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 04/04/2025

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«EBV ELITe MGB® Kit»
Ref. RTS020PLD

The EBV ELITe Standard (Ref. STD020PLD) and EBV - ELITe Positive Control (Ref. CTR020PLD) product batches still placed on the market as per IVDD (identified by the LOT numbers reported in the Standard and Positive Control IFU) are technically compatible with the new IVDR version of the amplification kit EBV ELITe MGB® Kit (Ref. RTS020PLD) and can be used, until exhausted, in association with the new IVDR version of the amplification kit and in accordance with its intended use.

Instructions for use

EBV ELITe MGB® Kit

Reactivos para la PCR de ADN en tiempo real

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTS020PLD

UDI 08033891483579

CE 0123

IVD

HISTORIAL DE CAMBIOS

Rev.	Información del cambio	Fecha (dd/mm/aa)
22–R	Actualización para la inclusión del kit de extracción ELITe InGenius SP 1000 (ref INT033SP1000) y de los datos relacionados cuando se utilizan muestras de plasma y el ELITe InGenius con el protocolo «1000 in 100». Actualización de los rendimientos analítico y diagnóstico incluidos en la sección «CARACERÍSTICAS DE RENDIMIENTO» (límite de detección, rango de medición linea, sensibilidad diagnóstica y especificidad diagnóstica) Actualización de la sección «Símbolos» con el símbolo «Consultar las instrucciones de uso»	04/03/25
21–R	Actualización para el cumplimiento de los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*. Actualización de los rendimientos analítico y diagnóstico en la sección «CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO». Actualización del uso previsto: • Validación de los productos en los instrumentos ELITe InGenius (REF INT030) y ELITe BeGenius (REF INT040) con matrices de sangre y de plasma. • Validación de los productos en la matriz de sangre con los siguientes instrumentos: ELITe GALAXY y ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. **NOTA!** La composición del producto permanece sin cambios. Nuevo diseño de los gráficos y del contenido de las instrucciones de uso	29/08/24
20	Descripción del valor de corte del IC en la sección: Especificidad diagnóstica	22/12/22
19	Modificación del valor del ULoQ en muestras de sangre con el instrumento ELITe InGenius	01/04/22
18	Ampliación del uso en el instrumento automático e integrado ELITe BeGenius	30/09/21
17	Adición de datos analíticos (LoD, linealidad,…) obtenidos con el Roche cobas z 480 analyzer	07/05/20
16	Modificación de los valores del LoD y del LoQ en muestras de sangre y de plasma con el instrumento ELITe InGenius	05/06/19
15	Ampliación del uso con el kit de extracción ELITe InGenius SP 1000. Ampliación del uso del producto con la plataforma Roche cobas z 480 analyzer.	31/10/18
14	Modificación de los valores del ULoQ en muestras de plasma con el instrumento ELITe InGenius Actualización de los valores del factor de conversión de UI en muestras de sangre con el instrumento QIAsymphony.	15/01/18
00–13	Desarrollo de un nuevo producto con los cambios consiguientes	-

NOTA!

Los siguientes lotes de productos seguirán comercializándose según la Directiva relativa a los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* hasta sus fechas de caducidad, tal como se establece en el artículo 110 del reglamento mencionado. Si tiene alguno de estos lotes de productos, póngase en contacto con el personal de ELITechGroup para solicitar la versión anterior de las instrucciones de uso relacionadas con dicho producto.

REF. DEL PRODUCTO	Código de lote	Fecha de caducidad
RTS020PLD	U0524-102	28/02/2026

INDICE

1 USO PREVISTO 4
2 PRINCIPIO DEL ENSAYO 4
3 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO 4
4 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO 5
5 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO 5
6 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS 5
7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES 6
8 Muestras y controles para el ELITe InGenius y e ELITe BeGenius 8
9 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius 11
10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius 19
11 Características de rendimiento del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius 24
12 Muestras y controles para el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 36
13 Procedimiento con el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 36
14 Características de rendimiento con el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument 42
15 BIBLIOGRAFÍA 45
16 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO 45
17 PROBLEMAS Y SOLUCIONES 47
18 SÍMBOLOS 51
19 NOTA PARA LOS USUARIOS 51
20 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA 52
Appendix A QUICK START GUIDE 53
Appendix B QUICK START GUIDE 58

1 USO PREVISTO

El producto **EBV ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cuantitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la detección y la cuantificación de **ADN de virus de Epstein-Barr (VEB)** extraído de muestras clínicas.

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

El ensayo también se ha validado con el **ELITe GALAXY**, que es un sistema automático de extracción y preparación de PCR, y con el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, una plataforma de PCR en tiempo real, utilizando muestras de sangre recogida en EDTA.

El producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico de infecciones por virus de Epstein-Barr (VEB) en pacientes en los que se sospecha la presencia de alguna infección por VEB y en el seguimiento en pacientes que tienen que someterse al tratamiento de una infección por VEB.

Los resultados deben interpretarse en combinación con todas las observaciones clínicas pertinentes del paciente así como los resultados de otras pruebas de laboratorio.

2 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este es un ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real para la detección de ADN de VEB aislado de muestras y amplificado utilizando el reactivo de ensayo **EBV Q-PCR Mix**, que contiene cebadores y sondas con la tecnología ELITe MGB®.

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

El **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** mide y registra el aumento de la emisión de fluorescencia. El procesamiento siguiente de los datos permite la detección y la cuantificación de VEB en la muestra primaria.

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

3 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **EBV ELITe MGB Kit** incluye el reactivo de ensayo **EBV Q-PCR Mix**, que es una mezcla de PCR optimizada y estabilizada que contiene los cebadores y las sondas específicos para:

- una región del **gen EBNA-1** de VEB, detectada en el canal **EBV**; la sonda se estabiliza mediante la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher® y se marca con el colorante FAM.
- el Internal Control (IC), específico para **el promotor y la región 5' UTR** del **gen de la globina beta humana**, detectado en el canal **IC**; la sonda se estabiliza mediante la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher® y se marca con el colorante AquaPhluor® 525 (AP525).

La **EBV Q-PCR Mix** 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 **EBV ELITe MGB Kit** contiene suficientes reactivos para realizar **96 análisis** en el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius**, cuando se utilizan **20 µL** en cada reacción.

El producto **EBV ELITe MGB Kit** contiene reactivos suficientes para **100 sesiones en otros sistemas** cuando se utilizan **20 µL** en cada reacción.

NOTA!

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).

4 MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Tabla 1

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
EBV Q-PCR Mix ref. RTS020PLD	Mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real en una probeta con tapón de color natural	**4 × 540 µL**	-

5 MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 5000 rpm).
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 13.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (0,5–10 µL, 2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Probetas estériles de 2,0 mL con tapón roscado (Sarstedt, Alemania, ref. 72.694.005).
- Agua de calidad para biología molecular.

6 OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

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

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

Tabla 2

Instrumentos y software	Productos y reactivos
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030) **ELITe InGenius Software** versión 1.3.0.19 (o posterior). **EBV ELITe_STD**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores **EBV ELITe_PC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control **EBV ELITe_NC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) para el análisis del Negative Control **EBV ELITe_STD_1000_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores (solo para muestras de plasma y un volumen de la muestra de 1000 µL) **EBV ELITe_PC_1000_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control (solo para muestras de plasma y un volumen de la muestra de 1000 µL) **EBV ELITe_NC_1000_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Negative Control (solo para muestras de plasma y un volumen de la muestra de 1000 µL) **EBV ELITe_WB_200_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de sangre. **EBV ELITe_PL_200_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de plasma **EBV ELITe_PL_1000_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de plasma	**ELITe InGenius SP200** (EG SpA, ref. INT032SP200) **ELITe InGenius SP 200 Consumable Set** (EG SpA, ref. INT032CS) **ELITe InGenius SP1000** (EG SpA, ref. INT033SP1000), solo con el ELITe InGenius **ELITe InGenius PCR Cassette** (EG SpA, ref. INT035PCR), **ELITe InGenius Waste Box** (EG SpA, ref. F2102-000) **300 µL Filter Tips Axygen** (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S), solo con el ELITe InGenius **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, Switzerland, ref. 30180118), solo con el ELITe BeGenius **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE). **EBV - ELITe Standard** (EG SpA, ref. STD020PLD) **EBV - ELITe Positive Control** (EG SpA, ref. CTR020PLD)
ELITe BeGenius (EG SpA, ref. INT040) **ELITe BeGenius Software** versión 2.2.1 (o posterior) **EBV ELITe_Be_STD**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores **EBV ELITe_Be_PC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control. **EBV ELITe_Be_NC**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Negative Control **EBV ELITe_Be_WB_200_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de muestras de sangre **EBV ELITe_Be_PL_200_100**, Assay Protocol (protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de plasma	
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985) **ELITe GALAXY** (EG SpA, ref. INT020) con **versión 1.3.1 del software** (o posterior). Protocolo de extracción para el ELITe GALAXY, xNA Extraction (Universal)	**ELITe GALAXY 300 Extraction Kit** (EG SpA, ref. INT021EX). **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate con código de barras, 0,1 mL** (Life Technologies, ref. 4346906), que contiene microplacas con pocillos de 0,1 mL y placas de sellado adhesivas para la amplificación en tiempo real. **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE) **EBV - ELITe Standard** (EG SpA, ref. STD020PLD) **EBV - ELITe Positive Control** (EG SpA, ref. CTR020PLD)

7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado exclusivamente para uso in vitro.

7.1 Advertencias y precauciones generales

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

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

- Utilizar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.
- No pipetear ninguna solución con la boca.
- No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.
- Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.
- Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.
- Leer atentamente todas las instrucciones incluidas antes de realizar el ensayo.
- Durante la realización del ensayo, seguir las instrucciones proporcionadas con el producto.
- No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada.
- Utilizar únicamente los reactivos incluidos en el producto y los recomendados por el fabricante.
- No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.
- No utilizar reactivos de otros fabricantes.

7.2 Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

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

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.

Cuando la sesión de amplificación debe realizarse con el 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, 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.

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

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

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

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de extracción deben manipularse de manera que se reduzca al mínimo la dispersión hacia el entorno.

Los cartuchos PCR Cassette deben manipularse con cuidado y no deben abrirse nunca para evitar la dispersión del producto de PCR hacia el entorno, así como la contaminación de muestras y reactivos.

7.3 Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

Tabla 3

Componente	Temperatura de almacenamiento	Uso a partir de la primera apertura	Ciclos de congelación y descongelación	Estabilidad con carga (ELITe InGenius y ELITe BeGenius)
EBV Q-PCR Mix	−20 °C o menos (protegido de la luz)	un mes	máximo cinco	Hasta cinco sesiones independientes* de tres horas cada una o hasta 7 horas consecutivas (2 sesiones de 3 horas cada una y el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión)

* Con congelación intermedia

8 Muestras y controles para el ELITe InGenius y e ELITe BeGenius

8.1 Muestras

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

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	−20 °C ± 10 °C	−70 °C ± 15 °C
Sangre	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d
Plasma	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d

d: días; EDTA: ácido edético

Si bien son posibles períodos de conservación más largos a −70 °C, tal como se ha documentado en numerosas publicaciones científicas, los usuarios finales de este producto deben realizar una evaluación interna específica para su aplicación.

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.

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

Tabla 4

Muestra	Instrumento	Nombre del protocolo de ensayo	Informe	Características
Sangre recogida en EDTA	ELITe InGenius	«EBV ELITe_WB_200_100»	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución de extracción: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
	ELITe BeGenius	«EBV ELITe_Be_WB_200_100»	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución de extracción: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
Plasma recogido en EDTA	ELITe InGenius	EBV ELITe_PL_200_100	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución de extracción: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
	ELITe InGenius	EBV ELITe_PL_1000_100	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 1000 µL Volumen de elución de extracción: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL
	ELITe BeGenius	«EBV ELITe_Be_PL_200_100»	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución de extracción: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

UI: unidades internacionales

NOTA!

Verificar si la probeta primaria y el volumen de la muestra son compatibles con ELITe InGenius o ELITe BeGenius, siguiendo las instrucciones de uso del kit de extracción **ELITeInGeniusSP200** (EG SpA, ref. INT032SP200) o **ELITeInGeniusSP1000** (EG SpA, ref. INT033SP1000).

El volumen de la muestra en la probeta primaria varía en función del tipo de probeta que se haya cargado. Para obtener más información sobre la configuración y realización del procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

En caso necesario, verter 200 µL o 1000 µL de muestra en la «Extraction Tube» (Tubo de extracción), en el caso del ELITe InGenius, o bien verter 200 µL de muestra en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del ELITe BeGenius

NOTA!

el pipeteado de las muestras en el **Extraction tube** (Tubo de extracción) o en la **probeta Sarstedt de 2 mL** puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en la sección «7 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES page 6».

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

Consultar el apartado «Sustancias potencialmente interferentes» en la sección «11 Características de rendimiento del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius page 24» para comprobar los datos relativos a tales sustancias.

NOTA!

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

8.2 Calibradores y controles de PCR

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

- Para la curva de calibración, utilizar los cuatro niveles del producto **EBV ELITe Standard** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **EBV ELITe_STD**, **EBV ELITe_STD_1000_100** o **EBV ELITe_Be_STD**.

NOTA!

Las concentraciones de los calibradores Q-PCR Standard se expresan en copias/reacción (10^5 copias/reacción, 10^4 copias/reacción, 10^3 copias/reacción y 10^2 copias/reacción). Consultar «Incertidumbre de la curva de calibración» en la sección 11 Características de rendimiento del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius page 24.

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

- Para el Positive Control, utilizar el producto **EBV - ELITe Positive Control** (no incluido con este kit) con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **EBV ELITe_PC**, **EBV ELITe_PC_1000_100** o **EBV ELITe_Be_PC**.
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit), junto con los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **EBV ELITe_NC**, **EBV ELITe_NC_1000_100** o **EBV ELITe_Be_NC**

NOTA!

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

Las curvas de calibración caducan **a los 60 días**, después de los cuales es necesario volver a realizar la calibración.

Los resultados del control de PCR caducan a los 15 días, después de los cuales es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control.

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

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

8.3 Controles de calidad

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

9 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius

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

Tabla 5

PASO 1	Verificación de la disponibilidad del sistema	
PASO 2	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
		B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).
		C) Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
		D) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
PASO 3	Evaluación y aprobación de los resultados	1) Validación de la curva de calibración
		2) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
		3) Validación de los resultados de las muestras
		4) Generación del informe de los resultados de la muestra

9.1 PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el **ELITe InGenius** e iniciar sesión en el modo **«CLOSED»**.
- En el menú «Calibration» (Calibración) de la pantalla «Home» (Inicio), verificar que los calibradores (**Q - PCR Standard**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de calibradores válidos para el lote de mezcla **PCR Mix**, realizar la calibración tal como se describe en los apartados siguientes.
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**Positive Control** y **Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de PCR Mix que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **PCR Mix**, procesar los controles de la PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección 8 «Muestras y controles» page 8).

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

9.2 PASO 2. Configuración de la sesión

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

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

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

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

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

Todos los parámetros necesarios están incluidos en el protocolo de ensayo disponible en el instrumento y se cargan automáticamente al seleccionar el protocolo de ensayo.

NOTA!

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

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **24 análisis**. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

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

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

	A. Sesión de la muestra (Extract + PCR).	**B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)**
1	**Identificar las muestras** y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente, mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. En caso necesario, verter 200 µL o 1000 µL de muestra en una «Extraction Tube» (Tubo de extracción) previamente etiquetada. **Descongelar** las **probetas de CPE** necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	**Descongelar** la **«Elution Tube»** (Tubo de elución) que contiene los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.
2	Seleccionar **«Perform Run» (Realizar ejecución)** en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar **«Perform Run» (Realizar ejecución)** en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL o 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL o 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
4	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.
5	**Seleccionar** el **Assay Protocol (Protocolo de ensayo)** en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el **Assay Protocol (Protocolo de ensayo)** en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».

	A. Sesión de la muestra (Extract + PCR).	**B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)**
6	Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» (Protocolo) sea «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	Seleccionar «PCR Only» (Solo PCR) en la columna «Protocol» (Protocolo).
7	En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar la posición de carga «Extraction Tube» (Tubo de extracción) para la muestra. Asegurarse de que la opción **«Dilution factor» (Factor de dilución)** esté configurada a **«1»**.	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]). Asegurarse de que la opción **«Dilution factor» (Factor de dilución)** esté configurada a **«1»**.
8	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
9	**Cargar el CPE** y la **PCR Mix** en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote del CPE y de la mezcla PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	**Cargar** la **PCR Mix** en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
12	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
13	**Cargar** el PCR Cassette, los cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 200 o SP 1000, así como todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse.	**Cargar** el PCR Cassette y las «Elution Tube» (Tubosde elución) con las muestras extraídas.
14	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
15	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
16	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

	C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	**D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)**
1	**Descongelar** las probetas de calibrador **Q-PCR Standard tubes** (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	**Descongelar las probetas de Positive Control** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. **Preparar** el **Negative Control** vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en el tubo de elución («Elution Tube») que se incluye con el ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL o 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL o 1000 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
4	Para el calibrador Q-PCR, asignar el carril («Track»), **seleccionar** el **Assay Protocol (Protocolo de ensayo)** en la columna «Assay» (Ensayo) y, después, rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de los reactivos.	**Seleccionar** el **Assay Protocol (Protocolo de ensayo)** en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». Introducir el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control y del agua para biología molecular.

	C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
5	En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR).	En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR).
6	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).
7	**Cargar** la **PCR Mix** en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	**Cargar** la **PCR Mix** en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
8	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
9	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	**Cargar** el PCR Cassette y las probetas de Q-PCR Standard.	**Cargar** el PCR Cassette, el Positive Control y el Negative Control.
12	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
13	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
14	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

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

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en la **«Elution Tube»** (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a −20 ±10 °C durante un máximo de un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 horas (2 sesiones de 3 horas cada una y el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

9.3 PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

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

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

NOTA!

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

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

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

9.3.1 Validación de la curva de calibración

El **ELITe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del calibrador utilizando los parámetros de los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **EBV ELITe STD** o **EBV ELITe STD_1000_100**. La relación Ct a concentración resultante da lugar a la curva de calibración.

Las curvas de calibración, específicas del lote de reactivos de PCR, se registran en la base de datos («Calibration»). Los usuarios cualificados como administrador («Administrator») o analista («Analyst») pueden consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

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

NOTA!

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

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

El **ELITe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del Positive Control y del Negative Control con los parámetros de los Assay protocols (protocolos de ensayo) **EBV ELITe_PC** o **EBV PC_1000_100** y **EBV ELITe_NC** o **EBV NC_1000_100**. Los valores de Ct resultantes se convierten en concentraciones y se utilizan para verificar el sistema (lote de reactivos e instrumento).

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

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

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

NOTA!

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

NOTA!

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

9.3.3 Validación de los resultados de la muestra

El **ELITe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para las dianas (canal **EBV**) y el Internal Control (canal **IC**) con los parámetros de los Assay Protocols (protocolos de ensayo) **EBV ELITe_WB_200_100**, **EBV ELITe_PL_200_100** y **EBV PL_1000_100**. Los valores resultantes del Ct de la diana se convierten en concentración.

Los resultados se muestran en la pantalla «Results Display».

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

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

El **ELITe InGenius Software** interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo) correspondiente.

En la tabla siguiente se muestran los posibles mensajes de los resultados.

Para cada muestra el sistema indica una combinación de los mensajes siguientes y especifica si se ha detectado o no el ADN de los patógenos.

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

Las muestras que se notifican como «Invalid: Retest Sample» (No válido-Volver a probar muestra) indican que el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente, probablemente debido a problemas en los pasos de recogida de la muestra, extracción o PCR (p. ej., obtención incorrecta de la muestra, degradación o pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si queda un volumen de eluido suficiente, dicho eluido puede volver a analizarse (tal cual o diluido) con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de extracción de una nueva muestra utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR); consultar la sección «17 PROBLEMAS Y SOLUCIONES page 47».

Las muestras que se notifican como «EBV:DNA Not Detected or below “LoD” copies/mL or IU/mL» (EBV:ADN no detectado o por debajo de LoD copias/mL o UI/mL) son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar VEB. En este caso, puede que la muestra sea negativa para ADN de VEB, o que el ADN de VEB presente una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar sección «11 Características de rendimiento del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius page 24»).

Si se detectan muestras positivas para ADN de VEB a una concentración inferior al límite de detección (y al límite inferior de cuantificación) del ensayo, estas se notifican como «EBV:DNA Detected, quantity below LLoQ copias/mL or IU/mL»(EBV: ADN detectado, cantidad por debajo de“LLoQ” copias/mL o UI/mL); consultar la sección 11 Características de rendimiento del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius page 24.

La muestras positivas para ADN de VEB dentro del rango de medición lineal se detectan y notifican como «EBV: DNA Detected, quantity equal to “XXX” copies/mL or IU/mL» (EBV: ADN detectado, cantidad igual a “XXX” copias/mL o UI/mL); consultar la sección «».

Las muestras positivas para ADN de EBV que superan el límite superior de cuantificación se notifican como «EBV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copias/mL or IU/mL» (CMV: ADN detectado, cantidad mas alta de “ULoQ” copias/mL o IU/mL) y no son aptas para la cuantificación. En caso necesario, es posible diluir la muestra antes de la extracción o de la PCR y volver a analizarla para obtener resultados dentro del rango de medición lineal del ensayo.

NOTA!

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

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

9.3.4 Generación del informe de los resultados de la muestra

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

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

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

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

10 PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius

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

Tabla 6

PASO 1	Verificación de la disponibilidad del sistema	
PASO 2	Configuración de la sesión	A) Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
		B) Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
		C) Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
		D) Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
PASO 3	Evaluación y aprobación de los resultados	1) Validación de la curva de calibración
		2) Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
		3) Validación de los resultados de las muestras
		4) Generación del informe de los resultados de la muestra

10.1 PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

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

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

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

10.2 PASO 2. Configuración de la sesión

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

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

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

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

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

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

NOTA!

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

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **24 análisis**. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

NOTA!

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

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

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento«Extract + PCR» (Extracción + PCR)	**B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)**
1	**Identificar las muestras** y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente, mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. En caso necesario, verter 200 µL de muestra en una probeta Sarstedt de 2 mL previamente etiquetada. **Descongelar** las **probetas de CPE** necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	**Descongelar** el **«Elution Tube»** (tubo de elución) que contiene los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.
2	Seleccionar **«Perform Run» (Realizar ejecución)** en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar **«Perform Run» (Realizar ejecución)** en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Extraer todas las gradillas de la «Cooler Unit» y colocarlas en la mesa de preparación.	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la tabla de preparación.
4	Seleccionar el «Run Mode»: «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR).
5	Cargar las muestras en la «Sample Rack» (rack de muestras). Cuando se cargan probetas secundarias «2 mL Tube», utilizar los adaptadores azules para la «Sample Rack» (rack de muestras).	Cargar las muestras en la «Elution Rack» (rejilla de elución).
6	**Insertar la «Sample Rack»** (rack de muestras) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 5 (L5). En caso necesario, insertar el ID de la muestra para cada posición utilizada. Si se cargan probetas secundarias, marcar la probeta de 2 mL como «2 mL Tube». Si las probetas secundarias no tienen códigos de barras, introducir manualmente el ID de las muestras.	**Insertar la «Elution Rack»** (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position», introducir el «SID» (ID de la muestra), la «Sample matrix» (matriz de la muestra), el «Extraction kit» (kit de extracción) y el «Extracted Eluate Volume» (volumen de elución extraído).
7	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
8	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.

	A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento«Extract + PCR» (Extracción + PCR)	B. Sesión con la muestra; eluida modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
9	Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6.	si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento a partir del punto 6.
12	Cargar los «Elution Tubes» (Tubos de elución) en la «Elution Rack» (rejilla de elución); las probetas de elución pueden etiquetarse con un código de barras para mejorar la rastreabilidad.	No aplicable
13	Insertar la «Elution Rack» (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). Si se procesan más de 12 muestras, repetir el procedimiento utilizando el «Lane 2» (L2).	No aplicable
14	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	No aplicable
15	Cargar el CPE y la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
16	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/ elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix o CPE, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
17	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
18	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
19	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
20	Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).
21	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
22	Cargar la «Extraction Rack» (gradilla de extracción) con los cartuchos de extracción ELITe InGenius SP 200 y los consumibles de extracción necesarios.	No aplicable
23	Cerrar la puerta del instrumento.	Cerrar la puerta del instrumento.
24	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

	C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
1	**Descongelar** las probetas de calibrador **Q-PCR Standard tubes** (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	**Descongelar las probetas de Positive Control** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. **Preparar** el **Negative Control** vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en el tubo de elución («Elution Tube») que se incluye con el ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la tabla de preparación.	Extraer las racks de los «Lanes» 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la «Cooler Unit» y colocarlas en la tabla de preparación.
4	Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR).	Seleccionar el «Run Mode»: «PCR Only» (Solo PCR).
5	**Cargar las probetas de Q-PCR Standard** en la «Elution Rack» (rejilla de elución).	**Cargar** las **probetas de Positive Control y de Negative Control** en la «Elution Rack» (rejilla de elución).
6	**Insertar** la **«Elution Rack»** (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo) , el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	**Insertar** la **«Elution Rack»** (rejilla de elución) en la «Cooler Unit», comenzando por el Lane 3 (L3). En caso necesario, para cada «Position» introducir el «Reagent name» (nombre del reactivo) , el «S/N» (número de serie) el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
7	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
8	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
9	Seleccionar el **Assay Protocol (Protocolo de ensayo)** en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el **Assay Protocol (Protocolo de ensayo)** en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	**Cargar** la **PCR Mix** en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	**Cargar** la **PCR Mix** en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
12	**Insertar** la **«Reagent/Elution Rack»** (rejilla de reactivos/elución) en la «Cooler Unit», en el Lane 2 (L2). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en la «Cooler Unit», en el Lane 2 (L2). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
13	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
14	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
15	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.

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

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

NOTA!

Al finalizar la sesión, la parte que queda de la muestra extraída en la **«Elution Tube»** (Tubo de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a −20 ±10 °C durante un máximo de un mes. Evitar cualquier derrame de la muestra extraída.

NOTA!

Al finalizar la sesión, la **PCR Mix** puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior, o bien mantenerse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 horas (2 sesiones de 3 horas cada una y el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

NOTA!

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

10.3 PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

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

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

NOTA!

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

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

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

NOTA!

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

11 Características de rendimiento del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius

11.1 Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del ensayo con muestras de sangre y de plasma recogidos en EDTA se determinó en el instrumento **ELITe InGenius**, analizando un panel de matrices negativas para VEB que se enriquecieron con material de referencia de VEB (Primer Estándar Internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de virus de Epstein-Barr (VEB), código NIBSC 09/260, Reino Unido). Se realizó un análisis de regresión Probit en los resultados y el LoD se calculó como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

En las tablas siguientes se indican los resultados de las dos matrices.

Tabla 7 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 una de las matrices, se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en el apartado 11.11 Factor de conversión a unidades internacionales page 32

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

Tabla 8 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	17 copias/mL

Volumen de la muestra de 200 µL: el valor calculado del LoD se verificó para cada matriz analizando en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius un panel de matrices enriquecidas con material de referencia certificado de EBV a la concentración declarada.

Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana de EBV ELITe MGB Kit tanto en el ELITe InGenius como en el ELITe BeGenius para cada matriz.

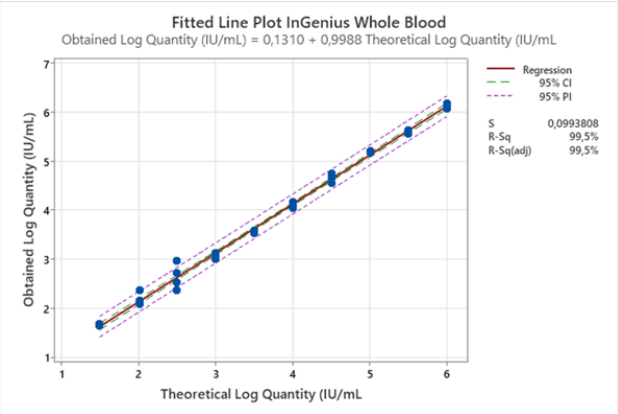
Volumen de la muestra de 1000 µL: el valor calculado del LoD se verificó para la matriz de plasma analizando en el ELITe InGenius un panel de matrices enriquecidas con material de referencia certificado de EBV a la concentración declarada. Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana del producto EBV ELITe MGB Kit, tanto en el ELITe InGenius.

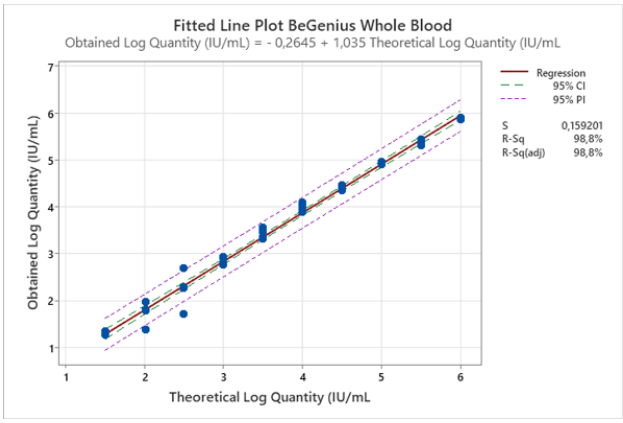
11.2 Rango de medición lineal y límites de cuantificación

El rango de medición lineal del ensayo se determinó con muestras de sangre y de plasma en los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** utilizando un panel de material de referencia de VEB (Zeptometrix con muestras de plasma y el Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de virus de Epstein-Barr (VEB) en una matriz negativa para ADN de VEB.

En los apartados siguientes se muestran los resultados de cada matriz.

Sangre:





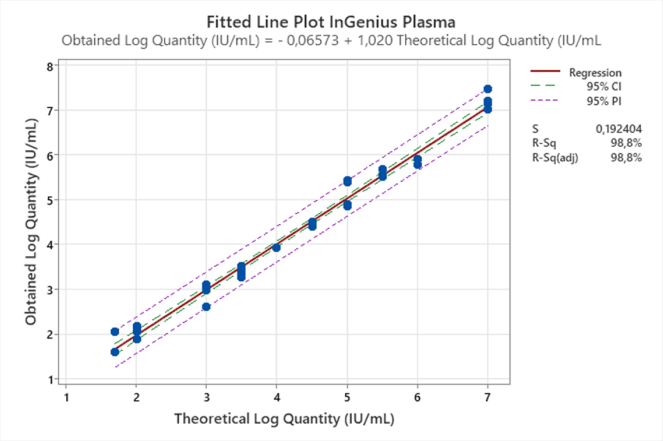
El rango de medición lineal, expresado en copias/mL, se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en el apartado 11.11 Factor de conversión a unidades internacionales page 32

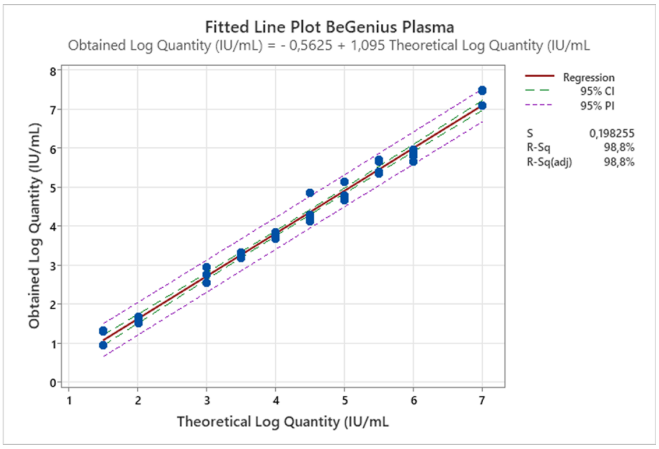
Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 9 Rango de medición lineal para muestras de sangre y los instrumentos ELITe InGenius y ELITe BeGenius

Unidad	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	104	1.000.001
copias/mL	36	344.828

Plasma:





El rango de medición lineal, expresado como copias/mL (volumen de la muestra de 200 µL), se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la sección 11.11 Factor de conversión a unidades internacionales page 32

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 10 Rango de medición lineal para muestras de plasma (200 µL) y los instrumentos ELITe InGenius y ELITe BeGenius

Unidad	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	124	10.000.000
copias/mL	65	5.263.158

El rango de medición lineal, expresado como copias/mL (volumen de la muestra de 1000 µL), se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la sección 14.9 Conversión a unidades internacionales página 55

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 11 Rango de medición lineal para muestras de plasma (1000 µL) y el ELITe InGenius

Unidad	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	99	1.000.000
copias/mL	62	625.000

11.3 Incertidumbre de la curva de calibración

El valor de incertidumbre de la curva de calibración se calculó combinando los errores aleatorios (DE) de todas las cuantificaciones de nivel y multiplicando por el factor de cobertura k = 2 (incertidumbre combinada ampliada) y resultó ser de 0,2949 log copias/reacción.

Tabla 12

Niveles de la curva de calibración	Teóricos	Medidos	DE	Incertidumbre combinada ampliada
	Log copias/ reacción	Log copias/ reacción		
EBV Q - PCR Standard 10^5	5,0000	5,0032	0,0636	0,2949
EBV Q - PCR Standard 10^4	4,0000	3,9860	0,0739	
EBV Q - PCR Standard 10^3	3,0000	3,0184	0,0654	
EBV Q - PCR Standard 10^2	2,0000	1,9924	0,0892	

11.4 Inclusividad: Eficacia de detección y cuantificación en distintos genotipos

La inclusividad del ensayo, definida como la eficacia de detección de diferentes genotipos de VEB, se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en las bases de datos de nucleótidos. El análisis demostró la conservación de la secuencia y la ausencia de mutaciones significativas. Así, se espera una detección eficaz de las diferentes cepas y los diferentes aislados.

11.5 Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La reactividad cruzada potencial de los microorganismos imprevistos que pueden encontrarse en muestras clínicas se evaluó mediante un análisis informático. El análisis no presentó ninguna homología reseñable con otros microorganismos imprevistos (virus, bacterias, protozoos y hongos) y, por lo tanto, no cabe esperar reactividad cruzada.

La ausencia de reactividad cruzada con los microorganismos potencialmente interferentes también se verificó analizando un panel de microorganismos imprevistos (ATCC, Zeptometrix) a un título alto.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 13 Microorganismos potencialmente interferentes

Muestra	de EV	Resultado
CMV	0/5	Sin reactividad cruzada
VHH6	0/5	Sin reactividad cruzada
HHV7	0/5	Sin reactividad cruzada
HHV8	0/5	Sin reactividad cruzada
VHS1	0/5	Sin reactividad cruzada
VHS2	0/5	Sin reactividad cruzada
VVZ	0/5	Sin reactividad cruzada

Ninguno de los marcadores potencialmente interferentes analizados mostró reactividad cruzada para la amplificación de la diana de VEB cuando se utilizó el producto EBV ELITe MGB Kit

11.6 Marcadores potencialmente interferentes: inhibición

La inhibición potencial de microorganismos imprevistos que pueden encontrarse en las muestras clínicas se evaluó para el ensayo analizando un panel de microorganismos imprevistos en muestras positivas para VEB procedentes de diferentes proveedores (ATCC, Zeptometrix).

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 14 Microorganismos potencialmente interferentes

Muestra	de EV	Resultado
CMV	5/5	Sin interferencia
VHH6	5/5	Sin interferencia
HHV7	5/5	Sin interferencia
HHV8	5/5	Sin interferencia
VHS1	5/5	Sin interferencia
VHS2	5/5	Sin interferencia
VVZ	5/5	Sin interferencia

Ninguno de los microorganismos potencialmente interferentes analizados mostró interferencias en la detección y la cuantificación de la diana de VEB cuando se utilizó el producto EBV ELITe MGB Kit.

11.7 Sustancias potencialmente interferentes: reactividad cruzada

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

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 15 Sangre

Muestras	Pos/Dup de VEB	Resultado
Bilirrubina	0/3	Sin reactividad cruzada
EDTA	0/3	Sin reactividad cruzada
Ganciclovir	0/3	Sin reactividad cruzada
Azitromicina	0/3	Sin reactividad cruzada
Ribavirina	0/3	Sin reactividad cruzada
Sulfato de abacavir	0/3	Sin reactividad cruzada
Cidofovir	0/3	Sin reactividad cruzada
Ciclosporina A	0/3	Sin reactividad cruzada
Heparina	0/3	Muestras no válidas
Vancomicina	0/5	Sin reactividad cruzada
Ciprofloxacino	0/5	Sin reactividad cruzada
Cefpodoxima	0/5	Sin reactividad cruzada

El análisis demostró que prácticamente ninguna de las sustancias presentan una reacción cruzada con la detección y la cuantificación de la diana de VEB cuando se utiliza el producto EBV ELITe MGB Kit Se confirmó que la heparina es capaz de inhibir la amplificación de VEB y del Internal Control.

Tabla 16 Plasma

Muestras	Pos/Dup de VEB	Resultado
Bilirrubina	0/5	Sin reactividad cruzada
EDTA	0/5	Sin reactividad cruzada
Ganciclovir	0/5	Sin reactividad cruzada
Azitromicina	0/5	Sin reactividad cruzada
Ribavirina	0/5	Sin reactividad cruzada
Sulfato de abacavir	0/5	Sin reactividad cruzada
Cidofovir	0/5	Sin reactividad cruzada
Ciclosporina A	0/5	Sin reactividad cruzada
Heparina	0/5	Muestras no válidas
Vancomicina	0/5	Sin reactividad cruzada
Ciprofloxacino	0/5	Sin reactividad cruzada
Cefpodoxima	0/5	Sin reactividad cruzada

El análisis demostró que prácticamente ninguna de las sustancias presentan una reacción cruzada con la detección y la cuantificación de la diana de VEB cuando se utiliza el producto EBV ELITe MGB Kit Se confirmó que la heparina es capaz de inhibir la amplificación de VEB y del Internal Control.

11.8 Sustancias potencialmente interferentes: Inhibición

La inhibición potencial provocada por las sustancias potencialmente interferentes (endógenas y exógenas) que pueden encontrarse en las muestras clínicas se evaluó para el ensayo analizando un panel de sustancias a la concentración pertinente en muestras positivas para VEB.

En los apartados siguientes se muestran los resultados de cada matriz.

Tabla 17 Sangre

Muestras	Pos/Dup de VEB	Resultado
Bilirrubina	3/3	Sin interferencia
EDTA	3/3	Sin interferencia
Ganciclovir	3/3	Sin interferencia
Azitromicina	3/3	Sin interferencia
Ribavirina	3/3	Sin interferencia
Sulfato de abacavir	3/3	Sin interferencia
Cidofovir	3/3	Sin interferencia
Ciclosporina A	3/3	Sin interferencia
Heparina	3/3	Sin interferencia
Vancomicina	5/5	Sin interferencia
Ciprofloxacino	5/5	Sin interferencia
Cefpodoxima	5/5	Sin interferencia

Las sustancias analizadas no interfirieron en la amplificación del VEB ni en la del Internal Control.

Tabla 18 Plasma

Muestra	Pos/Dup de VEB	Resultado
Bilirrubina	5/5	Sin interferencia
EDTA	5/5	Sin interferencia
Ganciclovir	5/5	Sin interferencia
Azitromicina	5/5	Sin interferencia
Ribavirina	5/5	Sin interferencia
Sulfato de abacavir	5/5	Sin interferencia
Cidofovir	5/5	Sin interferencia
Ciclosporina A	5/5	Sin interferencia
Heparina	0/5 muestras no válidas	Interferencia
Vancomicina	5/5	Sin interferencia
Ciprofloxacino	5/5	Sin interferencia
Cefpodoxima	5/5	Sin interferencia

El análisis demostró que, a excepción de la heparina, ninguna de la sustancias interfiere en la detección o en la cuantificación de la diana de VEB cuando se utiliza el producto **EBV ELITe MGB Kit**.

11.9 Repetibilidad

La repetibilidad dentro de las sesiones y entre sesiones del ensayo se evaluó en el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA, que también incluía una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de VEB (Primer estándar internacional de la OMS para VEB, NIBSC).

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

Tabla 19 Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe InGenius

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	-	-	-	100 %
3×LoD	8	35,68	0,57	1,60	100 %
10×LoD	8	34,22	0,24	0,70	100 %

Tabla 20 Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe BeGenius

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	-	-	-	100 %
3×LoD	8	37,32	0,49	1,30	100 %
10×LoD	8	35,97	0,43	1,19	100 %

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

Tabla 21 Repetibilidad entre sesiones con el ELITe BeGenius

Muestra	EBV ELITe MGB Kit - Días 1-2				
	N	Ct medio de VEB	DE del Ct de VEB	%CV del Ct de VEB	% de concordancia
Negativas	14	-	-	-	100 %
3×LoD	16	37,29	0,67	1,79	100 %
10×LoD	16	35,82	0,67	1,86	100 %

Tabla 22 Repetibilidad entre sesiones con el ELITe InGenius

Muestra	EBV ELITe MGB Kit - Días 1-2				
	N	Ct medio de VEB	DE del Ct de VEB	%CV del Ct de VEB	% de concordancia
Negativas	14	-	-	-	100 %
3×LoD	16	35,72	0,53	1,48	100 %
10×LoD	16	34,39	0,37	1,07	100 %

En la prueba de repetibilidad, el producto EBV ELITe MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

11.10 Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo se evaluó en el ELITe BeGenius y el ELITe InGenius analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA, negativas o enriquecidas con VEB (Primer Estándar Internacional de la OMS, NIBSC).

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

Tabla 23 Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe InGenius

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	-	-	-	100 %
3×LoD	8	35,78	0,44	1,24	100 %
10×LoD	8	30,38	0,36	1,17	100 %

Tabla 24 Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe BeGenius

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	7	-	-	-	100 %
3×LoD	8	36,79	0,86	2,32	100 %
10×LoD	8	35,15	0,65	1,84	100 %

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

Tabla 25 Reproducibilidad entre lotes con el ELITe InGenius

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	-	-	-	100 %
3×LoD	8	35,91	0,38	1,06	100 %
10×LoD	8	34,48	0,15	0,43	100 %

Tabla 26 Reproducibilidad entre lotes con el ELITe BeGenius

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	7	-	-	-	100 %
3×LoD	8	37,45	0,65	1,72	100 %
10×LoD	8	35,57	0,42	1,18	100 %

En la prueba de reproducibilidad, el producto EBV ELITe MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

11.11 Factor de conversión a unidades internacionales

El factor de conversión para comunicar los resultados cuantitativos en unidades internacionales/mL a partir de copias/mL se calculó para cada matriz utilizando el material de referencia calibrado certificado del «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de virus de Epstein-Barr (VEB)» (NIBSC).

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

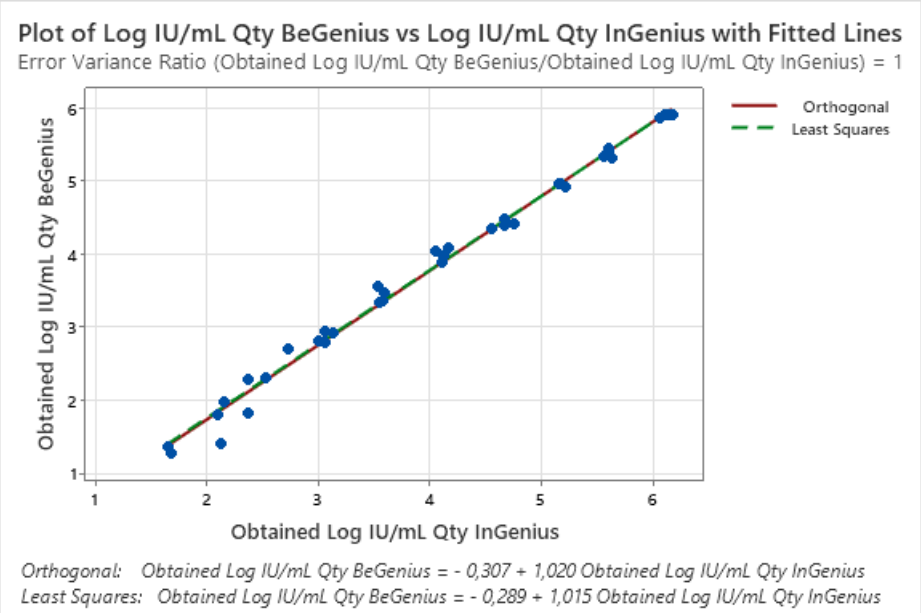
Tabla 27 Factor de conversión a unidades internacionales con ELITe InGenius

Volumen de la muestra	Matriz	Fc (UI copias)
200 µL	Sangre	2,9
	Plasma	1,9
1000 µL	Plasma	1,6

(Volumen de la muestra de 200 µL): El factor de conversión para notificar los resultados cuantitativos en unidades internacionales/mL a partir de copias/mL se verificó en los instrumentos **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** utilizando material de referencia calibrado y certificado (Primer estándar internacional de la OMS, NIBSC). Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de regresión ortogonal y lineal con el fin de calcular la relación entre los métodos.

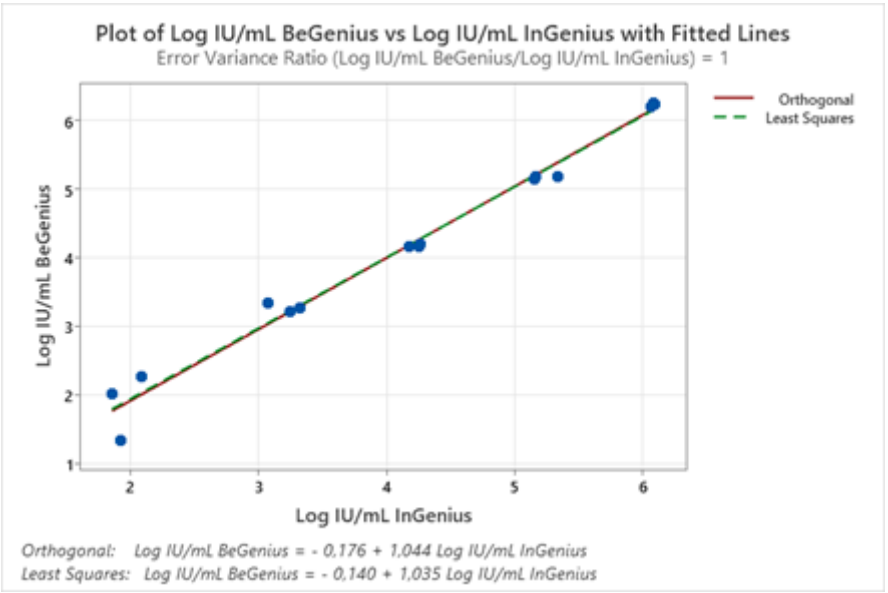
En los apartados siguientes se muestran los resultados de cada matriz.

Sangre



El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de −0,307 (IC del 95 %: −0,4419 a −0,1725) y una pendiente de 1,020 (IC del 95 %: 0,9879; −1,0512). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,991.

Plasma:



El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de −0,176 (IC del 95 %: −0,496 a 0,112) y una pendiente de 1,044 (IC del 95 %: 0,981 a 1,121). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,984.

11.12 Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras negativas, se evaluó utilizando el **ELITe InGenius** y analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA y de plasma recogido en EDTA, que se certificaron como negativas para la diana. Como el **ELITe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la especificidad diagnóstica del ensayo obtenida con el ELITe InGenius también es aplicable al ELITe BeGenius en el caso de un volumen de extracción de 200 µL.

En cambio, en el caso de un volumen de extracción de 1000 µL, los resultados mostrados solo se refieren al instrumento ELITe InGenius.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 28 Especificidad diagnóstica

Muestras	Volumen de la muestra	N	Positivas	Negativas	% de especificidad diagnóstica
Sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de VEB	200 uL	110	3	107	97,3
Plasma recogido EDTA y negativo para ADN de VEB	200 uL	113	1	112	98,3
	1000 uL	62	2	60	

En estas pruebas, teniendo en cuenta los diferentes métodos de extracción, el plasma recogido en EDTA y negativo para ADN de VEB dio lugar a un porcentaje de especificidad diagnóstica del 99,1 % (n=113) en el caso de un volumen de muestra de extracción de 200 µL, y del 96,8 % (n=62) en el caso de un volumen de muestra de extracción de 1000 µL.

El valor de corte para el Ct del IC se estableció a 35 para las muestras de sangre recogida en EDTA y las muestras de plasma recogido en EDTA cuando se analizaron con el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius.

11.13 Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras positivas, se evaluó utilizando el **ELITe InGenius** y analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA y de plasma recogido en EDTA, que se certificaron como positivas para la diana o se enriquecieron con material de referencia. Como el **ELITe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el ELITe InGenius también es aplicable al ELITe BeGenius en el caso de un volumen de extracción de 200 µL.

En cambio, en el caso de un volumen de extracción de 1000 µL, los resultados mostrados solo se refieren al instrumento ELITe InGenius.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 29 Sensibilidad diagnóstica

Muestras	Volumen de la muestra	N	Positivas	Negativas	% de sensibilidad diagnóstica
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de VEB	200 µL	133	131	2	98,5
Plasma recogido EDTA y positivo para ADN de VEB	200 µL	12	12	0	98,9
Plasma recogido EDTA y enriquecido con ADN de VEB	200 µL	46	46	0	
	1000 µL	30	29	1	

En estas pruebas, teniendo en cuenta los diferentes métodos de extracción, el plasma recogido en EDTA y positivo para ADN de VEB o enriquecido con ADN de VEB dio lugar a un porcentaje de especificidad diagnóstica del 100 % (n=58) en el caso de un volumen de muestra de extracción de 200 µL, y del 96,7 % (n = 30) en el caso de un volumen de muestra de extracción de 1000 µL.

NOTA!

Los datos y resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la documentación técnica del producto **EBV ELITe MGB® Kit**, FTP 020PLD.

12 Muestras y controles para el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

12.1 Muestras

Las muestras y los métodos de extracción de ácidos nucleicos siguientes se han validado para el uso con el producto **EBV ELITe MGB Kit** utilizando el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument.

Tabla 30

Tipo de muestra	Kit/Método	Protocolo	Volumen inicial (µL)	Volumen de elución (µL)	Volumen mínimo de la probeta primaria (µL)	Instrucciones especiales
Sangre	ELITe GALAXY	xNA Extraction (universal)	300	200	400-650	Añadir 10 µL/ muestra de CPE a la solución de IC + transportadora

12.2 Sustancias interferentes

Con el fin de evitar problemas de inhibición y el riesgo de obtener 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 antivíricos, antibióticos, antineoplásicos o inmunodepresores.

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

12.3 Controles de amplificación

Cada sesión de amplificación debe validarse con una reacción del Negative Control y una del Positive Control.

Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit), añadida a la reacción en lugar del ADN extraído de la muestra.

Para el Positive Control, utilizar el producto **EBV - ELITePositive Control** o el producto **EBV - ELITe Standard**.

12.4 Controles de calidad

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

13 Procedimiento con el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

13.1 Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

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

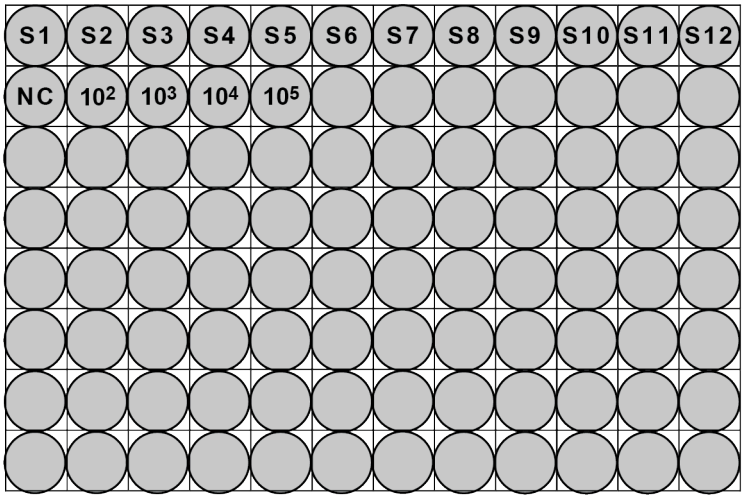
- Encender el instrumento, encender el ordenador, abrir el software dedicado, abrir una sesión de cuantificación absoluta («Absolute quantification») y establecer «Run Mode: Fast 7500».

- Configurar el «detector» («Detector Manager») para la sonda de VEB con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor = «none» (no fluorescente) y etiquetarlo con el nombre «EBV».
- Configurar («Detector Manager») el «detector» para la sonda de Internal Control con el marcador («reporter») = «VIC» (AP525 es análogo a VIC) y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y etiquetarlo con el nombre «IC».
- Para cada pocillo empleado en la microplaca, configurar (en «Well Inspector») el «detector» (fluorescencia que debe medirse), la referencia pasiva («passive reference») o «Cy5» (se utiliza AP593 en lugar de Cy5 para la normalización de los niveles de fluorescencia) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación o calibrador en una cantidad conocida).

NOTA!

Para cuantificar el ADN en la muestra inicial, incluir varias reacciones utilizando los calibradores **Q-PCR Standard** (10^5 copias, 10^4 copias, 10^3 copias y 10^2 copias) para obtener la **curva de calibración**.

A continuación, se incluye un ejemplo de cómo configurar y preparar el análisis cuantitativo de 12 muestras.



Leyenda: S1–**S12**: Muestras que deben analizarse. **NC**: Negative Control de amplificación.

10 ²: 10^2 copias de calibrador; **10³**: 10^3 copias de calibrador; **10⁴**: 10^4 copias de calibrador; **10⁵**: copias de calibrador 10^5.

Consultar la documentación del instrumento para establecer los parámetros del **ciclo térmico**: «Instrument» (Instrumento) > «Thermal Cycler Protocol» (Protocolo del termociclador) > «Thermal Profile» (Perfil térmico):

- Añadir una **extensión de 20 segundos a 72 °C** (paso «Add Step»).

NOTA!

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

- Modificar las temperaturas y los tiempos del ciclo térmico tal como se indica en la tabla **«Ciclo térmico»**.
- Configurar el número de ciclos en **45**.
- Establecer el volumen de la muestra a **30 µL**.
- Opcional: añadir una fase de disociación («Add Dissociation Stage») y configurar la temperatura inicial a **40 °C** y la temperatura final, a **80 °C**.

Tabla 31 Ciclo térmico

Fase	Temperaturas	Tiempo
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	1 min
	80 °C	15 s
	60 °C	15 s

13.2 Configuración de la sesión de PCR en tiempo real

(realizado con el instrumento **ELITe GALAXY**)

Para configurar la sesión de PCR, proceder del modo siguiente:

- Descongelar las probetas de **Q-PCR Mix** necesarias para la sesión (cada una de ellas es suficiente para **25 reacciones**).
- Descongelar las probetas de **Positive Control** (análisis cualitativo: detección del ADN extraído) o de **Q - PCR Standard** (análisis cuantitativo: cuantificación del ADN extraído).
- Mezclar suavemente los reactivos y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Preparar el **Negative Control** (no incluido) según las instrucciones de uso del instrumento.
- Preparar una **microplaca Q-PCR**, manipulándola con cuidado con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.

NOTA!

Para preparar la PCR en el **ELITe GALAXY**, cargar la microplaca de elución que contiene las muestras de DN extraídas, los reactivos y la microplaca **Q-PCR Microplate**, tal como se indica en las instrucciones de uso del instrumento y seguir los pasos indicados en la interfaz.

El instrumento realiza automáticamente la preparación de la PCR distribuyendo en cada pocillo de la microplaca **Q-PCR Microplate**:

- **20 µL** de **Q-PCR Mix**
- **20 µL** de **ADN extraído/Q-PCR Standard/controles**

NOTA!

Si no se utiliza toda la mezcla «Q-PCR Mix», 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 «Q-PCR Mix» un máximo de **5 veces**.

Después de realizar la preparación de la PCR con el instrumento:

- Sellar la microplaca **Q-PCRMicroplate** con un sello óptico.
- Verter el contenido de la microplaca **Q-PCR Microplate** en el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e iniciar la PCR. Guardar el archivo de la sesión con un nombre único y reconocible (p. ej., «año-mes-día-TARGET-EGSpA»).

NOTA!

Al finalizar la PCR, la microplaca **Q-PCR Microplate** debe desecharse conforme a los reglamentos estatales y medioambientales vigentes. Con el fin de evitar un derrame de los productos de PCR, el **sello óptico no debe retirarse de la microplaca Q-PCR Microplate**.

13.3 Configuración general para analizar los resultados

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

- Ajustar manualmente el rango de cálculo para el **punto de referencia** (nivel de fondo de fluorescencia) desde el ciclo 6 hasta el ciclo 15: «Results (Resultados) > Amplification plot (Gráfico de amplificación) > delta Rn vs Cycle» (Diferencias Rn vs ciclo).

NOTA!

La fluorescencia FAM de la sonda de VEB en una muestra con una alta concentración de ADN de VEB puede empezar a aumentar antes del ciclo 15. En este caso, reducir el rango de cálculo del **punto de referencia** al ciclo en el que la fluorescencia FAM de la muestra empieza a aumentar: «Results» (Resultados) > «Component» (Componente)».

- Configurar manualmente los umbrales para los detectores.

Configurar el **umbral** «EBV» para el detector FAM a **0,2**.

Configurar el **umbral** «IC» para el detector VIC a **0,1**.

El ciclo de PCR en el que el nivel de fluorescencia de una muestra alcanza el valor de **umbral** determina el **ciclo umbral (Ct)** de dicha muestra.

El software del instrumento analiza automáticamente los niveles de fluorescencia de los controles, de los calibradores y de las reacciones de la muestra y, después, calcula los valores de Ct.

13.4 Análisis cualitativo de los resultados

El valor de **Ct** de VEB del **Positive Control** se utiliza para validar la PCR. El procesamiento de la PCR es válido cuando los resultados son como los que describen en la tabla siguiente.

Tabla 32

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

Si el resultado del **Positive Control** es **Ct > 25** o**Ct Undetermined**para el detector FAM «EBV», la sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de PCR. Esto indica que es posible que se haya producido un problema durante la preparación de la PCR, en el paso de PCR o durante la detección (p. ej., distribución incorrecta o degradación de la mezcla Q-PCR Mix o del Positive Control, colocación incorrecta del Positive Control o configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

NOTA!

Cuando este producto se utiliza para la cuantificación de ADN de VEB, es necesario configurar las reacciones del calibrador **Q-PCR Standard** en lugar de la reacción del **Positive Control**. En este caso, es necesario validar la amplificación y la detección conforme a la reacción de amplificación del calibrador **Q - PCR Standard 10^5** (**Ct ≤ 25**).

El valor de Ct de VEB del **Negative Control** se utiliza para validar la PCR. El procesamiento de la PCR es válido cuando los resultados son como los que describen en la tabla siguiente.

Tabla 33

Reacción del Negative Control detector FAM «EBV»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Negative Control** es diferente de **Ct Undetermined** para el detector FAM «EBV», la sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de PCR. Esto puede indicar que se han producido problemas durante el paso de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos positivos.

El valor de **Ct** de VEB en cada muestra se utiliza para detectar el ADN diana, mientras que el valor de **Ct** del Internal Control se utiliza para validar la extracción, la PCR y la detección.

NOTA!

Utilizar el gráfico de amplificación en «Results (Resultados) > «Amplification plot» (Gráfico de amplificación) > «delta Rn vs Cycle» (Diferencias Rn vs ciclo) para verificar que el valor de Ct de cada muestra se haya determinado mediante un aumento rápido y uniforme de la fluorescencia y no mediante picos, o bien mediante un aumento en la señal de fondo (fondo irregular o alto).

Los posibles resultados de la muestra, que aparecen e «Results» (Resultados) > «Report» (Informe), se describen en la tabla siguiente:

Tabla 34

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado de la muestra del ensayo	ADN de VEB
Detector FAM «EBV»	Detector VIC «IC»			
Ct Undetermined	Ct >35 o Ct Undetermined	No idónea	no válido	-
	Ct ≤35	idónea	Válido, negativo	NO DETECTADO
Ct Determined	Ct >35 o Ct Undetermined	idónea	Válido, positivo	DETECTADO
	Ct ≤35	idónea	Válido, positivo	DETECTADO

Un resultado de la muestra de **Ct Undetermined** para VEB y de **Ct >35** o**CtUndetermined**para el Internal Control no es válido e indica la existencia de un problema durante la extracción de ácidos nucleicos o durante la PCR (p. ej., degradación del ADN de la muestra, reducción del título de ADN durante la extracción, presencia de inhibidores en el ADN, amplificación incorrecta o ausencia de amplificación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La muestra no es apta para el análisis y el ensayo debe repetirse con una nueva muestra a partir del paso de extracción de ácidos nucleicos.

Un resultado de la muestra de **Ct Undetermined** para VEB y de **Ct ≤35** para el Internal Control es un resultado válido e indica que no se ha detectado ADN de VEB en la muestra. Puede que la muestra no contenga ADN de VEB, o que solo contenga ADN de VEB a una concentración inferior al límite de detección del producto (consultar sección 14 «Características de rendimiento» page 42). Un resultado de la muestra de **Ct Determined (Ct ≤45)** para VEB y de **Ct 35**, **Ct Undetermined**, o **Ct ≤35** para el IC es un resultado válido e indica que se ha detectado ADN de VEB en la muestra.

NOTA!

Si se obtiene un resultado de **Ct Determined** para VEB y Ct >35 o**Ct Undetermined**para el IC, significa que la eficacia de la PCR del IC puede haberse visto afectada por la competencia con la alta eficacia de la PCR del ADN de VEB. En este caso, la muestra es apta y el resultado positivo es válido.

NOTA!

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

13.5 Análisis cuantitativo de los resultados

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

Tabla 35

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

Si el **coeficiente de correlación (R2)** no se encuentra dentro de los límites, la sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de PCR. Esto indica que es posible que se haya producido un problema durante el paso de PCR o de detección (p. ej., distribución incorrecta o degradación de la mezcla Q-PCR Mix o de los calibradores, colocación incorrecta de los calibradores, configuración incorrecta del ciclo térmico o contaminación cruzada), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Tabla 36

Resultado de la muestra para el detector FAM «EBV»	Copias de EBV por reacción
Cantidad > 1×10^6	MÁS DE 1×10^6
$1 \times 10^1 \leq$ cantidad $\leq 1 \times 10^6$	= cantidad
Cantidad < 1×10^1	MENOS DE 10

Los resultados (**cantidad**) de cada muestra, en «Results» (Resultados) > «Report» (Informe), se utilizan para calcular las copias de VEB presentes en la muestra utilizada en la extracción (**Nc**) según la siguiente fórmula:

Tabla 37

$$Nc = \frac{Ve \times cantidad}{(Vc \times Va \times Ep)}$$

donde:

Ve es el volumen total **en µL** de la muestra de ADN extraída (volumen de elución).

Cantidad es el valor cde **copias/reacción** de la muestra calculado por el software del instrumento (resultado de la PCR).

Vc es el volumen de la muestra utilizada para la extracción de ácidos nucleicos (volumen inicial) expresado en la unidad de medida requerida

Va es el volumen en **µL** de la muestra de ADN extraída (eluido) que se ha utilizado en el proceso de PCR.

Ep es la eficiencia del procedimiento (extracción y PCR), **expresada como un número decimal**.

Para convertir la cantidad de muestra de copias/mL a UI/mL, multiplicar el valor de copias/mL por el **factor de conversión (Fc)**. El Fc se calculó utilizando un material de referencia certificado y calibrado («Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de virus de Epstein-Barr (VEB)», NIBSC); consultar la sección 14 «Características de rendimiento» page 42.

Para mayor comodidad, a continuación se incluyen fórmulas simplificadas en las que se han calculado Ve/(Vc × Va × Ep) y su conversión a UI/mL.

Tabla 38

Matriz	Método de extracción de ácidos nucleicos	Ve/ (Vc × Va × Ep)	Fórmula para cuantificar Nc (copias/mL)	Fc (UI/copia)	Fórmula para cuantificar Nc (UI/mL)
Sangre	ELITe GALAXY	35	35 × cantidad	0,82	31,2 × cantidad

14 Características de rendimiento con el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

14.1 Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del ensayo cuando se utilizaron muestras de sangre se analizó en el ELITe GALAXY y el ABI 7500 Instrument, utilizando un panel de matrices negativas para VEB enriquecidas con material de referencia certificado de VEB («Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de virus de Epstein-Barr (VEB)», NIBSC, Reino Unido). Se realizó un análisis de regresión Probit en los resultados y el LoD se calculó como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

Tabla 39 Límite de detección con el ELITe GALAXY (UI/mL)

Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Sangre	**99 UI/mL**	57 UI/mL	376 UI/mL

El LoD expresado en copias/mL para cada matriz se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la sección 14.6 Conversión a unidades internacionales page 44.

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

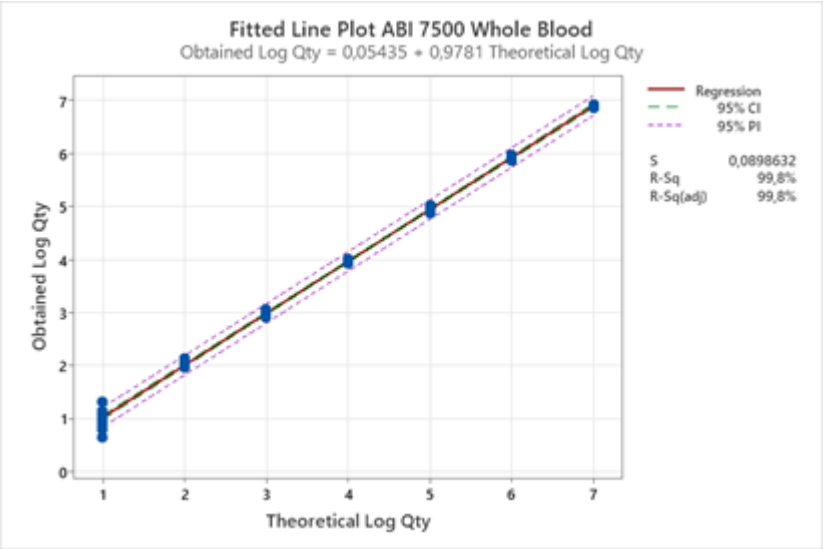
Tabla 40 Límite de detección con el ELITe GALAXY (copias/mL)

Matriz	Positividad del 95 %	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Sangre	**121 copias/mL**	70 copias/mL	459 copias/mL

14.2 Rango de medición lineal

El rango de medición lineal del ensayo se determinó con muestras de sangre en el **ELITe GALAXY** y el **ABI 7500** utilizando un panel de diluciones de un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación.

Los resultados obtenidos con muestras de sangre se muestran en el siguiente gráfico.



El rango de medición lineal, expresado en copias/mL, se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en la sección 14.6 Conversión a unidades internacionales page 44.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 41 Rango de medición lineal para muestras de sangre

Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
copias/reacción	**10**	**1.000.000**

14.3 Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La reactividad cruzada potencial de los microorganismos imprevistos que pueden encontrarse en muestras clínicas se evaluó mediante un análisis informático. El análisis no presentó ninguna homología reseñable con otros microorganismos imprevistos (virus, bacterias, protozoos y hongos) y, por lo tanto, no cabe esperar reactividad cruzada.

14.4 Repetibilidad

La repetibilidad dentro de las series del ensayo se evaluó en el ABI 7500 analizando un panel de muestras enriquecidas con un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación y una muestra negativa.

En la tabla siguiente se incluye un ejemplo de repetibilidad dentro de las series.

Tabla 42 Repetibilidad dentro de las series con el ABI 7500

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
10.000.000	9	15,16	0,11	0,70	100 %
1.000.000	9	18,52	0,14	0,75	100 %
100.000	9	21,93	0,21	0,94	100 %
10.000	9	25,21	0,09	0,35	100 %
1.000	9	28,50	0,19	0,67	100 %

Tabla 42 Repetibilidad dentro de las series con el ABI 7500 (continued)

100	9	31,88	0,23	0,72	100 %
10	9	35,42	0,70	1,97	100 %

En la prueba de repetibilidad, el producto EBV ELITe MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

14.5 Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo se evaluó en el ABI 7500 analizando un panel de muestras enriquecidas con un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación y una muestra negativa.

En la tabla siguiente se incluye un resumen de la reproducibilidad entre lotes (en cinco lotes).

Tabla 43 Reproducibilidad entre lotes con el ABI 7500

Muestra	VEB				
	N	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
50 000 copias/ reacción	15	23,45	0,3793	1,6172	100 %
5000 copias/ reacción	15	26,73	0,4545	1,7001	100 %
500 copias/ reacción	15	29,98	0,5477	1,8270	100 %
Negativas	15	-	-	-	100 %

En la prueba de reproducibilidad, el producto EBV ELITe MGB Kit detectó todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV inferior al 5 %.

14.6 Conversión a unidades internacionales

El factor de conversión para comunicar los resultados cuantitativos en unidades internacionales/mL a partir de copias/mL se calculó para sangre recogida en EDTA utilizando el material de referencia calibrado certificado del «Primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de virus de Epstein-Barr (VEB)» (NIBSC).

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 44 Factor de conversión a unidades internacionales con el ABI 7500 y muestras de sangre

Instrumento	Fc (UI copias)
ELITe GALAXY	**0,82**

14.7 Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó en el **ELITe GALAXY** y el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument analizando muestras certificadas como negativas para la diana.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 45 Especificidad diagnóstica

Muestras	N	positivas	negativas	% de especificidad diagnóstica
Sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de VEB	52	2	50	96,1

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

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la eficacia 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 de VEB, mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

14.9 Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó en el **ELITe GALAXY** y el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument analizando muestras certificadas como positivas para la diana.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 46

Muestras	N	positivas	negativas	% de sensibilidad diagnóstica
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de VEB	54	54	0	100

NOTA!

Los datos y resultados completos de los análisis realizados para la evaluación de las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se recogen en la documentación técnica del producto **EBV ELITe MGB Kit**, ref. FTP 020PLD.

15 BIBLIOGRAFÍA

S. W. Aberle et al. (2002) *J Clin Virology* 25: S79 - S85

C. N. Kotton et al. (2018) *Transplantation* 02: 900 - 931

K. Linnet et al. (2004) Clin. Chem. 50: 732–740

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

16 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con las siguientes muestras clínicas: sangre recogida en EDTA (todos los instrumentos) y plasma recogido en EDTA (solo ELITe InGenius y ELITe BeGenius).

En la actualidad, no se dispone de datos del rendimiento de este producto con otras muestras clínicas, como suspensiones de leucocitos o suspensiones de granulocitos.

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

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

No utilizar con este producto ADN extraído que esté contaminado con hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol o 2-propanol, pues estas sustancias inhiben la reacción de amplificación de los 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 ácidos nucleicos.

No se dispone de datos sobre la inhibición provocada por antivíricos, antibióticos, antineoplásicos o inmunodepresores.

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

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

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

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

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

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

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

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que no se ha detectado ADN de la diana en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de la diana presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «11 Características de rendimiento del ELITe InGenius y del ELITe BeGenius page 24»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

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

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

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

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

17 PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ELITe InGenius y ELITe BeGenius

Tabla 47

Reacción no válida del calibrador Q-PCR-Standard, de la curva de calibración o del Positive Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la mezcla Q-PCR Mix, así como la de los calibradores Q-PCR-Standard y la del Positive Control. Comprobar el volumen de la mezcla Q-PCR Mix, así como el de los calibradores Q-PCR-Standard y el del Positive Control.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	No utilizar la Q-PCR Mix durante más de 5 sesiones independientes: 3 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la Q-PCR Mix durante más de 3 sesiones consecutivas: 7 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la Q-PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la mezcla Q-PCR Mix.
Degradación de los calibradores Q-PCR-Standard o del Positive Control.	No utilizar el Q-PCR Standard para más de 4 sesiones independientes: 2 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit». No utilizar el Positive Control para más de 4 sesiones independientes: 3 horas cada una en el área de extracción o en la «Cooler Unit». Utilizar nuevas alícuotas de los calibradores Q-PCR-Standard o del Positive Control.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 48

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la Q-PCR Mix y del Negative Control. Comprobar el volumen de la Q-PCR Mix y el del Negative Control.
Contaminación del Negative Control.	No utilizar el Negative Control para más de 1 sesión. Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular.
Contaminación de la PCR Mix.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla Q-PCR Mix.
Contaminación del área de extracción, de las gradillas, del «Inventory Block» (administrador de inventarios) o de la «Cooler Unit».	Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir los probetas y las puntas que se hayan utilizado.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 49

Reacción no válida de la muestra	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la Q-PCR Mix, la del Internal Control y la de la muestra. Comprobar el volumen de la Q-PCR Mix, el del Internal Control y el de la muestra.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	No utilizar la Q-PCR Mix durante más de 5 sesiones independientes: 3 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la Q-PCR Mix durante más de 3 sesiones consecutivas: 7 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la Q-PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la mezcla Q-PCR Mix.
Degradación de la plantilla del Internal Control.	Utilizar una nueva alícuota del Internal Control.
Inhibición debida a la presencia de sustancias interferentes en la muestra.	Repetir la amplificación de la muestra eluida con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Repetir la extracción de la muestra con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Tabla 50

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

Tabla 51

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

Tabla 52

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

Plataforma abierta

Tabla 53

Reacción no válida del calibrador Q-PCR-Standard, de la curva de calibración o del Positive Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Comprobar el volumen de la mezcla PCR Mix, así como el de los calibradores Q-PCR-Standard y el del Positive Control, que se han distribuido en la Q-PCR Microplate.
Degradación de la Q-PCR Mix (mezcla de Q-PCR).	No congelar y descongelar la PCR Mix más de 5 veces. No dejar la Q-PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la mezcla Q-PCR Mix.
Degradación de los calibradores Q-PCR-Standard o del Positive Control.	No congelar y descongelar el calibrador Q-PCR Standard más de 4 veces. Utilizar nuevas alícuotas de los calibradores Q-PCR-Standard o del Positive Control.
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la mezcla Q-PCR Mix, así como la de los calibradores Q-PCR-Standard y la del Positive Control en el instrumento. Comprobar la configuración del ciclo térmico en el instrumento.

Tabla 54

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la Q-PCR Mix y del Negative Control. Comprobar el volumen de la Q-PCR Mix y el del Negative Control.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Tener cuidado al sellar la microplaca Q-PCR Microplate con el sello óptico.

Tabla 54 (continued)

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Contaminación del Negative Control.	No utilizar el Negative Control para más de 1 sesión. Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular.
Contaminación de la PCR Mix.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla Q-PCR Mix.
Contaminación del área de preparación de los racks y de la micropipeta	Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.

Tabla 55

Reacción no válida de la muestra	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la Q-PCR Mix, la del Internal Control y la de la muestra. Comprobar el volumen de la Q-PCR Mix, el del Internal Control y el de la muestra.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	No congelar y descongelar la PCR Mix más de cinco veces. No dejar la Q-PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la mezcla Q-PCR Mix.
Degradación de la plantilla del Internal Control.	Utilizar una nueva alícuota del Internal Control.
Inhibición debida a la presencia de sustancias interferentes en la muestra.	Repetir la amplificación de la muestra eluida con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra. Repetir la extracción de la muestra con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular.

Tabla 56

Fluorescencia de fondo irregular o alto en las reacciones	
Posibles causas	**Soluciones**
Distribución incorrecta de la muestra.	Comprobar los volúmenes de los reactivos y de las muestras que se han distribuido en la placa de Q-PCR.
Error de configuración del punto de referencia.	Si el rango de cálculo para la línea de referencia establecida desde el ciclo 6 hasta el ciclo 15 no es adecuado para normalizar el fondo, definir el rango de cálculo dentro de ciclos en los que la fluorescencia de fondo ya se haya estabilizado y la fluorescencia objetivo no haya empezado a aumentar; consulte «Results» (Resultados) > «Component» (Componente).

Tabla 57

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

18 SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo.
	Límite superior de temperatura.
LOT	Código de lote.
	Fecha de caducidad (último día del mes).
IVD	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*.
CE 0123	Cumple los requisitos del Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Certificación emitida por la TÜV SÜD Product Service GmbH, Alemania.
UDI	Identificador único del producto
	Contenido suficiente para <<N>> análisis.
	Consulte las instrucciones de uso
CONT	Contenido.
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Fabricante.

19 NOTA PARA LOS USUARIOS

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante y a las autoridades competentes del Estado miembro en el que resida el usuario o el paciente. En el momento de la revisión actual de las instrucciones de uso, no se había producido ningún incidente grave ni ninguna retirada relacionada con el rendimiento del producto o la seguridad del dispositivo.

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

20 AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

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

Los reactivos de detección ELITe MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, así como por las patentes europeas 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 y por solicitudes de patentes pendientes en la actualidad.

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

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

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, el logotipo de ELITe MGB® logo, ELITe InGenius® y ELITe BeGenius® son marcas registradas de ELITechGroup en la Unión Europea.

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

ATENCIÓN

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

Uso previsto

El producto **EBV ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cuantitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la detección y la cuantificación de **ADN de virus de Epstein-Barr (VEB)** extraído de muestras clínicas.

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

El ensayo también se ha validado con el **ELITe GALAXY**, que es un sistema automático de extracción y preparación de PCR, y con el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, una plataforma de PCR en tiempo real, utilizando muestras de sangre recogida en EDTA.

El producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico de infecciones por virus de Epstein-Barr (VEB) en pacientes en los que se sospecha la presencia de alguna infección por VEB y en el seguimiento en pacientes que tienen que someterse al tratamiento de una infección por VEB.

Los resultados deben interpretarse en combinación con todas las observaciones clínicas pertinentes del paciente así como los resultados de otras pruebas de laboratorio.

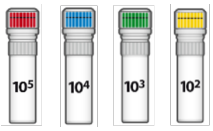
Secuencia amplificada

Secuencia	**Gen**	**Fluoróforo**	**Canal**
Diana	**Gen EBNA-1**	FAM	VEB
Internal Control	**Promotor y región 5' UTR** del **gen de la globina beta humana**	AP525	IC

Matriz validada

- Sangre recogida en EDTA
- Plasma recogido en EDTA

Contenido del kit y productos relacionados

EBV ELITe MGB Kit	EBV ELITe Standard	EBV - ELITe Positive Control
X 4	 X 2	X 2
PCR Mix lista para el uso 4 probetas de 540 µL 96 reacciones por kit 5 ciclos de congelación/ descongelación	4 niveles listos para el uso: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 conjuntos de 4 probetas de 200 µL 4 ciclos de congelación/descongelación	PC listo para el uso 2 probetas de 160 µL 8 reacciones por kit 4 ciclos de congelación/ descongelación

Período de estabilidad máximo: **24 meses**

Temperatura de almacenamiento: **−20 °C**

Otros productos necesarios no proporcionados con el kit

- Instrumento ELITe InGenius: INT030.
- Instrumento ELITe BeGenius: INT040.
- ELITe InGenius SP 200: INT032SP200.
- ELITe InGenius SP1000: INT033SP1000
- ELITe InGenius SP 200 Consumable Set: INT032CS.
- ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR.
- ELITe InGenius Waste Box: F2102-000.
- CPE - Internal Control: CTRCPE
- 300 µL Filter Tips Axigen: TF-350-L-R-S.
- 1000 µL Filter Tips Tecan: 30180118.

Protocolos ELITe InGenius y ELITe BeGenius

› Volumen de la muestra › Volumen del CPE › Volumen total de elución:	200 µL (InGenius y BeGenius) o 1000 µL (solo InGenius) 10 µL 100 µL	› Volumen inicial de PCR del eluido › Volumen de la Q-PCR Mix › Frecuencia de los controles	20 µL 20 µL 15 días

Rendimiento del ELITe InGenius y de ELITe BeGenius

Matriz	Límite de detección		Sensibilidad diagnóstica	Especificidad diagnóstica
	UI/mL	copias/mL		
Sangre	104	36	98,5 %	97,3 %
Plasma (volumen de la muestra de 200 µL):	124	65	98,9 %	98,3 %
Plasma (volumen de la muestra de 1000 µL, solo InGenius):	18	11		

Preparación de la muestra

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

Tipo de muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		de +16 °C a +26 °C (temperatura ambiente)	de +2 °C a +8 °C	−20 °C ±10 °C	−70 °C ±15 °C
Sangre	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d
Plasma	EDTA	≤1 d	≤3 d	≤30 d	≤30 d

d: días; EDTA: ácido edético

Procedimientos con el ELITe InGenius

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

Antes del análisis

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

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

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	**2.** Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL» o «1000 µL», elución: «100 µL»	**3.** Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): EBV ELITe_WB_200_100 o EBV ELITe_PL_200_100 o EBV ELITe_PL_1000_100	**5.** Seleccionar el método «Extract + PCR» (Extracción + PCR) y la posición de la muestra: Probeta primaria o «Extraction Tube» (Tubo de extracción)	**6.** Cargar la he PCR Mix y el Internal Control en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7. Cargar: Cargar el PCR Cassette, el cartucho de extracción, la «Elution Tube» (Tubo de elución), las puntas y las gradillas de muestras primarias.	**8.** Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**9.** Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

NOTA!

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

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

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	**2.** Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL» o «1000 µL», elución: «100 µL»	**3.** Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): EBV ELITe_PC y EBV ELITe_NC, o EBV ELITe_STD, o EBV ELITe_PL_200_100 or EBV ELITe_PL_1000_100, o EBV ELITe_WB_200_100.	**5.** Seleccionar el método «PCR Only» (Solo PCR) y establecer la posición de la muestra «Elution Tube» (Tubo de elución).	**6.** Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7. Cargar: El PCR Cassette y la rejilla de la «Elution Tube» (Tubo de elución) con el ácido nucleico extraído.	**8.** Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**9.** Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

Procedimientos con el ELITe BeGenius

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

Antes del análisis

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

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

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil y, a continuación, hacer clic en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	**2.** Insertar la «Sample Rack» (Rack de muestras) con las muestras dotadas de códigos de barras en la «Cooling Unit» (unidad de refrigeración). El escaneado de códigos de barras ya está activo.	**3.** Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL», «Eluate» (Eluido): «100 µL»
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo). EBV ELITe_Be_WB_200_100 o EBV ELITe_Be_PL_200_100 o **Nota:** Si es necesario llevar a cabo una segunda extracción, repetir los pasos del 2 al 4.	**5.** Imprimir las etiquetas para incluir el código de barras correspondiente en las probetas de elución vacías. Cargar las probetas en la «Elution Rack» (rejilla de elución) e insertarla en la «Cooler Unit»	**6.** Cargar el PCR Mix y el Internal Control en la «Reagent Rack/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) e insertarla en la «Cooler Unit»
7. Cargar la «PCR Rack» (rejilla de PCR) con el «PCR Cassette» y la «Extraction Rack» (rejilla de extracción), con los cartuchos de extracción «ELITe InGenius SP 200» y los consumibles que se necesitan para la extracción.	**8.** Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**9.** Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

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

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

1. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla táctil.	**2.** Verificar los volúmenes de extracción. «Input»: «200 µL»; «Elution» (Elución): «100 µL»	**3.** Escanear los códigos de barras de las muestras con el lector de códigos de barras manual, o bien introducir directamente el ID de la muestra.
4. Seleccionar el protocolo deseado en «Assay Protocol» (Protocolo de ensayo): EBV ELITe_Be_PC y EBV ELITe_Be_NC, o EBV ELITe_Be_STD.	**5.** Seleccionar el método «PCR Only» (Solo PCR) y establecer la posición de la muestra «Elution Tube» (Tubo de elución).	**6.** Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios).
7. Cargar: El PCR Cassette y la rejilla de la «Elution Tube» (Tubo de elución) con el ácido nucleico extraído.	**8.** Cerrar la puerta. Iniciar la sesión de procesamiento.	**9.** Consultar, aprobar y almacenar los resultados.

Appendix B EBV ELITe MGB Kit obtenida con el ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument

ATENCIÓN

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

Uso previsto

El producto **EBV ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cuantitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la detección y la cuantificación de **ADN de virus de Epstein-Barr (VEB)** extraído de muestras clínicas.

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

El ensayo también se ha validado con el **ELITe GALAXY**, que es un sistema automático de extracción y preparación de PCR, y con el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, una plataforma de PCR en tiempo real, utilizando muestras de sangre recogida en EDTA.

El producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico de infecciones por virus de Epstein-Barr (VEB) en pacientes en los que se sospecha la presencia de alguna infección por VEB y en el seguimiento en pacientes que tienen que someterse al tratamiento de una infección por VEB.

Los resultados deben interpretarse en combinación con todas las observaciones clínicas pertinentes del paciente así como los resultados de otras pruebas de laboratorio.

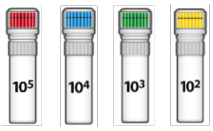
Secuencia amplificada

Secuencia	**Gen**	**Fluoróforo**	**Canal**
Diana	**Gen EBNA-1**	FAM	VEB
Internal Control	**Promotor y región 5' UTR** del **gen de la globina beta humana**	AP525	IC

Matriz validada

- Sangre recogida en EDTA

Contenido del kit y producto relacionado

EBV ELITe MGB Kit	EBV ELITe Standard	EBV - ELITe Positive Control
X 4	 X 2	X 2
PCR Mix lista para el uso 4 probetas de 540 µL 100 reacciones por kit 5 ciclos de congelación/ descongelación	4 niveles listos para el uso: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 conjuntos de 4 probetas de 200 µL 8 ciclos de congelación/descongelación	PC listo para el uso 2 probetas de 160 µL 12 reacciones por kit (Galaxy) 8 ciclos de congelación/ descongelación

Período de estabilidad máximo: **24 meses**

Temperatura de almacenamiento: **−20 °C**

Otros productos necesarios no proporcionados con el kit

- **ELITe GALAXY** INT020
- **Kit de extracción ELITe GALAXY 300:** INT021EX
- **ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**
- CPE - Internal Control: CTRCPE
- Agua para biología molecular

Rendimiento del 7500 Real-Time PCR Instrument

Matriz	Límite de detección	Especificidad diagnóstica	Sensibilidad diagnóstica	Linealidad (copias/mL)	Fórmula para cuantificar (copias/mL)	Factor de conversión copias/mL a UI/mL
Sangre	**99 UI/mL** 121 copias/mL	**96,1 %** (50/52)	**100 %** (54/54)	10 →1 × 10^6	35 × cantidad	0,82

Procedimientos con el 7500 Real-Time PCR Instrument

El procedimiento que se describe a continuación resume los principales pasos del análisis de muestras con el flujo de trabajo de la PCR convencional: sistemas de extracción validados, configuración de los instrumentos de PCR, configuración de la PCR e interpretación de los resultados.

Extracción - Sistemas validados

Extracción	Matriz validada	Volumen de muestra procesado	Volumen mínimo de muestra	Volumen total de eluido	Volumen del Internal Control de CPE
ELITe GALAXY	WB	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL

Amplificación - Configuración del 7500 Fast Dx

1. Encender el termociclador
2. Configurar el detector «EBV» con «FAM» y el inhibidor «none»
3. Configurar el detector «Internal Control» con «VIC» y el inhibidor «none»
4. Configurar la fluorescencia pasiva como «Cy5»

5. Configurar el perfil térmico de la manera indicada. La adquisición de fluorescencia debe ajustarse durante el paso de hibridación a 60 °C

Fase	Temperatura	Tiempo
Descontaminación	50 °C	2 min
Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
Amplificación Detección 45 ciclos	94 °C	10 seg
	60 °C	30 seg
	72 °C	20 seg

El análisis de la curva de fusión es opcional; consultar las instrucciones de uso completas.

Amplificación - Configuración de la PCR (realizada por el ELITe GALAXY)

Para configurar la sesión de PCR, proceder del modo siguiente:

1. Descongelar las probetas de Q-PCR-Mix y de Positive Control/Q-PCR Standard
2. Mezclar suavemente y, después, centrifugar.
3. Preparar el **Negative Control** (no incluido)
4. Preparar una microplaca **Q-PCR Microplate**
5. El instrumento realiza automáticamente la preparación de la PCR distribuyendo en cada pocillo de la microplaca **Q-PCR Microplate 20 µL** de **PCR Mix** y **20 µL** de **DNA extraído**/**Q-PCR Standard**/**controles**.

Después de realizar la preparación de la PCR con el instrumento:

1. Sellar la microplaca **Q-PCR Microplate** con un sello óptico.
2. Verter el contenido de la microplaca **Q-PCR Microplate** en el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** e iniciar la PCR. Guardar el archivo de la sesión con un nombre único y reconocible (p. ej., «año-mes-día-TARGET-EGSpA»).

Amplificación- Umbral para el análisis cualitativo

Instrumento	FAM de VEB	VIC del Internal Control
7500 Fast Dx Real Time PCR	0,2	0,1

Interpretación

Resultados cualitativos		
Valor Ct del VEB	**Valor Ct del Internal Control**	**Interpretación**
Determinado	—	Positivas
No determinado	Ct ≤35	Negativas
	Ct >35 o Undetermined	No válido*

**Repetir el ensayo a partir del paso de extracción*

Resultados cuantitativos
El valor de Ct de VEB obtenido para cada muestra y la curva de calibración generada se utilizan para calcular la cantidad de ADN diana en la reacción.
Los rangos de cuantificación de la muestra oscilan entre aproximadamente 10 y 10^6 copias/reacción.

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