEq}}{Vc \times Va \times Ep}$

Cuando el kit de extracción «EXTRAgen» se utiliza con muestras celulares, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (gEq/mL) con «EXTRAblood»
Límite inferior (gEq/mL) = 25 × 10 gEq Límite superior (gEq/mL) = 25 × 1.000.000 gEq
de 250 a 25,000,000 gEq/mL

Cuando el sistema de extracción «ELITE STAR» se utiliza con muestras celulares y no celulares, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «ELITE STAR»
Límite inferior (gEq/mL) = 28 × 10 gEq Límite superior (gEq/mL) = 28 × 1.000.000 gEq
de 280 a 28,000,000 gEq/mL

Cuando el sistema de extracción «ELITE GALAXY» se utiliza con muestras celulares y no celulares, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «ELITE GALAXY»
Límite inferior (gEq/mL) = 35 × 10 gEq Límite superior (gEq/mL) = 35 × 1.000.000 gEq
de 350 a 35,000,000 gEq/mL

Cuando el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®» se utiliza con muestras celulares, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (gEq/mL) con «NucliSENS® easyMAG®»
Límite inferior (gEq/mL) = 50 × 10 gEq Límite superior (gEq/mL) = 50 × 1.000.000 gEq
de 500 a 50,000,000 gEq/mL

Cuando el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS» se utiliza con muestras celulares, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «QIASymphony® SP/AS»
Límite inferior (gEq/mL) = 23 × 10 gEq Límite superior (gEq/mL) = 23 × 1.000.000 gEq
de 230 a 23,000,000 gEq/mL

Cuando el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS» se utiliza con muestras no celulares, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «QIASymphony® SP/AS»
Límite inferior (gEq/mL) = 12 × 10 gEq Límite superior (gEq/mL) = 12 × 1.000.000 gEq
de 120 a 120,000,000 gEq/mL

Conversión de los resultados a las unidades internacionales (UI)

Cuando el kit de extracción «EXTRAblood» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «EXTRAblood»
$Fc = 2,0 \text{ UI/gEq}$ $Nc \text{ (UI/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$ $Nc \text{ (UI/mL)} = 50 \times \text{Cantidad}$

Cuando el sistema de extracción «ELITE STAR» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «ELITE STAR»
$Fc = 2,09 \text{ UI/gEq}$ $Nc \text{ (UI/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$ $Nc \text{ (UI/mL)} = 58,2 \times \text{Cantidad}$

Cuando el sistema de extracción «ELITE STAR» se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma y el «ELITE STAR»
$Fc = 2,15 \text{ UI/gEq}$ $Nc \text{ (UI/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$ $Nc \text{ (UI/mL)} = 60,2 \times \text{Cantidad}$

Cuando el sistema de extracción «ELITE GALAXY» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «ELITE GALAXY»
$Fc = 0,89 \text{ UI/gEq}$ $Nc \text{ (UI/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$ $Nc \text{ (UI/mL)} = 31,2 \times \text{Cantidad}$

Cuando el sistema de extracción «ELITE GALAXY» se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma y el «ELITE GALAXY»
$Fc = 0,76 \text{ UI/gEq}$ $Nc \text{ (UI/mL)} = Nc \text{ (gEq/mL)} \times Fc$ $Nc \text{ (UI/mL)} = 26,6 \times \text{Cantidad}$

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Cuando el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®», se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado **expresado en UI/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «NucliSENS® easyMAG®»	
Fc = 1,7 UI/gEq	
Nc (UI/mL) = Nc (gEq/mL) × Fc	
Nc (UI/mL) = 85 × Cantidad	

Cuando el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado **expresado en UI/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el «QIASymphony® SP/AS»	
Fc = 1,8 UI/gEq	
Nc (UI/mL) = Nc (gEq/mL) × Fc	
Nc (UI/mL) = 41 × Cantidad	

Cuando el sistema de extracción «QIASymphony® SP/AS» se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado **expresado en UI/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma y el «QIASymphony® SP/AS»	
Fc = 2,3 UI/gEq	
Nc (UI/mL) = Nc (gEq/mL) × Fc	
Nc (UI/mL) = 28 × Cantidad	

Donde **Fc** es el factor de conversión establecido utilizando el material calibrado de referencia aprobado por el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr», código NIBSC 09/260, Reino Unido (consultar apartado «Características de rendimiento»).

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección

La sensibilidad analítica de este ensayo permite detectar la presencia de unas 10 moléculas de ADN diana en 20 µl de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección, se ha probado utilizando ADN plasmídico que contiene el producto de amplificación, en una concentración inicial medida con el espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a un título de 10 copias/20 µL en ADN genómico humano a un título de 500 ng/20 µL. Esta muestra se analizó en 50 réplicas realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

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

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de sangre y el «ELITe STAR» se evaluó con un panel de diluciones de VEB dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de VEB. Las concentraciones virales variaron entre 3,160 UI/ml y 1000 UI/ml. Cada muestra del panel se analizó en 8 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe STAR» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados finales se indican en las siguientes tablas.

Límite de detección para muestras de sangre y el «ELITe STAR» (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	212 UI/mL	113 UI/mL	805 UI/mL

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

Límite de detección para muestras de sangre y el «ELITe STAR» (gEq/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	101 gEq/mL	54 gEq/mL	385 gEq/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de plasma y el «ELITe STAR» se evaluó con un panel de diluciones de VEB dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en plasma recogido en EDTA y negativo para ADN de VEB. Las concentraciones virales variaron entre 3,160 UI/ml y 1000 UI/ml. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe STAR» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las siguientes tablas.

Límite de detección para muestras de plasma y el «ELITe STAR» (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	229 UI/mL	108 UI/mL	1571 UI/mL

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

Límite de detección para muestras de plasma y el «ELITe STAR» (gEq/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	107 gEq/mL	50 gEq/mL	731 gEq/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» se evaluó con un panel de diluciones de VEB dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de VEB. Las concentraciones virales variaron entre 10 UI/ml y 560 UI/ml. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe GALAXY» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las siguientes tablas.

Límite de detección para muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	99 UI/mL	57 UI/mL	376 UI/mL

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

Límite de detección para muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» (gEq/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	111 gEq/mL	64 gEq/mL	422 gEq/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» se evaluó con un panel de diluciones de VEB dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en plasma recogido en EDTA y negativo para ADN de VEB. Las concentraciones virales variaron entre 10 UI/ml y 560 UI/ml. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe GALAXY» y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las siguientes tablas.

Límite de detección para muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	97 UI/mL	66 UI/mL	284 UI/mL

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

Límite de detección para muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» (gEq/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	128 gEq/mL	87 gEq/mL	374 gEq/mL

Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

La sensibilidad analítica de este ensayo permite efectuar la cuantificación de 1.000.000 a 10 moléculas de ADN diana en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de este ensayo, expresada como rango de medición lineal, se determinó utilizando un panel de diluciones (1 log₁₀ entre una dilución y la siguiente) de un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación, cuya una concentración inicial se midió con un espectrofotómetro. Las diluciones de 107 moléculas por reacción a 10¹ moléculas por reacción se analizaron en 9 duplicados, realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos, realizados mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal para todos los puntos del panel (coeficiente de correlación lineal superior a 0,99).

El límite superior del rango de medición lineal se estableció a 10⁶ moléculas/20 µL, correspondientes a los equivalentes genómicos por reacción, dentro de un logaritmo a partir de la amplificación del estándar Q-PCR con la concentración más alta (10⁵ moléculas/20 µL).

El límite inferior del rango de medición lineal se estableció de 10 moléculas/20 µL, correspondientes a los equivalentes genómicos por reacción, dentro de un logaritmo a partir de la amplificación del estándar Q-PCR con la concentración más baja (10² moléculas/20 µL).

Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

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

Los límites del rango de medición que se refieren al kit de extracción utilizado, expresados como gEq/mL, se calculan en la página 34.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión del ensayo, expresada como variabilidad de los resultados obtenidos con varios duplicados de una muestra probada en la misma ejecución y la concentración teórica de la muestra, han permitido obtener un coeficiente de variación (% CV) porcentual medio de un 21,0 % de las cantidades medidas, dentro del rango de 10⁶ a 10¹ moléculas, en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

La exactitud del ensayo, como diferencia entre el promedio de los resultados obtenidos con varias réplicas de una muestra probada en la misma ejecución y la concentración teórica de la muestra, han permitido obtener una inexactitud porcentual promedio (% inexact.) de un 11,1 % de las cantidades medidas, dentro del rango de 10⁶ a 10¹ moléculas, en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

La precisión y la exactitud se determinaron usando datos obtenidos para el estudio del rango de medición lineal.

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia calibrado

La sensibilidad analítica del ensayo, como reproducibilidad de los resultados comparados con los resultados obtenidos usando otros ensayos en laboratorios diferentes, se revisó probando un material de referencia calibrado.

También se realizaron otros análisis utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VEB dentro del límite de concentración («QCMD 2008 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra se analizó en duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción con **EXTRAblood** y amplificación con productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados				
Muestra	Consenso de concentración de virus para ensayos comerciales log ₁₀ gEq/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
EBV08-01	VEB, 2,394	0,473	2/2	1,937
EBV08-02	VEB, 3,177	0,476	2/2	3,185
EBV08-03	VEB, 3,443	0,400	2/2	3,021
EBV08-04	VEB, 4,159	0,391	2/2	4,089
EBV08-05	VEB, 2,707	0,504	2/2	2,408
EBV08-06	Negativo, NA	-	0/2	-
EBV08-07	VEB, 3,857	0,349	2/2	3,796
EBV08-08	VEB, 5,131	0,361	2/2	4,930
EBV08-09	VEB, 4,414	0,358	2/2	4,186
EBV08-10	VEB, 2,651	0,456	2/2	2,458

Todas las muestras se detectaron correctamente. Los resultados cuantitativos están dentro del rango definido consenso para ensayos comerciales ± 1 DE, excepto en el caso de la muestra EBV08-03.

También se realizaron otros análisis utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VEB dentro del límite de concentración («QCMD 2012 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se probó en duplicados con la ejecución del procedimiento entero de análisis, extracción con el **ELITe STAR** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados en gEq/mL se muestran en la siguiente tabla.

Tests con materiales de referencia calibrados y el ELITe STAR				
Muestra	Consenso de concentración de virus para ensayos comerciales log ₁₀ gEq/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
EBV12-01	VEB, 2,719	0,446	1/2	1,885
EBV12-02	VEB, 3,802	0,417	2/2	3,794
EBV12-03	VEB, 5,173	0,358	2/2	5,168
EBV12-04	VEB, 4,790	0,421	2/2	4,569
EBV12-05	VEB, 4,313	0,371	2/2	4,064
EBV12-06	VEB, 4,458	0,373	2/2	4,334
EBV12-07	VEB, 4,769	0,384	2/2	4,416
EBV12-08	VEB, 3,471	0,403	2/2	3,324
EBV12-09	VEB, 3,313	0,446	2/2	3,128
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas las muestras negativas se detectaron correctamente. En el análisis cuantitativo, 8/9 muestras positivas se cuantificaron correctamente dentro del rango definido mediante el consenso para ensayos comerciales ± 1 desviación estándar. Una muestra (EBV12-01) se cuantificó dentro de ± 2 DE. Este resultado puede explicarse porque el título de la muestra estaba cercano al límite de detección del método utilizado.

Los resultados en UI/ml se calcularon aplicando el factor de conversión para el **ELITe STAR** y el plasma y se indican en la siguiente tabla.

Tests con materiales de referencia calibrados y el ELITe STAR				
Muestra	Consenso de concentración de virus para ensayos comerciales log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBV12-01	VEB, 2,473	0,386	1/2	2,217
EBV12-02	VEB, 3,635	0,422	2/2	4,126
EBV12-03	VEB, 4,987	0,307	2/2	5,500
EBV12-04	VEB, 4,646	0,295	2/2	4,901
EBV12-05	VEB, 4,138	0,300	2/2	4,396
EBV12-06	VEB, 4,345	0,333	2/2	4,666
EBV12-07	VEB, 4,631	0,270	2/2	4,749
EBV12-08	VEB, 3,470	0,442	2/2	3,657
EBV12-09	VEB, 3,161	0,394	2/2	3,460
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas las muestras negativas se detectaron correctamente. En el análisis cuantitativo, 7/9 muestras positivas se cuantificaron correctamente dentro del rango definido mediante el consenso para ensayos comerciales ± 1 desviación estándar. Dos muestras (EBV12-02 y EBV12-03) se cuantificaron dentro de ± 2 DE.

También se realizaron otros análisis utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VEB dentro del límite de concentración («QCMD 2012 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se probó en duplicados con la ejecución del procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el **ELITe GALAXY** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados en gEq/mL se muestran en la siguiente tabla.

Tests con materiales de referencia calibrados y el ELITe GALAXY				
Muestra	Consenso de concentración de virus para ensayos comerciales log ₁₀ gEq/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
EBV12-01	VEB, 2,719	0,446	2/2	2,763
EBV12-02	VEB, 3,802	0,417	2/2	3,638
EBV12-03	VEB, 5,173	0,358	2/2	5,060
EBV12-04	VEB, 4,790	0,421	2/2	4,598
EBV12-05	VEB, 4,313	0,371	2/2	4,063
EBV12-06	VEB, 4,458	0,373	2/2	4,319
EBV12-07	VEB, 4,769	0,384	2/2	4,597
EBV12-08	VEB, 3,471	0,403	2/2	3,258
EBV12-09	VEB, 3,313	0,446	2/2	3,224
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas las muestras negativas se detectaron correctamente como negativas y todas las muestras positivas se detectaron como positivas de acuerdo con los resultados cuantitativos definidos mediante el consenso para ensayos comerciales.

Los resultados en UI/ml se calcularon aplicando el factor de conversión para el **ELITe GALAXY** y el plasma y se indican en la siguiente tabla.

Tests con materiales de referencia calibrados y el ELITe GALAXY				
Muestra	Consenso de concentración de virus para ensayos comerciales log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBV12-01	VEB, 2,473	0,386	2/2	2,644
EBV12-02	VEB, 3,635	0,422	2/2	3,518
EBV12-03	VEB, 4,987	0,307	2/2	4,941
EBV12-04	VEB, 4,646	0,295	2/2	4,479
EBV12-05	VEB, 4,138	0,300	2/2	3,944
EBV12-06	VEB, 4,345	0,333	2/2	4,200
EBV12-07	VEB, 4,631	0,270	2/2	4,478
EBV12-08	VEB, 3,470	0,442	2/2	3,139
EBV12-09	VEB, 3,161	0,394	2/2	3,105
EBV12-10	Negativo, NA	-	0/2	-

Todas las muestras negativas se detectaron correctamente como negativas y todas las muestras positivas se detectaron como positivas de acuerdo con los resultados cuantitativos definidos mediante el consenso para ensayos comerciales.

Sensibilidad analítica: Factor de conversión a unidades internacionales

El factor de conversión que debe utilizarse con este ensayo para convertir un resultado cuantitativo de gEq/mL en UI/mL se definió como 2.0 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de sangre y el kit de extracción manual «EXTRABlood»; como 2,2 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de sangre y el sistema de extracción automático «ELITe STAR»; como 0,8 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de sangre y el sistema de extracción automático «ELITe GALAXY»; como 1,7 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de sangre y el sistema de extracción automático «NucliSENS® easyMAG®»; como 1,8 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de sangre y el sistema de extracción automático «QIASymphony® SP/AS»; como 2,0 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de sangre y el sistema «ELITe STAR»; como 0,7 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de plasma y el sistema de extracción automático «ELITe GALAXY»; y como 2,3 UI/gEq cuando se utilizaron muestras de plasma y el sistema de extracción automático «QIASymphony® SP/AS».

EBV ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Sangre recogida en EDTA

El factor de conversión se calculó utilizando un panel de cuatro diluciones (0,5 log₁₀ entre diluciones) de material de referencia calibrado y aprobado por la OMS («Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr», código NIBSC 09/260, Reino Unido) en muestras de sangre recogida en EDTA.

Cada punto del panel se analizó en 8 duplicados llevando a cabo el procedimiento entero de análisis: extracción con el **EXTRAblood** y amplificación con productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 2,0 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de sangre.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de sangre y el «EXTRAblood» (Fc = 2,0 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
316.255	5,500	154.718	30.4034	5,48
100.000	5,000	51.264	100.737	5,00
31.625	4,500	15.602	30.660	4,49
10.000	4,000	5.438	10.686	4,03

Cada punto del panel se probó en 15 réplicas con la ejecución del análisis entero, extracción y configuración de la PCR con el **ELITe STAR** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 2,2 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de sangre.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de sangre y el «ELITe STAR» (Fc = 2,09 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
3.162	3,500	1.295	2.709	3,339
10.000	4,000	5.116	10.703	3,976
31.623	4,500	18.300	38.283	4,559
100.000	5,000	55.188	115.453	5,034
316.228	5,500	177.128	370.551	5,537

Cada punto del panel se probó en 15 réplicas con la ejecución del análisis entero, extracción y configuración de la PCR con el **ELITe GALAXY** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 0,8 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de sangre.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» (Fc = 0,89 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
3.162	3,500	3.821	3.400	3,518
10.000	4,000	13.623	12.124	4,101
31.623	4,500	32.547	28.967	4,460
100.000	5,000	120.239	107.013	5,028
316.228	5,500	281.782	250.786	5,390

Cada punto del panel se analizó en 8 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción, con el sistema de extracción automático NucliSENS® easyMAG® y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 1,7 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de sangre.

EBV ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de sangre y el «NucliSENS® easyMAG®» (Fc = 1,7 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
316.255	5,500	212.198	366.796	5,56
100.000	5,000	56.930	98.407	4,99
31.625	4,500	20.334	35.148	4,55
10.000	4,000	4.734	8.183	3,91

Cada punto del panel se analizó en 8 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción, con el sistema de extracción automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 1,8 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de sangre.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de sangre y el «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 1,8 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
316.255	5,500	203251	365852	5,563
100.000	5,000	61830	111294	5,046
31.625	4,500	18174	32713	4,515
10.000	4,000	4546	8183	3,913
3.162	3,500	1850	3330	3,522
1.000	3,000	575	1035	3,015

Plasma recogido en EDTA

El factor de conversión se calculó utilizando un panel de cuatro diluciones (0,5 log₁₀ entre diluciones) de material de referencia calibrado y aprobado por la OMS («Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr», código NIBSC 09/260, Reino Unido) en muestras de plasma recogido en EDTA.

Cada punto del panel se analizó en 15 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción con el **ELITe STAR** y amplificación con productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 2,0 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de plasma.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de plasma y el «ELITe STAR» (Fc = 2,15 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
316.255	5,500	167.105	359.275	5,537
100.000	5,000	45.185	97.147	4,961
31.625	4,500	17.428	37.470	4,555
10.000	4,000	4.536	9.753	3,993
3.162	3,500	1.435	3.084	3,454

Cada punto del panel se probó en 15 réplicas con la ejecución del análisis entero, extracción y configuración de la PCR con el **ELITe GALAXY** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 0,7 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de plasma.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» (Fc = 0,76 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
3.162	3,500	5.610	4.263	3,608
10.000	4,000	15.554	11.821	4,050
31.623	4,500	39.837	30.276	4,451
100.000	5,000	148.584	112.924	5,035
316.228	5,500	308.566	234.510	5,334

Cada punto del panel se analizó en 8 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción, con el sistema de extracción automático «QIASymphony® SP/AS» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a 2,3 unidades internacionales (UI) por gEq de VEB detectado con muestras de plasma.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de plasma y el «QIASymphony® SP/AS» (Fc = 2,3 UI/gEq)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media gEq/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
316.255	5,500	110.437	249.588	5,39
100.000	5,000	37.691	85.181	4,93
31.625	4,500	14.498	32.765	4,51
10.000	4,000	7.442	16.819	4,22

Sensibilidad diagnóstica: eficacia de detección y cuantificación con distintos genotipos/subtipos

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como eficiencia de detección y cuantificación en distintos genotipos/subtipos, se evaluó comparando secuencias con bases de datos de nucleótidos.

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de la sonda fluorescente en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para el gen EBNA-1 del VEB, mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo y sangre recogida en EDTA que dieron resultado positivo para ADN de VEB.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 21 muestras de sangre recogida en EDTA, todas positivas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real) y 21 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VEB y enriquecidas con las muestras EBV09-04, EBV09-05 y EBV09-06 a partir del panel «QCMD 2009 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de EBV	21	21	0
Líquido cefalorraquídeo enriquecido el ADN de VEB	21	21	0

Todas las muestras enriquecidas se detectaron correctamente como positivas para ADN de VEB. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 31 muestras de plasma recogido en EDTA positivas para ADN de VEB, así como 31 muestras de sangre recogida en EDTA positivas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis: extracción con el «ELITe STAR» y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recogido en EDTA y positivo para ADN de EBV	31	29	2
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de EBV	31	30	1

Tres muestras presentaron un resultado negativo con productos de ELITechGroup S.p.A. Esta diferencia se explica por el título de VEB de las muestras que, según los cálculos, estaba cercano al límite de detección del método.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 95,2 %.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 30 muestras de plasma recogido en EDTA positivas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real), así como 32 muestras de sangre recogida en EDTA positivas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el sistema ELITe GALAXY y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recogido en EDTA y positivo para ADN de EBV	30	29	1
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de EBV	32	32	0

Una muestra de plasma presentó un resultado negativo cuando se utilizaron productos de ELITechGroup S.p.A. Esta diferencia puede explicarse por una posible mala conservación de la muestra.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 98 %.

Especificidad analítica: ausencia de reactividad cruzada con marcadores potencialmente interferentes

La especificidad analítica del ensayo, en términos de ausencia de reactividad cruzada con otros potenciales marcadores interferentes, se evaluó comparando las secuencias con bases de datos de nucleótidos.

El análisis de la alineación de las secuencias de los cebadores y de la sonda fluorescente con las secuencias disponibles en las bases de datos de microorganismos diferentes del VEB, inclusive el genoma completo del VHH8, el virus del herpes humano que es más similar al VEB, demostró especificidad y ausencia de homologías reseñables.

La especificidad analítica del ensayo, expresada como ausencia de reactividad cruzada con otros potencialmente marcadores interferentes, se evaluó mediante el uso de muestras clínicas negativas para ADN de VEB y positivas para ADN de otros patógenos.

La especificidad analítica se evaluó utilizando como material de referencia 20 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VEB, pero positivas para ADN de CMV o para ADN de VHH6 (cuando se analizaron con productos de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de CMV	11	0	11
Sangre entera recogida en EDTA positiva al ADN del HHV6	9	0	9

No se detectó reactividad cruzada con muestras positivas al ADN de otros patógenos.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras negativas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VEB, así como muestras de sangre recogida en EDTA que presentaron un resultado negativo para ADN de VEB.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 29 muestras de sangre recogida en EDTA y 21 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre negativa para ADN de VEB	29	1	28
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VEB	21	0	18

Una muestra de sangre presentó un resultado positivo para ADN de VEB con un título muy bajo (aproximadamente 3 copias/reacción) en la primera sesión de análisis. La misma muestra dio un resultado negativo válido en la segunda sesión. Este resultado diferente del resto puede explicarse por el bajo título de ADN de VEB, por debajo del límite de detección del método de referencia.

Tres muestras de líquido cefalorraquídeo dieron un resultado no válido, posiblemente por la presencia de un inhibidor, y no se utilizaron para calcular la especificidad. La especificidad diagnóstica del ensayo en este tes resultó del 97,9 %.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 40 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VEB, así como 60 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el «**ELITe STAR**» y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VEB	40	0	40
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VEB	60	3	53

Cuatro muestras de sangre no eran válidas. Tres muestras de sangre presentaron un resultado positivo diferente del resto (58 gEq/mL, 107 gEq/mL y 37 gEq/mL respectivamente). Estas muestras tenían un título inferior al límite de detección del método para ADN de VEB; estas muestras pueden presentar resultados aleatorios negativos o positivos. Los resultados diferentes se pueden explicar si se tiene en cuenta que el VEB es un virus ampliamente extendido entre la población de forma latente.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 96,9 %.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VEB, así como 32 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VEB (que se analizaron con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el sistema **ELITe GALAXY** y amplificación con los productos ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VEB	30	0	30
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VEB	32	1	31

Una muestra de sangre presentó resultado positivo diferente del resto (18 gEq/mL). Esta muestra tenía un título por debajo del límite de detección del método para ADN de VEB; esta muestra puede presentar resultados aleatorios negativos o positivos. El resultado diferente se pueden explicar si se tiene en cuenta que el VEB es un virus ampliamente extendido entre la población de forma latente.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 98 %.

Nota: Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «EBV ELITe MGB® Kit», FTP RTS020PLD.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Analizador Roche cobas z 480

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

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

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre entera para la extracción del ADN deben recogerse en EDTA e identificarse de acuerdo con las prácticas del laboratorio, transportarse a +2 / +8 °C, y almacenarse a +2 / +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben ser congeladas y almacenadas a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante periodos más largos. 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: cuando la extracción de ADN se realiza a partir de muestras de sangre con el instrumento «**MagNA Pure 24 System**» con la **versión 1.0 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**Pathogen200**» y seguir estas instrucciones: distribuir **350 µL** de muestra en la probeta MagNA Pure de 2,0 mL, cargar la probeta en el instrumento y comenzar la extracción. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 20 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL. El **CPE** se debe diluir en proporción 1:2 en agua ultrapura de grado molecular para biología. Para obtener información detallada sobre el procedimiento de extracción, lea detenidamente las instrucciones del manual de uso suministrado junto con el kit.

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de los ácidos nucleicos debe recogerse en EDTA de acuerdo con las prácticas del laboratorio, transportarse a +2 / +8 °C, y almacenarse a +2 / +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben ser congeladas y almacenadas a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante periodos más largos.

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: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el instrumento «**MagNA Pure 24 System**» y la **versión 1.0 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**Pathogen200**» y seguir las siguientes indicaciones: distribuir **350 µL** de muestra en la probeta MagNA Pure Tube de 2,0 mL, cargar la probeta en el instrumento y comenzar la extracción. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 20 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL. El **CPE** se debe diluir en proporción 1:2 en agua ultrapura de grado molecular para biología. Para obtener información detallada sobre el procedimiento de extracción, lea detenidamente las instrucciones del manual de uso suministrado junto con el kit.

Sustancias interferentes

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

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

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

Controles de amplificación

Cada sesión de amplificación debe validarse necesariamente con una reacción de control negativo y una de control positivo.

Para el control negativo, añadir agua ultrapura de grado molecular para biología (no incluida con el producto), a la reacción en lugar del ADN extraído de la muestra.

Para el control positivo, utilizar el producto «**EBV - ELITe Positive Control**» o, de manera alternativa, el producto «**EBV - ELITe Positive Control RF**» o el producto «**EBV ELITe Standard**».

Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis de cada ejecución de extracción y amplificación, probando los controles del proceso, como por ejemplo una muestra que haya resultado negativa y una que haya resultado positiva o un material de referencia calibrado.

PROCEDIMIENTO

Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

Debe realizarse en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación.

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

- encender el ordenador de control y el termociclador en tiempo real. Abrir el software específico y, en la ventana principal, abrir una sesión «New Experiment».
- configurar el volumen de reacción («Reaction volume») en 40 µl;
- asignar un identificador para cada muestra («Sample editor»);
- configurar el ciclo térmico de la reacción conforme a la siguiente tabla:

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

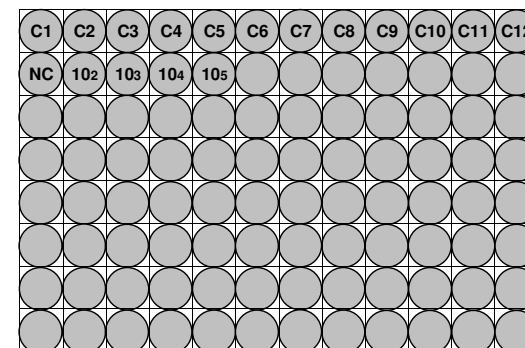
Nota: la adquisición de fluorescencia se produce de forma individual; configurar la velocidad de aumento (°C/s) en 4,4 °C/s.

- seleccionar los canales de detección de la señal: «detector» para la sonda de VEB el «channel FAM 465-510» y «detector» para la sonda del control interno IC con «channel VIC 540-580»;

Rellenar la **Hoja de trabajo** adjunta al final de este manual de uso, transcribiendo esta información o estampando el diseño de la microplaca. Esta **hoja de trabajo** debe seguirse atentamente durante la transferencia de la mezcla de reacción y las muestras a los pocillos.

Nota: para determinar la concentración del ADN en la muestra origen, se deben llevar a cabo una serie de reacciones con el **estándar Q-PCR** (10⁵ gEq, 10⁴ gEq, 10³ gEq, 10² gEq) para obtener la **curva estándar**.

A continuación, encontrará un ejemplo de cómo organizar el análisis cuantitativo de 12 muestras.



Leyenda: C1 - C12: Muestras que van a analizarse; NC: Control negativo de amplificación; 10²: Estándar 10² gEq; 10³: Estándar 10³ gEq; 10⁴: Estándar 10⁴ gEq; 10⁵: Estándar 10⁵ gEq.

Configuración de la amplificación

Debe realizarse en la extracción/preparación del área de reacción de amplificación.

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

- Recuperar y descongelar las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar las probetas que contienen la mezcla «EBV Q - PCR Mix» que se necesita para la sesión, recordando que cada una de ellas es suficiente para realizar **25 reacciones**. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar la muestra que contiene el **control positivo de VEB** o, de manera alternativa, el producto «EBV - ELITe Positive Control RF» o las probetas que contienen el **estándar Q-PCR de VEB**. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Tomar la **placa AD** que se va a usar en la ejecución, asegurándose de llevar puestos los guantes sin talco al manipularla y no dañar los pocillos.

1. Sin que se formen burbujas y colocándola con precisión en el fondo, verter **20 µL** de la mezcla de reacción «EBV Q - PCR Mix» en los pocillos de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**.

Nota: Si no se utiliza toda la mezcla de reacción, conservar la parte sobrante a -20 °C durante un máximo de un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacción un máximo de **5 veces**.

2. Colocándola con precisión en la mezcla de reacción, verter **20 µL** de **ADN extraído** de la primera muestra en el pocillo correspondiente de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** tres veces en la mezcla de reacción. Asegurarse de que no se formen burbujas. Proceder de la misma manera con el resto del **ADN extraído**.

3. Colocándola con precisión en la mezcla de reacción, verter **20 µL** de **agua ultrapura de calidad para biología molecular** (no incluida en el volumen de suministro del producto) en el pocillo de la **placa AD** que contiene el control de amplificación negativo, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando el **agua ultrapura de calidad para biología molecular** tres veces en la mezcla de reacción. Asegurarse de que no se formen burbujas.

4. Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:
 - Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de VEB), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «EBV - ELITe Positive Control» o, de manera alternativa, «EBV - ELITe Positive Control RF» en el pocillo correspondiente de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando el producto «EBV - ELITe Positive Control» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

EBV ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

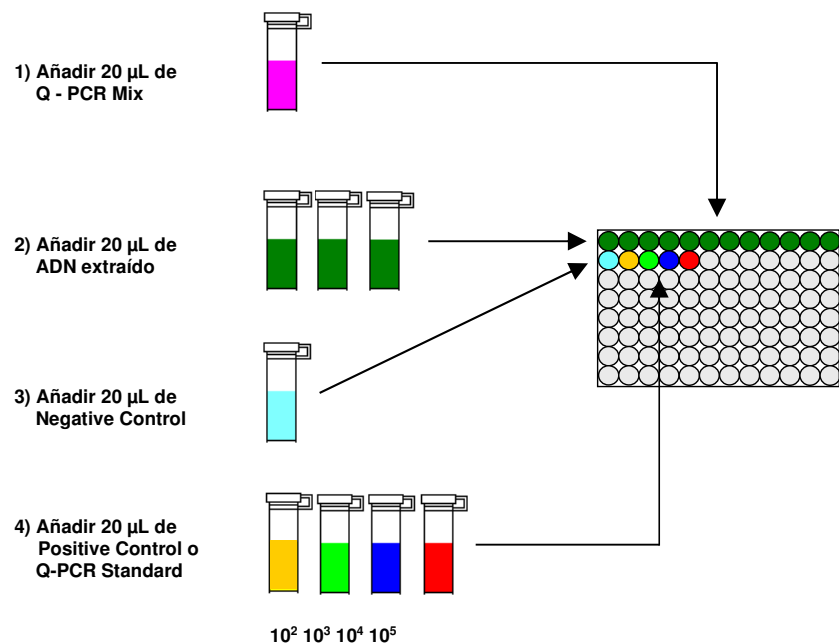
REF RTS020PLD

- Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación dl ADN de VEB), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «**EBV Q - PCR Standard 102**» en el pocillo correspondiente de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el estándar pipeteando el **estándar Q-PCR de VEB** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma manera con los demás **estándares Q-PCR (103, 104, 105)**.

- Sellar cuidadosamente la **placa AD** con **película selladora**.
- Transferir la **placa AD** al termociclador en tiempo real en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación y comenzar el ciclo térmico de la amplificación guardando la configuración de la sesión con un nombre de archivo único y reconocible (por ejemplo «año-mes-día-VEB-EGSpA»).

Nota: Al final del ciclo térmico, la **placa AD** y los productos de la reacción se deben retirar del equipo y eliminarse de manera tal que no se produzca contaminación ambiental. Para evitar que se produzcan fugas de los productos de reacción, **no retirar la película de sellado de la microplaca de amplificación**.

La siguiente figura muestra de forma sintética la preparación de la reacción de amplificación.



Análisis de los resultados cualitativos

Los valores de fluorescencia emitidos registrados por el detector de VEB y el detector del control interno (IC) durante las reacciones de amplificación deben analizarse con el software del instrumento.

Seleccionar el menú «Analysis» y seleccionar «Absolute Quant/Fit Points» (2 puntos).

Seleccionar el grupo de muestras que se quiere analizar.

De acuerdo con la documentación del equipo, antes de dar inicio al análisis es necesario:

- Introducir manualmente el rango de cálculo (botón Background) para el **Nivel de fluorescencia de fondo** del ciclo 2 al ciclo 6.

EBV ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Para muestras de **plasma**:

- Configurar manualmente los campos **Threshold** y **Noiseband** para el detector FAM «EBV» en **0.55**.
- Configurar manualmente los campos «**Threshold**» y **Noiseband** para el detector VIC «IC» en **1.2**.

Para muestras de **sangre**:

- Configurar manualmente los campos **Threshold** y **Noiseband** para el detector FAM «EBV» en **0.80**.
- Configurar manualmente los campos «**Threshold**» y **Noiseband** para el detector VIC «IC» en **1.5**.

Los valores de fluorescencia emitidos por los detectores específicos en la reacción de amplificación, así como los valores de fluorescencia **Threshold** y **Noiseband**, sirven para determinar el **ciclo de umbral (Ct)** es decir, el ciclo en el que se alcanza el **umbral** de fluorescencia.

En la reacción de amplificación del **Positive Control***, el valor **Ct** del VEB («Results > Report») se utiliza para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la siguiente tabla:

Positive Control de reacción detector «EBV»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del Positive Control es **Ct >25** o **Ct Undetermined** para el VEB, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante los pasos de amplificación o detección (dosificación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

* **Nota:** Cuando este producto se utiliza para la cuantificación de ADN de VEB, las reacciones del **estándar Q-PCR** se han configurado en lugar de la reacción del Positive Control. En este caso, es preciso validar la amplificación y la detección haciendo referencia a la reacción de amplificación del **estándar Q - PCR 105 (Ct ≤ 25)**.

Durante la reacción de amplificación del **Negative Control**, el valor de **Ct** para el VEB (ventana «Analysis») se utiliza para validar la amplificación y la detección, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Reacción del Negative Control Detector «EBV»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct no determinado	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Negative Control** es diferente de **Ct Undetermined** para el VEB, significa que se ha detectado la presencia de ADN diana. Se han producido problemas durante la fase de amplificación (contaminación) lo que puede conllevar resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir de la fase de amplificación.

Durante las reacciones de amplificación para cada **muestra**, el valor de **Ct** para el VEB se utiliza para detectar la presencia de ADN diana, mientras que el valor de **Ct** para el control interno se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

Nota: Comprobar con el software del equipo (ventana Analysis) que el **Ct** se haya determinado mediante un aumento rápido y regular de los valores de fluorescencia y no mediante picos o un aumento de la señal de fondo (fondo irregular o alto).

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados como el **Ct** de cada una de las reacciones de amplificación de la **muestra** (ventana «Analysis») se usan tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ADN de VEB
Detector «EBV»	Detector «IC»			
Ct no determinado	Ct > 35 o Ct no determinado	no apta	no válido	-
	Ct ≤ 35	idónea	Válido, negativo	NO DETECTADO
Ct determinado	Ct > 35 o Ct no determinado	idónea	válida, positiva	DETECTADO
	Ct ≤ 35	idónea	válida, positiva	DETECTADO

Si el resultado de la reacción de amplificación de la muestra es **Ct Undetermined** para el VEB y **Ct > 35** o **Ct Undetermined** para el control interno, significa decir que no ha sido posible detectar el ADN del control interno de forma eficiente. En este caso, se han presentado problemas durante la fase de amplificación (amplificación no eficiente o nula) o durante el paso de extracción (degradación del ADN de la muestra, muestra con un número no suficiente de células, pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el ADN extraído), lo que puede conllevar resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra es no idónea, el ensayo es no válido y deberá repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VEB y **Ct ≤ 35** para el control interno, significa que el ADN de VEB no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VEB esté presente en una concentración inferior frente al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento»). En este caso el resultado podría ser un falso negativo.

Los resultados obtenidos con este ensayo se deben interpretar considerando todos los datos clínicos y demás resultados de las pruebas de laboratorio que conciernen al paciente.

Nota: Si se detecta el ADN de VEB durante la reacción de amplificación de una muestra, la amplificación del control interno puede producir un resultado de Ct > 35 o «Ct Undetermined». De hecho, la reacción de amplificación del control interno de baja eficiencia puede eliminarse a partir de la competencia con la reacción del VEB de alta eficiencia. En este caso, la muestra será de todas maneras idónea y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis de los resultados cuantitativos

Después de llevar a cabo el procedimiento de análisis cualitativo, es posible realizar en análisis cuantitativo de los resultados relacionados con la muestra positiva.

Si el resultado de la reacción de amplificación para el **Q - PCR Standard 10⁵** es **Ct > 25** o **Ct Undetermined**, o si los valores Ct de los cuatro estándares Q-PCR no se ajusta con regularidad a la curva estándar, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Se han producido problemas durante la fase de amplificación o detección (distribución incorrecta de los estándares o de la mezcla de reacción, degradación de los estándares o de la mezcla de reacción, configuración incorrecta de las posiciones estándar, configuración incorrecta del ciclo térmico) lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir de la fase de amplificación.

Los valores **Ct** para el VEB en las reacciones de amplificación de cada **muestra** y la **curva estándar** (botón «Standard Curve») de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ADN diana presente en las reacciones de amplificación relacionadas con las muestras.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Este producto permite cuantificar de 1.000.000 a 10 copias por reacción, de 25.000.000 a 250 copias por mL de sangre con el sistema de extracción «**MagNA Pure 24**» (consultar el apartado «Características de rendimiento»), tal como se muestra en la siguiente tabla:

Resultado de la muestra Detector FAM «VEB»	Copias de VEB por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1.0 × 10 ¹ ≤ cantidad ≤ 1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad >1,0 × 10 ¹	MENOS DE 10

Los resultados (**cantidad**) relacionados con cada **muestra** (ventana «Analysis») se utilizan para calcular las copias de VEB presentes en la muestra origen (**Nc**) según la siguiente fórmula:

$$Nc = \frac{Ve \times \text{Cantidad}}{Vc \times Va \times Ep}$$

Donde:

Vc es la cantidad de la muestra utilizada en la extracción con respecto a la unidad de medida necesaria.

Ep es la eficiencia del procedimiento, extracción y amplificación, **expresada en decimales**.

Ve es el volumen total obtenido de la extracción, **expresado en µL**.

Va es el volumen del producto de extracción utilizado en la reacción de amplificación, **expresado en µL**.

Cantidad es el resultado de la reacción de amplificación relacionado con la muestra **expresada en copias por reacción**.

Al usar muestras de sangre entera y plasma recogidas en EDTA y de orina junto con el sistema de extracción **MagNA Pure 24** y el resultado se debe **expresar en copias/mL**, la fórmula es:

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección

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

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección, se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a una concentración de 10 copias/20 µL en 150.000 copias de globina beta/20 µL. Esta muestra se utilizó en 18 duplicados realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias de ADN plasmídico + 150.000 copias de pBETAGLOBINA	18	18	0

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de sangre y plasma y el **MagNA Pure 24** se evaluó con un panel de diluciones de VEB dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de VEB. El panel comprendió seis puntos en torno a la concentración límite. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando la extracción con el sistema automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las siguientes tablas.

Límite de detección con el MagNA Pure 24 (UI/mL)			
Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Sangre	143 UI/mL	87 UI/mL	413 UI/mL
Plasma	163 UI/mL	82 UI/mL	1137 UI/mL

La sensibilidad analítica expresada en copias/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 51.

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

Límite de detección con el MagNA Pure 24 (copias/mL)			
Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Sangre	102 copias/mL	62 copias/mL	295 copias/mL
Plasma	125 copias/mL	63 copias/mL	875 copias/mL

Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

La sensibilidad analítica de este ensayo, expresada como rango de medición lineal, permite cuantificar de unas 1.000.000 a 10 copias en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La sensibilidad analítica de este ensayo se evaluó utilizando un panel de diluciones (1 log₁₀ entre una dilución y la siguiente) de ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación, con una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. Los puntos del panel de 10⁷ moléculas por reacción a 10¹ moléculas por reacción se utilizaron en 9 duplicados para realizar la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal para todos los puntos del panel (coeficiente de correlación lineal superior a 0,99).

El límite inferior del rango de medición lineal se estableció en 10 copias/reacción dentro de un logaritmo a partir de la concentración más baja del estándar de amplificación Q-PCR (10² copias/20 µL).

El límite superior del rango de medición lineal se estableció en 10⁶ copias/reacción dentro de un logaritmo a partir de la concentración más alta del estándar de amplificación Q-PCR (10⁵ copias/20 µL).

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Rango de medición lineal utilizando el MagNA Pure 24		
	Límite inferior	Límite superior
copias/ml	250	25.000.000
copias/reacción	10	1.000.000

Las conversiones de copias/ml a copias/reacción y viceversa se calcularon tal y como se muestra en la página 51.

La linealidad de este ensayo utilizado en asociación con diferentes matrices y el «MagNA Pure 24» se evaluó con un panel de diluciones de VEB. El panel se preparó diluyendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido) en una matriz negativa para ADN de VEB. El panel constaba de cinco puntos de dilución (1 log₁₀ de pasos de dilución) de 10⁶ UI/mL a 10² UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en cuatro duplicados realizando la extracción con el sistema automático MagNA Pure 24 y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo muestra una respuesta lineal para todas las diluciones por encima del LoD.

Límite de cuantificación

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

El rango de medición lineal expresado en copias/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la página 51.

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

Rango de medición lineal para muestras de sangre y el MagNA Pure 24		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	178	1.000.000
copias/ml	127	714.286

Rango de medición lineal para muestras de plasma y el MagNA Pure 24		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	178	1.000.000
copias/ml	137	769.231

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión de este ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando diferentes duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual (%VC) medio máximo de los valores de Ct inferior al 2 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La precisión de este ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual medio (%VC) de las cantidades medidas de alrededor del 11 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La exactitud de este ensayo, en términos de la diferencia entre la media de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra y el valor de concentración teórico de la muestra, permitió obtener un porcentaje de inexactitud media de la cantidad logarítmica medida de alrededor del 1,1 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La precisión y la exactitud se determinaron utilizando los datos obtenidos durante los experimentos evaluando el rango de medición lineal.

Reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, expresada como reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «EBV Molecular “Q” Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando la extracción con el sistema automático MagNA Pure 24 y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el sistema MagNA Pure 24 y el plasma y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el MagNA Pure 24				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log ₁₀ IU/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBVMQP01-High	36.577	4,560	2/2	4,586
EBVMQP01-Medium	3.657	3,560	2/2	3,553
EBVMQP01-Low	365	2,560	2/2	2,664
EBVMQP01-Negative	negativas	-	0/2	-

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

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

Se realizaron análisis adicionales utilizando como material de referencia el panel calibrado «AcroMetrix EBV Plasma Panel» (Life Technologies). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando la extracción con el sistema automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el sistema **MagNA Pure 24** y el plasma y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el MagNA Pure 24				
Muestra	Título nominal UI/mL	Título nominal log ₁₀ IU/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
Acrometrix EBV 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	5,987
Acrometrix EBV 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,152
Acrometrix EBV 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	4,208
Acrometrix EBV 1E3	10 ³	3,000	2/2	3,147
Acrometrix EBV 1E2	10 ²	2,000	2/2	2,246

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

Se realizaron más análisis utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2017 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Escocia, Reino Unido), un panel de diluciones de VEB. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando la extracción con el sistema automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el sistema **MagNA Pure 24** y el plasma y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el MagNA Pure 24			
Muestra	Consenso conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
EBVDNA17S-01	3,885	2/2	3,884
EBVDNA17S-02	3,906	2/2	3,742
EBVDNA17S-03	2,903	2/2	2,928
EBVDNA17S-04	2,952	2/2	2,819
EBVDNA17S-05	2,181	2/2	1,817
EBVDNA17S-06	3,215	2/2	3,188
EBVDNA17S-07	3,899	2/2	3,974
EBVDNA17S-08	2,315	2/2	1,908
EBVDNA17S-09	-	0/2	-
EBVDNA17S-10	2,333	2/2	2,184

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

Factor de conversión a unidades internacionales

El factor de conversión que debe utilizarse con este ensayo para transformar el resultado cuantitativo de copias/mL en unidades internacionales/mL se determinó utilizando un panel de material de referencia calibrado aprobado por la OMS, a saber, el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/162, Reino Unido) en las diferentes matrices negativas del ADN de VEB, y utilizando además el «**MagNA Pure 24**». El panel tenía 6 pasos de dilución de 1 log. Cada punto del panel se analizó en 16 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción, con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a **1,4** unidades internacionales (UI) por copias de VEB detectado con muestras de **sangre**.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de sangre y el «MagNA Pure 24» (Fc = 1.4 UI/copias)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media copias/ml	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
111.055	5,046	81.828	119.952	5,074
34.903	4,543	26.663	38.395	4,575
10.970	4,040	7.705	11.095	4,033
3.448	3,538	2.275	3.276	3,503
1.084	3,035	711	1.024	2,994
341	2,532	275	395	2,572

El análisis de los datos obtenidos permitió calcular un factor de conversión (Fc) medio igual a **1,3** unidades internacionales (UI) por copia de VEB detectado con muestras de **plasma**.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con muestras de plasma y el «MagNA Pure 24» (Fc = 1.3 UI/copia)				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media copias/ml	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
111.055	5,046	77.250	101.313	4,993
34.903	4,543	26.743	34.766	4,523
10.970	4,040	8.462	11.000	4,028
3.448	3,538	2.616	3.401	3,519
1.084	3,035	687	893	2,937
341	2,532	255	332	2,486

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 34 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VEB, que se enriquecieron con ADN de VEB añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido), así como 30 muestras de plasma recogidas en EDTA y negativas para ADN de VEB, que se enriquecieron con ADN de VEB añadiendo el «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos del virus de Epstein-Barr» (código NIBSC 09/260, Reino Unido).

Cada muestra se utilizó realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VEB	34	34	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VEB	30	30	0

Todas las muestras fueron válidas en el primer análisis.

Todas las muestras de sangre y plasma se confirmaron positivas para ADN de VEB. La sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de sangre y plasma fue del 100 %.

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 34 muestras de sangre recogida en EDTA supuestamente negativas para ADN de VEB, así como 31 muestras de plasma recogido en EDTA supuestamente negativas para ADN de VEB.

Cada muestra se utilizó realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA y supuestamente negativa para ADN de EBV	34	0	34
Plasma recogido en EDTA y supuestamente negativo para ADN de EBV	31	1	30

Todas las muestras de sangre fueron válidas en el primer análisis y se confirmaron como negativas para ADN de VEB.

La especificidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de sangre fue del 100 %.

Todas las muestras de plasma fueron válidas en el primer análisis. 30 de 31 muestras de plasma se confirmaron como negativas para ADN de VEB, mientras que una muestra presentó un resultado positivo, diferente del resto.

La especificidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de plasma fue del 96,8 %.

La especificidad diagnóstica total del ensayo fue del 98,5 %.

Nota: Los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «EBV ELITe MGB® Kit», FTP RTS020PLD.

BIBLIOGRAFÍA

S. W. Aberle et al. (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con ADN extraído de las siguientes muestras humanas: sangre recogida en EDTA, plasma recogido en EDTA y líquido cefalorraquídeo.

No utilizar con este producto ADN extraído de muestras que contengan heparina: la heparina inhibe la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos y da lugar a resultados no válidos.

No utilizar con este producto ADN extraído que esté contaminado con hemoglobina, dextrano o Ficoll®, pues estas sustancias inhiben la reacción de amplificación de ácidos nucleicos y pueden dar lugar a resultados no válidos.

No utilizar con este producto ADN extraído que contenga altas cantidades de ADN genómico humano que pueda inhibir la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos.

No se dispone de datos sobre las prestaciones del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: suspensiones de leucocitos y suspensiones de linfomonocitos.

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

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

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de amplificación en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación cruzada con las muestras positivas para VEB, los controles positivos y los propios productos de amplificación. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar la contaminación cruzada. Sin embargo, las contaminaciones cruzadas solo pueden evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

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

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

Con el fin de evitar resultados incorrectos, este producto debe ser manipulado por personal debidamente formado y cualificado en técnicas de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, es necesario disponer de áreas independientes para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos especiales para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la 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 para evaluar dichas diferencias antes de pasar a una nueva tecnología.

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

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden resultar no válidos debido a un error en el control interno, por lo que pueden requerir un nuevo análisis y dar lugar a retrasos en la obtención de los resultados finales.

Los posibles polimorfismos en la región del genoma viral cubierta por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección de ADN de VEB.

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

Como para cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, existe un riesgo residual de que obtener con él resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos. Este riesgo residual no se puede eliminar ni reducir aún más. En determinadas situaciones, como en diagnósticos de emergencia, el riesgo residual puede contribuir a tomar decisiones incorrectas con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ADN diana no detectado en las reacciones de Positive Control o del estándar Q-PCR o coeficiente de correlación no válido de la curva estándar

Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Distribuir con cuidado las reacciones en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo. Comprobar los volúmenes de la mezcla de reacción distribuida. Comprobar el volumen del control positivo o el del estándar distribuido.
Configuración incorrecta de la sesión en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius.	Comprobar la posición de la mezcla de reacción, control positivo o estándares. Comprobar los volúmenes de la mezcla de reacción, control positivo o estándares.
Degradación de la sonda.	Utilizar una nueva alícuota de mezcla de reacción.
Degradación del control positivo o del estándar.	Usar una nueva porción de control positivo o de estándar.
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la configuración de la posición del control positivo o las reacciones del estándar en el instrumento. Comprobar la configuración del ciclo térmico en el instrumento.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

ADN diana detectado en la reacción del Negative Control

Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra. Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra. Prestar atención al distribuir las muestras, los controles negativos, los controles positivos y los estándares en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.
Configuración incorrecta de la sesión en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius.	Comprobar la posición de la mezcla de reacción o la del control negativo. Comprobar el volumen de la mezcla de reacción o el del control negativo.

Posibles causas	Soluciones
Error al configurar el equipo	Revisar las configuraciones de la posición de las muestras, los controles negativos, los controles positivos y los estándares en el equipo.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Proceder con cuidado al sellar la microplaca.
Contaminación del agua de calidad para biología molecular	Usar una nueva porción de agua.
Contaminación de la mezcla de reacción.	Utilizar una nueva alícuota de mezcla de reacción.
Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación.	Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

ADN diana y del control interno no detectado en las reacciones de la muestra

Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra. Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra. Distribuir con cuidado las muestras en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.
Configuración incorrecta de la sesión en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius.	Comprobar la posición de la mezcla de reacción o la de las muestras. Revisar los volúmenes de la mezcla de reacción o de las muestras.
Degradación del control interno.	Utilizar nuevas alícuotas del control interno.
Inhibición debido a sustancias interferentes con las muestras.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua de calidad para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only». Repetir la extracción y la amplificación de la muestra.
Almacenamiento incorrecto de los reactivos.	Asegurarse de que la mezcla de reacción no se haya expuesto a temperatura ambiente durante más de 30 minutos.
Problemas durante la extracción.	Verificar la calidad y la concentración del ADN extraído.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.












Niveles irregulares o altos de fluorescencia de fondo en las reacciones

Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta de la muestra.	Mezclar con cuidado las muestras, los controles negativos y los controles positivos o los estándares en la mezcla de reacción, pipeteando tres veces. Evitar la formación de burbujas.
Error de configuración del punto de referencia.	Configurar el rango de cálculo del punto de referencia entre los ciclos en los que la fluorescencia de fondo ya se ha estabilizado (comprobar los datos de «Results» o «Component») y la fluorescencia de la señal no ha empezado aún a aumentar, p. ej., del ciclo 9 al ciclo 15. Utilizar el cálculo automático del punto de referencia configurando la opción «Auto Baseline».

Curva de disociación anómala	
Posibles causas	Soluciones
Ausencia de un pico definido. Pico definido, pero diferente del de otras muestras y del de los estándares o del control positivo.	Verificar que el Ct del detector FAM esté por debajo de 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 del ADN diana con una posible mutación. El ADN diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación.

Error 30103 en el ELITe InGenius	
Posibles causas	Soluciones
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra.	Si se observa una amplificación notable en el gráfico de PCR: - Repetir la amplificación con una dilución de 1:10 en agua de calidad para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» o - Repetir la extracción con una dilución de 1:10 en agua de calidad para biología molecular de la muestra extraída en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

SÍMBOLOS

-  Número de catálogo
-  Límite superior de temperatura
-  Código de lote
-  Fecha de caducidad (último día del mes)
-  Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
-  Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.
-  Contenido suficiente para «N» análisis.
-  Atención: Consúltense las instrucciones de uso.
-  Contenido
-  Manténgase fuera de la luz del sol
-  Fabricante

EBV ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS020PLD

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

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

Los reactivos de detección ELITe® MGB están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 así como por patentes europeas, 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 y por solicitudes de patentes actualmente pendientes.

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

ELITe MGB® y el logotipo de ELITe MGB® son marcas registradas en la Unión Europea.

ELITe InGenius® y ELITe BeGenius® son marcas registradas de ELITechGroup.

«NucliSENS® easyMAG®» es una marca registrada de bioMérieux SA.

«QIAasymphony®» es una marca comercial registrada de QIAGEN GmbH.

Ficoll® es una marca comercial registrada de GE Healthcare Bio-Sciences AB.

EBV ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius** and **ELITE BeGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius instrument: INT030 › ELITE BeGenius instrument: INT040 › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS › CPE - Internal Control: CTCRPE | <ul style="list-style-type: none"> › EBV ELITE Standard : STD020PLD › EBV - ELITE Positive Control : CTR020PLD › ELITE InGenius Waste Box : F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen : TF-350-L-R-S › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118 |
|---|---|

F. Protocol

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › Sample volume 200 µL › CPE Internal Control volume 10 µL › Total eluate volume 100 µL › PCR eluate input volume 20 µL › EBV Q-PCR Mix volume 20 µL | <ul style="list-style-type: none"> › Unit of quantitative result cp/mL or IU/mL › Frequency of controls 15 days › Frequency of calibration 60 days |
|--|---|

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	104 IU/mL – 36 cp/mL	100% 30/30*	90.6% 29/32*
Plasma (200 µL)	124 IU/mL – 65 cp/mL	100% 47/47*	98.4% 60/61*

*confirmed samples/ tested samples

Matrix	Linearity (copies/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion factor cp/mL to IU/mL
Whole Blood	36 - 344,828	104 – 1,000,001	2.9
Plasma (200 µL)	65 - 526,316	124– 1,000,000-	1.9

H. Reference material tested with ELITE InGenius

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
EBV Molecular Q Panel	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
AcroMatrix EBV Plasma Panel	Life Technologies	Concordance 100% (5/5)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2014 Epstein-Barr Virus DNA EQA Panel	Qnostics	Concordance 100% (8/8)*	Titre as expected value ± 1 log 1 sample Titer as expected value ± 2 log

*confirmed samples/ tested samples

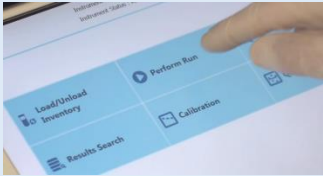
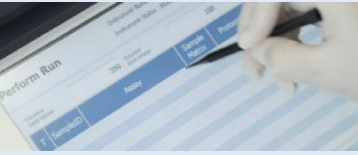



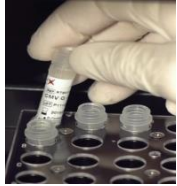

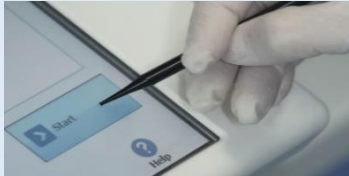

I. Procedures ELITE InGenius

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", elute: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p>	<p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p>
<p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position : Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>



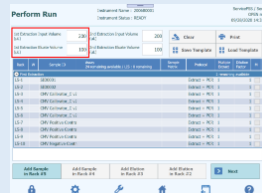
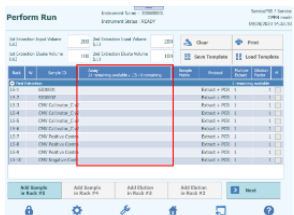
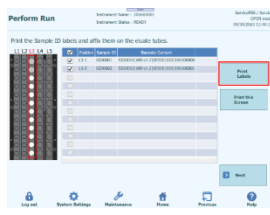


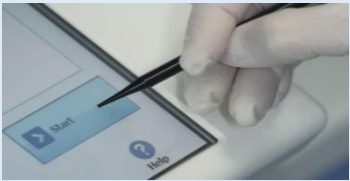

L. Procedures ELITE BeGenius

The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes
Vortex gently
Spin down 5 sec

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»

2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active

3. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Eluate: "100 µL"

4. Select the "Assay protocol" of interest

5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area

6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area

7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack

8. Close the door. Start the run

9. View, approve and store the results


Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»
2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area
3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area
Load filter tips and the PCR rack
5. Close the door.
Start the run
6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.	6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

EBV ELITE MGB® kit used with ELITE InGenius®

Code: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**. The assay is CE-IVD validated in combination with the instrument **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› **Whole blood** EDTA

› **Plasma** EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius instrument:** INT030
- › **ELITE InGenius SP1000** Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridges: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumables for extraction: INT032CS
- › **EBV ELITE Standard :** STD020PLD
- › **EBV ELITE Positive Control:** CTR020PLD
- › **CPE Internal Control:** CTCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **Filter Tips 300:** TF-350-L-R-S

F. ELITE InGenius protocol

- | | | | |
|-------------------------------|---------|-------------------------------|---------------------------|
| › Sample volume | 1000 µL | › Unit of quantitative result | International Unit: IU/mL |
| › CPE Internal Control volume | 10 µL | › Frequency of controls | 15 days |
| › Total eluate volume | 100 µL | › Frequency of calibration | 60 days |
| › PCR eluate input volume | 20 µL | | |
| › EBV Q-PCR Mix volume | 20 µL | | |

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Plasma (1000 µL)	18 IU/mL – 11 cp/mL	96.7% 29/30*	96.8% 60/62 <small>*confirmed samples/ tested samples</small>
Matrix	Linearity (copies/mL)	Linearity (IU/mL)	Conversion factor cp/mL to IU/mL
Plasma (1000 µL)	62 - 625,000	99 - 1,000,000	1.6

H. Reference material tested

Panel name	Provider	Qualitative results	Quantitative results
EBV Molecular Q Panel	Qnostics	Concordance 100% (4/4)*	Titre as expected value ± 0.5 log
QCMD 2015 Epstein-Barr virus DNA EQA Panel	Qnostics	Concordance 100% (10/10)*	Titre as expected value ± 1 log

*confirmed samples/ tested samples

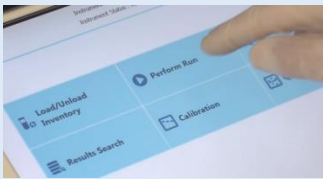
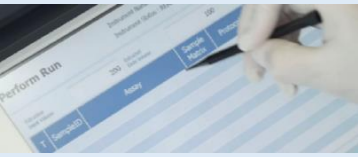

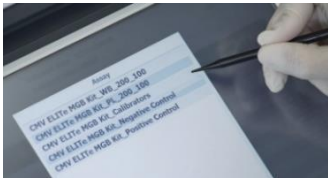

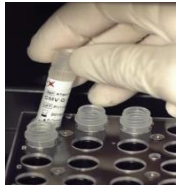



I. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: EBV Q-PCR standard in the "Calibration menu" Verify controls: EBV pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the EBV Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select "Perform Run" on the touch screen</p> 	<p>2. Verify the extraction volumes: Input: "1000 µL", eluate: "100 µL"</p> 	<p>3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID</p> 
<p>4. Select the "Assay protocol" of interest</p> 	<p>5. Select the sample position: Primary tube or sonication tube</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in the inventory block</p> 
<p>7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip, sonication tube and primary sample racks</p> 	<p>8. Close the door Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"</p>	<p>6. Load the extracted nucleic acid tubes in the rack n°4</p>
<p>7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. View, approve and store the results</p>

Procedure 3 - Extraction only

<p>1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above</p>	<p>5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Primary tube or Secondary tube</p>	<p>6. Load the CPE Internal Control in the inventory block</p>
<p>7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, sonication tube and primary sample racks</p>	<p>8. Close the door Start the run</p>	<p>9. Archive the eluate sample</p>

EBV ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Code: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection and quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525 (VIC)

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL



X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 100
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITE STAR: INT010
- › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX
- › ELITE GALAXY: INT020
- › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX

- › EBV ELITE Positive Control: CTR020PLD
- › EBV ELITE Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole Blood	212 IU/mL – 101 gEq/mL	93.5% (30/31)*	95% (53/60)*
	Plasma	229 IU/mL – 107 IU/mL-	97% (29/30)*	100% (40/40)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole Blood	99 IU/mL – 111 gEq/mL	100% (32/32)*	98.9% (31/32)*
	Plasma	97 IU/mL – 128 gEq/mL	96.67% (29/30)*	100% (30/30)*

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

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITE Star	Whole Blood, Plasma	200 µL	700 µL	100 µL	200µL
ELITE Galaxy	Whole Blood, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	Whole Blood, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	Whole Blood, Plasma	500 µL	600 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

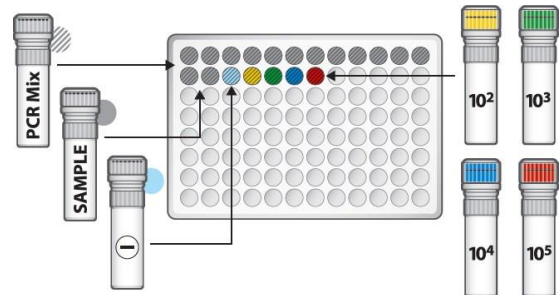
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profil as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
	45 cycles	72°C

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw EBV Q-PCR-Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, 20 µL of the Positive Control, if qualitative. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis

Instrument	EBV FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

EBV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The EBV ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶gEq/reaction.

EBV ELITE MGB® kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Code: RTS020PLD



This document is a simplified version of the official instruction for use. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

The EBV ELITE MGB® Kit is a Real-Time PCR assay for the **detection** and **quantification** of the DNA of **Epstein-Barr human herpesvirus**.

The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
EBV	EBNA-1	FAM (465 – 510)
Internal Control	Human beta globin gene	VIC (540 - 580)

C. Validated matrix

- › Whole Blood
- › Plasma EDTA

D. Kit content

EBV Q-PCR Mix
4 tubes of 540 µL X 4

- › Ready to use complete mixture
- › Number of tests per kit: 96
- › Freeze-thaw cycles per tube: 5
- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System = software 1.0
- › EBV - ELITE Positive Control: CTR020PLD
EBV – ELITE Positive Control RF: CTR020PLD-R
- › EBV ELITE Standard: STD020PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole Blood	143 IU/mL - 10 cp/rxn	100% (34/34)*	100% (34/34)*
	Plasma	163 IU/mL - 10 cp/rxn	100% (30/30)*	96.8% (30/31)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	Whole Blood, Plasma	200 μ L	350 μ L	100 μ L	20 μ L diluted 1:2

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

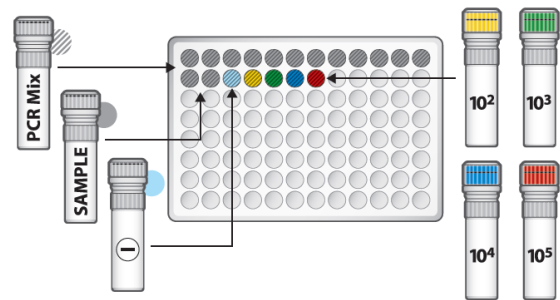
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "EBV" detector with "FAM (465 -510)".
3. Set "Internal Control" detector with "VIC (540 -580)".
4. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw EBV - Q PCR-Mix and Q-PCR standard tubes or the Positive Control tube
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 μ L of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 μ L of extracted DNA in sample wells, 20 μ L of molecular grade water in Negative Control well, and 20 μ L of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells, if quantitative, 20 μ L of the Positive Control, if qualitative. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification - Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background Fluorescence Level FAM	EBV FAM	Background Fluorescence Level VIC	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Whole Blood	from cycle 2 to cycle 6	0.80	from cycle 6 to cycle 10	1.5
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	from cycle 2 to cycle 6	0.55	from cycle 6 to cycle 10	1.2

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

EBV Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct \leq 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The EBV Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 250 to 2.5 10⁷ copies/mL.

