



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

Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 28/10/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HSV2 ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTS032PLD

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

- Update for the use of the product for CSF matrix in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040);
- Internal Control Ct cut-off update in association with «ELITe InGenius[®]» (REF INT030) and «ELITe BeGenius[®]» (REF INT040)

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



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



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



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



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



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



DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



HSV2 ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

USO PREVISTO

El producto «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» es una parte de un ensayo cualitativo y cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos para la **detección y cuantificación de ADN de virus del herpes simple tipo 2 (VHS2)** en muestras de ADN extraídas de líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre recogida en EDTA o plasma recogido en EDTA.

El producto se utiliza para el diagnóstico y la monitorización de infecciones por el VHS2 junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

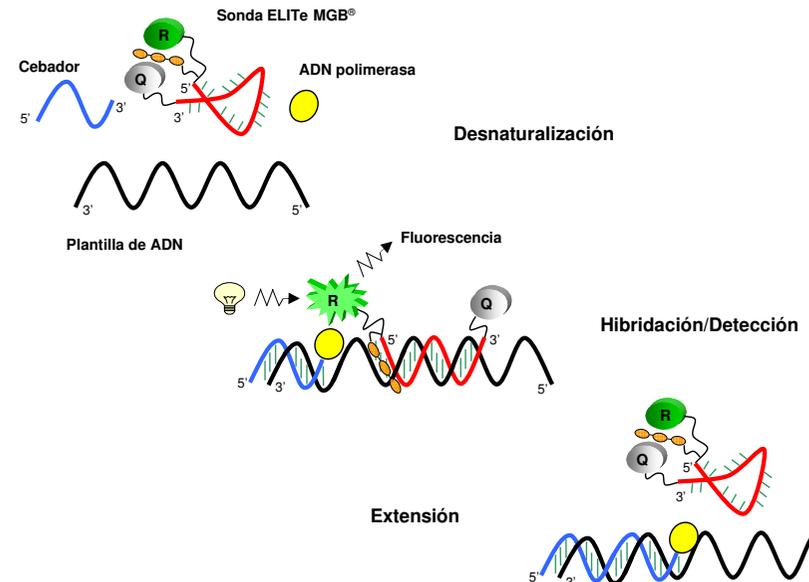
El ensayo consiste en una reacción de amplificación en tiempo real con un termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia (termociclador de amplificación en tiempo real).

En cada pocillo se realizan dos reacciones de amplificación a partir del ADN extraído de las muestras que se están analizando: una reacción específica para una región de la **glucoproteína G (gpG)** del VHS2 y una reacción específica para una región del **gen de la globina beta humana** (Internal Control de inhibición). La sonda específica del VHS2 con la tecnología ELITE MGB®, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del VHS2. La sonda específica del Internal Control con la tecnología ELITE MGB®, marcada con el fluoróforo AP525 (análogo al VIC), se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación para el Internal Control. A medida que aumenta el producto específico de la reacción de amplificación, la emisión de fluorescencia también aumenta y el instrumento la mide y la registra. El procesamiento de los datos permite detectar la presencia y el título de ADN de VHS2 en la muestra inicial.

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

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

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



HSV2 ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS032PLD



ÍNDICE

USO PREVISTO
PRINCIPIOS DEL ENSAYO
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO
MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO
MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO
OTROS PRODUCTOS NECESARIOS
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

ELITE InGenius
MUESTRAS Y CONTROLES
PROCEDIMIENTO
ELITE BeGenius
MUESTRAS Y CONTROLES
PROCEDIMIENTO
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL ELITE InGenius y del ELITE BeGenius

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System
MUESTRAS Y CONTROLES
PROCEDIMIENTO
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Roche cobas z 480 analyzer
MUESTRAS Y CONTROLES
PROCEDIMIENTO
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

BIBLIOGRAFÍA
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
PROBLEMAS Y SOLUCIONES
SÍMBOLOS
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

página 2
página 2
página 3
página 3
página 3
página 5

página 6
página 6
página 8
página 16
página 16
página 17
página 23

página 33
página 33
página 35
página 44

página 49
página 49
página 50
página 55

página 58
página 59
página 60
página 62
página 63

HSV2 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS032PLD

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**HSV2 ELITE MGB Kit**» incluye la mezcla completa «**HSV2 Q - PCR Mix**» lista para el uso para la amplificación en tiempo real en una solución estabilizadora, dividida en cuatro probetas desechables. Cada probeta contiene 540 µL de solución, suficiente para 24 análisis cuando se utilizan los sistemas «**ELITE InGenius®**» y «**ELITE BeGenius®**», o bien 25 análisis cuando se utilizan otros sistemas.

Los cebadores y la sonda específica del VHS2 (estabilizados con el grupo MGB®, marcados con el fluoróforo FAM e inactivados con una molécula no fluorescente) son específicos de una región de la gpG del VHS2 (región US4).

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

La mezcla de reacción incluye solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos, el fluoróforo AP593 (utilizado en lugar del ROX o el CY5) como referencia pasiva para la normalización de la fluorescencia, la enzima N-uracil glucosidasa (UNG) para inactivar la contaminación generada por la amplificación del producto y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot-start»).

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

El producto es suficiente para 100 análisis cuando se utilizan otros sistemas, inclusive los calibradores y los controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
HSV2 Q - PCR Mix	Mezcla completa de reacción	4x540 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex.
- Microcentrifugadora de mesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosol o de dispensación positiva (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Agua para biología molecular.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de fluorescencia «7300 Real Time PCR System» o «7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument», calibrados conforme a las instrucciones del fabricante.
- Termostato programable con sistema de detección óptica de fluorescencia cobas z 480 analizador, calibrado conforme a las instrucciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

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

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

HSV2 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS032PLD

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

- para los calibradores, «**HSV2 ELITE STD**»,
- para el control positivo de amplificación, «**HSV2 ELITE_PC**»,
- para el control negativo de amplificación, «**HSV2 ELITE_NC**»,
- para el análisis de las muestras, «**HVS2 ELITE_WB_200_100**», «**HSV2 ELITE_PL_200_100**» y «**HSV2 ELITE_CSF_200_100**».

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

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

- para los calibradores, «**HSV2 ELITE_Be_STD**»,
- para el control positivo de amplificación, «**HSV2 ELITE_Be_PC**»;
- para el control negativo de amplificación, «**HSV2 ELITE_Be_NC**»;
- para el análisis de las muestras, «**HSV2 ELITE_Be_WB_200_100**», «**HSV2 ELITE_Be_PL_200_100**» y «**HSV2 ELITE_Be_CSF_200_100**».

Para la extracción automática del ADN de las muestras que van a analizarse, se ha validado el uso del producto genérico «**ELITE STAR 200 Extraction kit**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT011EX), que es un kit para la extracción de ADN y ARN a partir de muestras no celulares y celulares con el instrumento «**ELITE STAR**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT010).

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

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

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

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

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

Si se utiliza un «7300 Real-Time PCR System», es necesario utilizar el producto genérico «**MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate**» (Life Technologies, ref. N8010560), que contiene microplacas con pocillos de 0,2 mL y placas selladoras adhesivas para la amplificación en tiempo real.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

Para el uso de un instrumento de PCR en tiempo real 7500 Fast Dx, se requiere el uso del producto genérico: «**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 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.

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

Si se necesita una detección de ADN de VHS2 para un análisis cualitativo, es preciso utilizar el producto «**HSV2 - ELITe Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR032PLD) o el producto «**HSV2 - ELITe Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR032PLD-R), que contiene el control positivo del ADN plasmídico.

Si se necesitan una detección y una cuantificación de ADN de VHS2 para un análisis cuantitativo, es preciso utilizar el producto «**HSV2 ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD032PLD), que contiene cuatro diluciones de ADN plasmídico en cantidad conocida para obtener la curva de calibración.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado para uso *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

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

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

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.

Antes de realizar el ensayo, leer atentamente todas las instrucciones proporcionadas con el producto.

Seguir las instrucciones proporcionadas con el producto para realizar el ensayo.

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

Utilizar únicamente los reactivos que se suministran con el producto y los recomendados por el fabricante.

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

Con el fin de evitar el riesgo de resultados incorrectos, sobre todo debido a la degradación de los ácidos nucleicos de las muestras o a la contaminación de estas con productos de amplificación, los procedimientos de biología molecular, como la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, deben correr a cargo de personal debidamente formado y cualificado.

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

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

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

Las muestras deben utilizarse exclusivamente para este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. No abrir al mismo tiempo probetas que contengan muestras diferentes. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben ser destinadas exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o ser utilizadas 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 ser destinadas exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o ser utilizadas con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de amplificación deben manipularse reduciendo en la medida de lo posible la dispersión hacia el entorno. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de amplificación deben destinarse exclusivamente a dicho propósito.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes

La mezcla «**HSV2 Q - PCR Mix**» debe conservarse a -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La mezcla **HSV2 Q - PCR Mix** debe utilizarse en el plazo de un mes una vez abierto.

La mezcla «**HSV2 Q - PCR Mix**» puede congelarse y descongelarse hasta **cinco veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

ELITe InGenius

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre para la extracción de ADN deben recogerse en EDTA e identificarse de acuerdo con las prácticas para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de 200 µL de sangre se realiza con el **ELITe InGenius** y la versión 1.3 del **ELITe InGenius software** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción «**HSV2 ELITe_WB_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de los ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA de acuerdo con las directrices del laboratorio, así como transportarse a +2/+8 °C y almacenarse a +2/+8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y almacenarse a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de 200 µL de plasma se realiza con el **ELITe InGenius** y la versión 1.3 del **ELITe InGenius software** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción **HSV2 ELITe_PL_200_100**. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Las muestras de LCR para la extracción de ADN deben recogerse de acuerdo con las directrices para laboratorios, evitando su contaminación con sangre del paciente, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cuatro horas; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de LCR se realiza con el **ELITE InGenius** y la versión 1.1 del **ELITE InGenius software** (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de extracción «**HSV2 ELITE CSF_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control CPE a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Otras muestras

En la actualidad, no se dispone de datos sobre el rendimiento de este producto con otras muestras clínicas, como leucocitos, suspensiones de granulocitos y líquido amniótico.

Sustancias interferentes

La muestra no debe contener heparina, para evitar el problema de inhibición y el riesgo de resultados no válidos frecuentes.

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 antiviricos, antibióticos, antineoplásicos o inmunodepresores.

Calibradores de amplificación y controles de amplificación

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

Como conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del producto «**HSV2 ELITE Standard**» junto con el protocolo «**HSV2 ELITE STD**».

Como Positive Control de amplificación, utilizar el producto «**HSV2 - ELITE Positive Control**» junto con el protocolo «**HSV2 ELITE PC**».

Como Negative Control de amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit) junto con el protocolo «**HSV2 ELITE NC**».

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

Las curvas de calibración, aprobadas y guardadas en la base de datos, caducan **a los 60 días**. Al llegar la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar los calibradores «Q-PCR Standard» con el lote de reactivos de amplificación.

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

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

- 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 el instrumento.

Controles de calidad

Se recomienda validar periódicamente todo el procedimiento de extracción y amplificación. Se pueden utilizar muestras ya analizadas o material de referencia certificado. Se deben realizar controles de calidad externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda.

PROCEDIMIENTO CON EL ELITE InGenius

El uso del producto «**HSV2 - ELITE MGB® Kit**» con el sistema **ELITE InGenius** comprende tres pasos:

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

Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el **ELITE InGenius** y seleccionar el modo «**CLOSED**».

Verificar que los calibradores («**HSV2 Q-PCR Standard**») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («Status»). Esto se puede comprobar en el menú «Calibration» de la página «Home».

Verificar que los controles de amplificación («**HSV2 Positive Control**» y «**HSV2 Negative Control**») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («Status»). Esto se puede comprobar en el menú «Control» de la página «Home».

- Elegir el tipo de sesión y configurarla, siguiendo las instrucciones de la interfaz para la configuración de la sesión y utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits y matrices **ELITE MGB** y el instrumento **ELITE InGenius**.

Los protocolos de ensayo disponibles para el análisis de muestras con el producto «**HSV2 ELITE MGB Kit**» se describen en la tabla siguiente:

Protocolos de ensayo para el producto HSV2 ELITE MGB Kit			
Nombre	Matriz	Informe	Características
HSV2 ELITE MGB kit_WB_200_100	Sangre	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV2 ELITE MGB kit_PL_200_100	Plasma	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV2 ELITE MGB kit_CSF_200_100	LCR	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

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

Los protocolos para el análisis cualitativo están disponibles bajo petición.

Configuración de la sesión

El producto «**HSV2 ELITE MGB Kit**» puede utilizarse en combinación con el **ELITE InGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
- B. Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
- C. Sesión de calibración (modo de procesamiento «PCR Only»).
- D. Sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control (modo de procesamiento «PCR Only»).

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

Nota: el ELITe InGenius puede conectarse al sistema de información de laboratorios (LIS, «Laboratory Information System»), que permite cargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar el manual de usuario del instrumento.

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

A. Sesión integrada

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

1. Descongelar las muestras a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y manipular según las directrices para laboratorios y conforme a las indicaciones de la sección «Muestras y controles».
2. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: proteger la mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

3. Descongelar las probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
4. Seleccionar «Perform Run» desde «Home».
5. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
6. Para cada carril deseado, introducir el ID de la muestra («SampleID» o SID), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.
7. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «HSV2 ELITe_WB_200_100»).
8. Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» sea «Extract + PCR».
9. En la columna «Sample Position», seleccionar la posición de carga de la muestra.
Si se utiliza una probeta primaria, seleccionar «Primary Tube».
si se utiliza una probeta secundaria, seleccionar «Sonication Tube».
Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar el CPE y la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», los cartuchos de extracción «ELITe InGenius SP 200», todos los consumibles necesarios y las muestras que van a extraerse en las posiciones indicadas en el paso 8 siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez 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 muestra extraída puede extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «PCR Cassette» con los productos de reacción y el resto de consumibles deben desecharse conforme a los reglamentos estatales y medioambientales vigentes. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: Al finalizar la sesión, la mezcla de PCR puede mantenerse en el bloque refrigerado hasta 16 horas.

B. Sesión de amplificación

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: proteger la mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
4. Para cada «Track» deseado, introducir el «SampleID» (SID) tecleando o escaneando el código de barras de la muestra.
5. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «HSV2 ELITe_WB_200_100»).
6. En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
7. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra del eluido en la columna «Sample Position» sea «ExtraTube» (fila inferior). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos «PCR Cassette» y las muestras del ácido nucleico extraído siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez 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 muestra extraída puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «PCR Cassette» y los consumibles deben eliminarse siguiendo las normativas gubernamentales y medioambientales. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: Al finalizar la sesión, la mezcla de PCR puede mantenerse en el bloque refrigerado hasta 16 horas.

C. Sesión de calibración

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: proteger la mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar las probetas de calibrador «HSV2 Q - PCR» (Cal1: HSV2 Q - PCR Standard 10², Cal2: HSV2 Q - PCR Standard 10³, Cal3: HSV2 Q - PCR Standard 10⁴, Cal4: HSV2 Q - PCR Standard 10⁵). Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
5. Comenzando por el carril deseado, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «HSV2 ELITE STD») y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del calibrador «HSV2 Q - PCR Standard». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
6. Cargar la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
7. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar las probetas del calibrador y los cartuchos «PCR Cassette» siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración. Asegurarse de cargar los líquidos del «PCR Standard» en los carriles correctos, tal como se indica en la interfaz.
9. Cerrar la puerta del instrumento.
10. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, los calibradores pueden extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C.

Nota: los calibradores pueden utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «PCR Cassette» y el resto de consumibles deben desecharse conforme a los reglamentos estatales y medioambientales vigentes. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: Al finalizar la sesión, la mezcla de PCR puede mantenerse en el bloque refrigerado hasta 16 horas.

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

Para configurar las sesiones del Positive Control y del Negative Control de amplificación, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: proteger la mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar el producto «HSV2 - Positive Control» para la amplificación del Positive Control. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter por lo menos 50 µL de agua para biología molecular para las sesiones en una de las probetas de elución incluidas en el kit «InGenius SP Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. En el carril deseado, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
6. Para el control positivo, seleccionar «HSV2 ELITE_PC» para el control positivo y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control de VHS2.
7. Para el control negativo, seleccionar «HSV2 ELITE_NC» y rellenar el código de lote y la fecha de caducidad del agua para biología molecular.
8. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar el cartucho «PCR Cassette» de amplificación, el Positive Control o el Negative Control de amplificación siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: el Positive Control debe procesarse como control de amplificación para poder configurar el gráfico de control. Para configurar el gráfico, se necesitan cuatro (4) valores del Positive Control de 4 sesiones distintas. Después de esto, los valores del Positive Control se utilizan para monitorizar el paso de amplificación. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso.

Nota: al finalizar la sesión, el Positive Control puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

Nota: el Positive Control puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

Nota: al finalizar la sesión, los cartuchos «PCR Cassette» y el resto de consumibles deben desecharse conforme a los reglamentos estatales y medioambientales vigentes. Evitar derramar los productos de reacción.

Nota: La mezcla de PCR se puede conservar en el bloque refrigerado hasta 16 horas.

Revisión y aprobación de los resultados

El ELITe InGenius supervisa las señales de fluorescencia de la diana y del control interno para cada reacción y aplica automáticamente los parámetros del protocolo de ensayo para generar curvas de PCR que, después, se convierten en resultados.

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

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

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

El sistema ELITe InGenius genera los resultados con el producto «HSV2 ELITe MGB Kit» mediante el siguiente procedimiento:

- A. Validación de la curva de calibración
- B. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación
- C. Validación de los resultados de la muestra
- D. Generación del informe de los resultados de la muestra.

A. Validación de la curva de calibración

El ELITe InGenius software interpreta los resultados de la PCR para la sonda específica del VHS2 («HSV2») y mediante la sonda específica del Internal Control («IC») en la reacción de amplificación de los calibradores con los parámetros del protocolo de ensayo «HSV2 ELITe STD». Los valores de Ct resultantes se utilizan para validar el sistema (lote de reactivos e instrumento).

Tras la aprobación por parte de personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst»), la curva de calibración, específica para el lote de reactivos de amplificación, se guarda en la base de datos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

La curva de calibración, específica para el lote de reactivos de amplificación, caduca **a los 60 días**.

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

Nota: si la curva de calibración no cumple los criterios de aceptación, en el menú «Calibration» aparece el mensaje «Failed». En este caso, los resultados no pueden aprobarse y es necesario repetir las reacciones de amplificación del calibrador.

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

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

El ELITe InGenius software interpreta los resultados de la PCR para la sonda específica del VHS2 («HSV2») y mediante la sonda específica del Internal Control («IC») en la reacción de amplificación del Positive Control y del Negative Control con los parámetros de los protocolos de ensayo «HSV2 ELITe_PC» y «HSV2 ELITe_NC». Los valores de Ct resultantes se utilizan para validar el sistema (lote de reactivos e instrumento).

Tras la aprobación por parte de personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst»), los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación, específicos para el lote de reactivos de amplificación, se guardan en la base de datos («Controls»), siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Los resultados del Positive Control y del Negative Control, específicos para el lote de reactivos de PCR, se guardan en la base de datos («Controls»). El personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede consultar dichos resultados y aprobarlos siguiendo las instrucciones de la interfaz.

Los resultados del Positive Control de amplificación, específicos para el lote de reactivos de amplificación, caducan **a los 15 días**.

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

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 el manual de usuario del instrumento.

Nota: si el resultado del Positive Control o del Negative Control no cumple los criterios de aceptación, en la pantalla «Controls» aparece el mensaje «Failed». En este caso, los resultados no pueden aprobarse y es necesario repetir las sesiones 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.

C. Validación de los resultados de las muestras

El ELITe InGenius software interpreta los resultados de la PCR para la sonda del VHS2 (canal «HSV2») y la sonda del Internal Control (canal «IC») utilizando los parámetros de los protocolos de ensayo «HSV2 ELITe_WB_200_100», «HSV2 ELITe_PL_200_100» y «HSV2 ELITe_CSF_200_100». Los valores de Ct resultantes para el VHS2 se convierten en concentración.

En el módulo «Result Display» se muestran los resultados.

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

1) Curva de calibración	Estado
HSV2 Q - PCR Standard	APROBADO
2) Positive Control	Estado
HSV2 - Positive Control	APROBADO
3) Negative Control	Estado
HSV2 - Negative Control	APROBADO

El ELITe InGenius software interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del protocolo de ensayo. En la tabla siguiente se muestran los mensajes de los posibles resultados.

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
HSV2: DNA Detected, quantity equal to XXX copies/mL	Se ha detectado ADN de VHS2 dentro del rango de medición del ensayo; la cantidad es la mostrada.
HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ copies/mL	Se ha detectado ADN de VHS2 por debajo del límite inferior de cuantificación del ensayo.
HSV2: DNA Detected, quantity beyond LLoQ copies/mL	Se ha detectado ADN de VHS2 más allá del límite superior de cuantificación del ensayo
HSV2: DNA Not Detected or below LoD copies/mL	No se ha detectado ADN de VHS2 en la muestra. La muestra es negativa para ADN de VHS2 o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
Invalid - Retest Sample	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 el análisis.

Las muestras que se notifican como «HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ» no son aptas para la cuantificación. La concentración de ADN de VHS2 que se ha detectado en la muestra es inferior al nivel en el que puede cuantificarse de forma precisa. Si la muestra se ha diluido antes de la extracción o de la PCR, el análisis puede repetirse sin dilución.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

Las muestras que se notifican como «HSV2: DNA Detected, quantity beyond ULoQ» no son aptas para la cuantificación. La concentración de ADN de VHS2 que se ha detectado en la muestra es superior al nivel en el que puede cuantificarse de forma precisa. La muestra puede diluirse antes de la extracción o de la PCR y el análisis puede repetirse para obtener resultados dentro del rango lineal del ensayo.

Las muestras que se notifican como «HSV2 DNA Not Detected or below LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ADN de VHS2. En este caso, puede que la muestra sea negativa para ADN de VHS2, o que el ADN de VHS2 presente una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar la sección «Características de rendimiento»).

Si se detectan muestras positivas para ADN de VHS2 a una concentración inferior al LoD, se notifican como «HSV2: DNA Detected, quantity below LLoQ» (consultar la sección «Características de rendimiento»).

Las muestras que se notifican como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de resultados. En este caso, el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente, por ejemplo, debido a problemas en el paso de PCR o de extracción (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». Si se produce un segundo resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de la extracción de una nueva muestra utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR».

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

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

D. Generación del informe de los resultados de las muestras

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

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

El «Track Report» muestra los detalles de la sesión de una muestra según el carril seleccionado.

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

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

ELITe BeGenius

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre para la extracción de ADN deben recogerse en EDTA e identificarse de acuerdo con las prácticas para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de 200 µL de sangre se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión **2.0** del **software ELITe BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**HSV2 ELITe_Be_WB_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de los ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA de acuerdo con las directrices del laboratorio, así como transportarse a +2/+8 °C y almacenarse a +2/+8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y almacenarse a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de 200 µL de plasma se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión **2.0** del **ELITe BeGenius software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**HSV2 ELITe_Be_PL_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Las muestras de LCR para la extracción de ADN deben recogerse de acuerdo con las directrices para laboratorios, evitando su contaminación con sangre del paciente, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cuatro horas; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de LCR se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión **2.0.0** del **ELITe BeGenius software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**HSV2 ELITe_Be_CSF_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

Otras muestras:

En la actualidad, no se dispone de datos sobre el rendimiento de este producto con otras muestras clínicas, como leucocitos, suspensiones de granulocitos y líquido amniótico.

Sustancias interferentes

La muestra no debe contener heparina, para evitar el problema de inhibición y el riesgo de resultados no válidos frecuentes.

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 antiviricos, antibióticos, antineoplásicos o inmunodepresores.

Calibradores de amplificación y controles de amplificación

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

Como conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del producto «**HSV2 ELITe Standard**» junto con el protocolo «**HSV2 ELITe Be STD**».

Como Positive Control de amplificación, utilizar el producto «**HSV2 - ELITe Positive Control**» junto con el protocolo «**HSV2 ELITe Be PC**».

Como Negative Control de amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit) junto con el protocolo «**HSV2 ELITe Be NC**».

Nota: El sistema **ELITe BeGenius** requiere resultados aprobados y válidos de la curva de calibración y de los controles de amplificación para cada lote de reactivos de amplificación guardado en su base de datos.

Las curvas de calibración, aprobadas y guardadas en la base de datos, caducan **a los 60 días**. Al llegar la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar los calibradores «Q-PCR Standard» con el lote de reactivos de amplificación.

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

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

- 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 el instrumento.

Controles de calidad

Se recomienda validar periódicamente todo el procedimiento de extracción y amplificación. Se pueden utilizar muestras ya analizadas o material de referencia certificado. Se deben realizar controles de calidad externos de acuerdo con los organismos de acreditación locales, estatales o federales, según proceda.

PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius

El uso del producto «**HSV2 ELITe MGB Kit**» con el sistema **ELITe BeGenius** comprende tres pasos:

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

Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el **ELITe BeGenius** y seleccionar el modo «**CLOSED**».

Verificar que los calibradores («**HSV2 Q-PCR Standard**») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede comprobar en el menú «**Calibration**» de la página «**Home**».

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

Verificar que los controles de amplificación («**HSV2 Positive Control**» y «**HSV2 Negative Control**») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede comprobar en el menú «**Control**» de la página «**Home**».

- Elegir el tipo de sesión y configurarla, siguiendo las instrucciones de la interfaz para la configuración de la sesión y utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits ELITe MGB, las matrices correspondientes y el instrumento **ELITe BeGenius**.

Los protocolos de ensayo disponibles para el producto «**HSV2 ELITe MGB Kit**» se describen en la tabla siguiente.

Protocolos de ensayo para el producto « HSV2 ELITe MGB Kit » y el ELITe BeGenius			
Nombre	Matriz	Informe	Características
HSV2 ELITe Be_PL_200_100	Plasma	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV2 ELITe Be_WB_200_100	Sangre	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV2 ELITe Be_CSF_200_100	LCR	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

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

Configuración de la sesión

El producto «**HSV2 ELITe MGB Kit**» puede utilizarse con el **ELITe BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión de la muestra (modo de procesamiento «**Extract + PCR**»).
- B. Sesión de amplificación (modo de procesamiento «**PCR Only**»).
- C. Sesión de calibración (modo de procesamiento «**PCR Only**»).
- D. Sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control (modo de procesamiento «**PCR Only**»).

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

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

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

A. Sesión integrada

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar la mezcla «**HSV2 PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de CPE para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer todas las gradillas de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «Extract + PCR».
6. Cargar las muestras en el área de refrigeración comenzando a partir de la gradilla de muestras L5.
7. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

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

8. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «HSV2 ELITe_Be_PL_200_100»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Si es necesario realizar una segunda extracción, repetir los pasos del 6 al 9 utilizando la gradilla de muestras L4.
11. Cargar las probetas de eluido con códigos de barras en el área de refrigeración, comenzando a partir de la gradilla de elución L3.

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

12. Insertar la gradilla de elución L3 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Repetir los pasos 11 y 12 utilizando la gradilla de reactivos/elución L2.
14. Cargar el CPE y la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en el área de refrigeración.
15. Insertar la gradilla de reactivos L1 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
16. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
17. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
18. Cargar la gradilla de extracción con los cartuchos de extracción «ELITe InGenius SP 200» y los consumibles de extracción necesarios siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
19. Cerrar la puerta del instrumento.
20. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

B. Sesión de amplificación

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar la mezcla «**HSV2 PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
4. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
5. Cargar las muestras en el área de refrigeración comenzando a partir de la gradilla de elución L3.
6. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
7. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
8. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «HSV2 ELITe_Be_PL_200_100»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en el área de refrigeración.
10. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

C. Sesión de calibración

Para configurar la sesión de calibración con los calibradores «Q-PCR Standard», llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar la mezcla «HSV2 PCR Mix» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar las probetas de calibrador «HSV2 Q - PCR» (Cal1: HSV2 Q - PCR Standard 10², Cal2: HSV2 Q - PCR Standard 10³, Cal3: HSV2 Q - PCR Standard 10⁴, Cal4: HSV2 Q - PCR Standard 10⁵). Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
6. Cargar las probetas del calibrador en la gradilla de elución L3.
7. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «HSV2 ELITE_Be_STD»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en la gradilla de reactivos/elución L2.
11. Insertar la gradilla de reactivos/elución L2 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
14. Cerrar la puerta del instrumento.
15. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, los calibradores pueden extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar los calibradores «Q-PCR Standard».

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

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

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

Para configurar la sesión del Positive Control y del Negative Control, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz.

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar la mezcla «HSV2 PCR Mix» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar el producto «HSV2 - ELITE Positive Control», para la amplificación del Positive Control. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua para biología molecular (como Negative Control) para las sesiones en una probeta de elución, incluida en el conjunto de consumibles «ELITE InGenius SP Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
6. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
7. Cargar las probetas Positive Control y de Negative Control en la gradilla de elución L3.
8. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
10. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se va a utilizar («HSV2 ELITE_Be_PC» y «HSV2 ELITE_Be_NC»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar la mezcla «HSV2 Q-PCR Mix» en la gradilla de reactivos/elución L2.
12. Insertar la gradilla de reactivos/elución L2 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
14. Cargar la gradilla de PCR con un cartucho «PCR Cassette» en el área del inventario siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
15. Cerrar la puerta del instrumento.
16. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, el Positive Control puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar el Positive Control.

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

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

Revisión y aprobación de los resultados

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

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

El **ELITE BeGenius** genera los resultados con el producto «HSV2 ELITE MGB Kit» mediante el siguiente procedimiento:

- A. Validación de la curva de calibración
- B. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación
- C. Validación de los resultados de la muestra
- D. Generación del informe de los resultados de la muestra.

Nota: Consultar los mismos capítulos del **ELITE InGenius** para obtener más información.

**CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO
 ELITE InGenius y ELITE BeGenius**

Sensibilidad analítica: límite de detección

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

El límite de detección de este ensayo se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con el espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a un título de 10 copias/20 µL en ADN genómico humano a un título de 500 ng/20 µL. Esta muestra se analizó en 24 duplicados realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. en dos instrumentos distintos. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
10 copias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	24	24	0

El límite de detección (LoD) del producto «**HSV2 ELITE MGB Kit**» se verificó con muestras de **sangre, plasma recogido en EDTA y LCR** y utilizando los sistemas **ELITE InGenius y ELITE BeGenius** (en el modo de procesamiento «Extract + PCR»).

En las muestras de sangre

El LoD de este ensayo se verificó analizando 20 duplicados de muestras de sangre enriquecidas a 171 copias/mL en los sistemas **ELITE InGenius y ELITE BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia certificado «Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid» (ZeptoMetrix Corporation).

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de sangre y el ELITE InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiv s	Negativ s
Sangre recogida en EDTA	171 copias/mL	20	20	20	0

Límite de detección para muestras de sangre y el ELITE BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiv s	Negativ s
Sangre recogida en EDTA	171 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VHS2 se confirmó a 171 copias/mL cuando se utilizó sangre recogida en EDTA.

En las muestras de plasma

El LoD de este ensayo se verificó analizando 20 duplicados de muestras de plasma enriquecidas a 119 copias/mL en los sistemas **ELITE InGenius y ELITE BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia certificado «Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid» (ZeptoMetrix Corporation).

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de plasma y el ELITE InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiv s	Negativ s
Plasma recogido en EDTA	119 copias/mL	20	20	20	0

Límite de detección para muestras de plasma y el ELITE BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiv s	Negativ s
Plasma recogido en EDTA	119 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VHS2 se confirmó a 119 copias/mL cuando se utilizó plasma recogido en EDTA.

En las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)

El LoD de este ensayo se verificó analizando 20 duplicados de muestras de LCR enriquecidas a 119 copias/mL en los sistemas **ELITE InGenius y ELITE BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia «Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Culture Fluid Heat Inactivated» de ZeptoMetrix.

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de LCR y el ELITE InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiv s	Negativ s
Líquido cefalorraquídeo	119 copias/mL	20	20	20	0

Límite de detección para muestras de LCR y el ELITE BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiv s	Negativ s
Líquido cefalorraquídeo	119 copias/mL	20	20	19	1

El valor del LoD para la diana de VHS2 se confirmó a 119 copias/mL cuando se utilizó líquido cefalorraquídeo.

Rango de medición lineal y límites de cuantificación

El rango de medición lineal del producto «**HSV2 ELITE MGB Kit**» utilizado con muestras de **sangre, plasma recogido en EDTA y LCR** en los instrumentos **ELITE InGenius y ELITE BeGenius** se verificó con un panel de diluciones de VHS2. El panel se preparó diluyendo el producto «Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid» (ZeptoMetrix Corporation) en matrices negativas para ADN de VHS2.

En las muestras de sangre

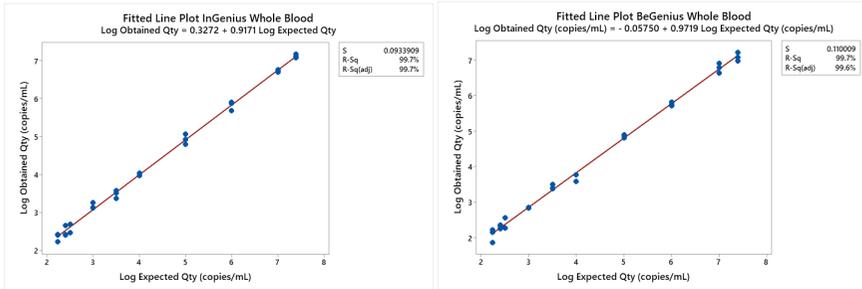
El panel constaba de diez puntos de dilución que abarcaron de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ copias/mL a 171 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de sangre, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,997 para el instrumento **ELITE InGenius** y de 0,997 para el instrumento **ELITE BeGenius**.

HSV2 ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN
 en tiempo real

REF RTS032PLD

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,1081 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,1900 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de -0,1221 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,1591 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 171 copias/mL.

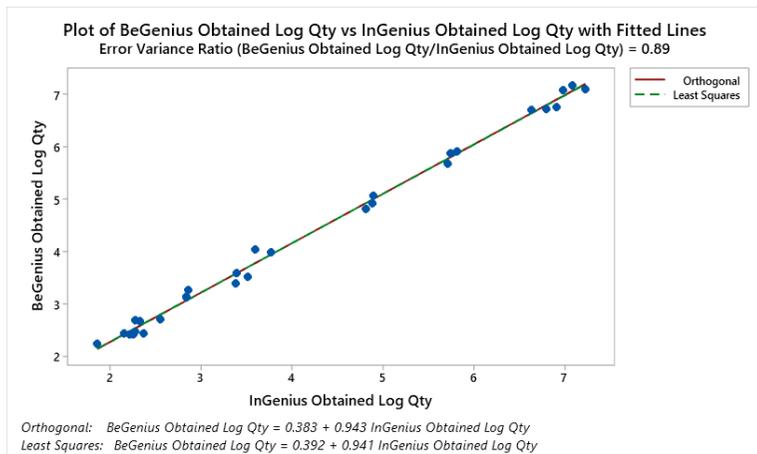
El límite superior de cuantificación (ULOQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0472 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,1191 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,2744 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,3029 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copias/mL.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de sangre y los instrumentos ELITe InGenius y ELITe BeGenius		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
copias/mL	171	25.000.000

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

Los resultados se resumen en la siguiente figura.



HSV2 ELITe MGB® Kit
 Reactivo para la amplificación de ADN
 en tiempo real

REF RTS032PLD

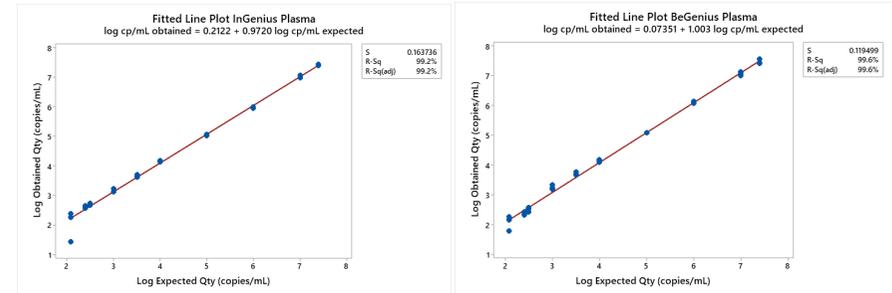
En este análisis, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente de 0,943 (IC del 95 %: 0,919 a 0,967) y una intersección de 0,383 (IC del 95 %: 0,276 a 0,491). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,996.

En las muestras de plasma

El panel constaba de diez puntos de dilución que abarcaron de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ copias/mL a 119 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de plasma, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R2) de 0,992 para el instrumento **ELITe InGenius** y de 0,996 para el instrumento **ELITe BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2529 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,2931 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,0503 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,0005 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 119 copias/mL.

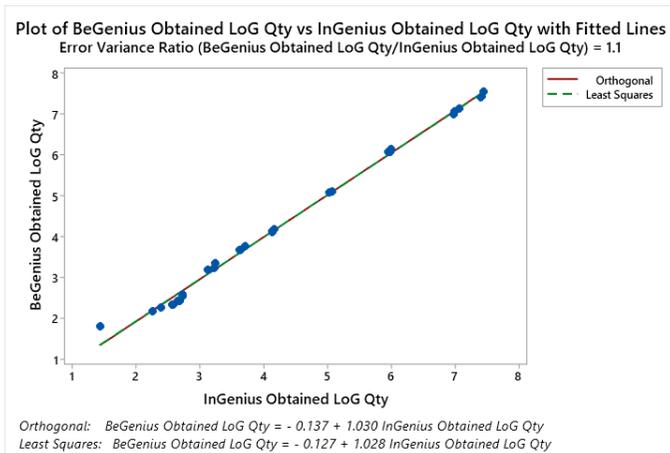
El límite superior de cuantificación (ULOQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0234 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,0761 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de -0,0258 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de -0,0646 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copias/mL.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de plasma y los instrumentos ELITe InGenius y ELITe BeGenius		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
copias/mL	119	25.000.000

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

Los resultados se resumen en la siguiente figura.



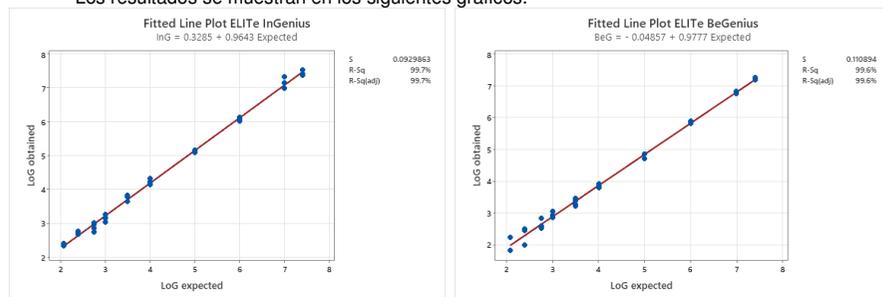
En esta prueba, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente igual a 1,030 (IC del 95 %: 1,005; 1,056) y una intersección igual a -0,137 (IC del 95 %: -0,257; -0,017). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,996.

En las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR):

El panel constaba de diez puntos de dilución que abarcaron de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ copias/mL a 119 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 4 duplicados. Dos duplicados se excluyeron por presentar valores atípicos.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de LCR, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R2) de 0,997 para el **ELITE InGenius** y de 0,996 para el **ELITE BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0261 log copias/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,2349 log copias/mL para el **ELITE BeGenius**) y exacta (sesgo de -0,2938 log copias/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,1138 log copias/mL para el **ELITE BeGenius**): 119 copias/mL.

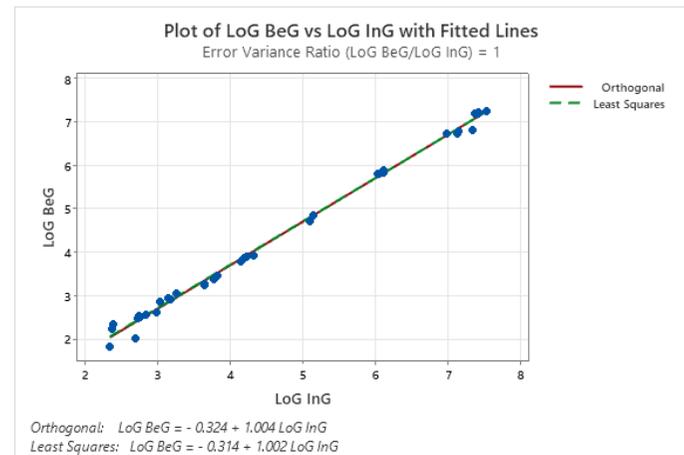
El límite superior de cuantificación (ULOQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0637 log copias/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,0277 log copias/mL para el **ELITE BeGenius**) y exacta (sesgo de -0,0345 log copias/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,1823 log copias/mL para el **ELITE BeGenius**): 25.000.000 copias/mL.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de LCR y los instrumentos ELITE InGenius y ELITE BeGenius			
Unidad de medida	Límite inferior		Límite superior
copias/mL	119		25.000.000

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

Los resultados se resumen en la siguiente figura.



En este análisis, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente de 1,004 (IC del 95 %: 0,9822; 1,0267) y una intersección de 0,324 (IC del 95 %: -0,4334; -0,2147). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,995.

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto «**HSV2 ELITE MGB Kit**» en los sistemas **ELITE InGenius** y **ELITE BeGenius** se evaluó analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de VHS2 «Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid» (Zeptomatrix) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 513 cp/mL) y 10 veces el LoD (aproximadamente 1710 cp/mL).

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

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

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

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE InGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	22,91	0,51	2,24
3xLoD	8/8	35,65	0,87	2,45				
10xLoD	8/8	33,96	0,20	0,58				

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

Repetibilidad entre sesiones con el ELITE InGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	48/48	23,40	0,82	3,49
3xLoD	16/16	35,87	0,71	1,99				
10xLoD	16/16	33,92	0,22	0,66				

En la prueba de repetibilidad con el «ELITE InGenius», el ensayo detectó la diana de VHS2 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS2 como para el Internal Control.

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

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

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

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE BeGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	27,16	0,87	3,19
3xLoD	8/8	37,58	0,67	1,78				
10xLoD	8/8	35,25	0,56	1,58				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITE BeGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	48/48	26,87	0,94	3,49
3xLoD	16/16	37,59	0,66	1,75				
10xLoD	16/16	35,41	0,84	2,37				

En la prueba de repetibilidad con el ELITE BeGenius, el ensayo detectó la diana de VHS2 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS2 como para el Internal Control.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto «HSV2 ELITE MGB Kit» en los sistemas ELITE InGenius y ELITE BeGenius se evaluó analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de VHS2 «Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid» (Zeptomatrix) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 513 cp/mL) y 10 veces el LoD (aproximadamente 1710 cp/mL).

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

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

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

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITE InGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	23,91	0,35	1,45
3xLoD	8/8	36,33	0,55	1,51				
10xLoD	8/8	34,46	0,26	0,86				

Repetibilidad entre lotes con el ELITE InGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	24,18	0,42	1,76
3xLoD	8/8	36,45	0,46	1,26				
10xLoD	8/8	34,66	0,26	0,76				

En la prueba de reproducibilidad con el «ELITE InGenius», el ensayo detectó la diana de VHS2 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS2 como para el Internal Control.

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

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

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

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

Repetibilidad entre instrumentos con el ELITE BeGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	28,32	0,41	1,46
3xLoD	8/8	37,43	0,42	1,15				
10xLoD	8/8	35,88	0,25	0,75				

Repetibilidad entre lotes con el ELITE BeGenius								
Muestra	VHS2				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	27,86	0,66	2,37
3xLoD	8/8	36,90	0,58	1,59				
10xLoD	8/8	35,17	0,49	1,39				

En la prueba de reproducibilidad con el ELITE BeGenius, el ensayo detectó la diana de VHS2 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS2 como para el Internal Control.

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, expresada como reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «AcroMetrix HSV2 Plasma Panel» (Life Technologies, EE. UU.). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe InGenius				
Muestra	Título nominal copias/mL	Título nominal log ₁₀ copias/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ copias/mL
HSV2 DNA 1E6	10 ⁶	6,000	2/2	6,035
HSV2 DNA 1E5	10 ⁵	5,000	2/2	5,067
HSV2 DNA 1E4	10 ⁴	4,000	2/2	3,978
HSV2 DNA 1E3	10 ³	3,000	2/2	3,190
HSV2 DNA 1E2	10 ²	2,000	2/2	1,711

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

Se realizaron análisis adicionales utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2014 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), que era un panel de diluciones de VHS2. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe InGenius		
Muestra	Estado de la muestra	Positivas/Duplicados
HSVDNA14-01	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA14-02	Negativo para VHS1 y VHS2	0/2
HSVDNA14-03	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA14-04	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA14-05	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA14-06	VHS2 detectado con frecuencia	2/2
HSVDNA14-07	VHS2 detectado	2/2
HSVDNA14-08	VHS2 detectado con frecuencia	2/2
HSVDNA14-09	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA14-10	Negativo para VHS1 y VHS2	0/2

Todas las muestras se detectaron correctamente.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA, plasma recogido en EDTA y líquido cefalorraquídeo positivos para ADN de VHS2, utilizando para ello el **ELITe InGenius**. 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. Por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITe InGenius** también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 23 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV2MQP01-Medium» del producto «HSV2 Molecular Q Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) a un título de 750 copias/mL, 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV2 ELITe-IQC High» (ELITech Group S.p.A.) a un título de 750 copias/mL y 20 muestras de LCR negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV2 ELITe-IQC High» (ELITech Group S.p.A.) a un título de 750 copias/mL.

Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA y positiva para ADN de VHS2	23	22	1
Plasma recogido en EDTA y enriquecido con ADN de VHS2	30	30	0
Líquido cefalorraquídeo y enriquecido con ADN de VHS2	20	20	0

Todas las muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo fueron válidas y positivas. Todas las muestras de sangre fueron válidas y 22 muestras se confirmaron como positivas. Una muestra presentó un resultado negativo diferente, probablemente debido a la presencia de inhibición. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 99 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas de sangre recogida en EDTA, plasma recogido en EDTA y líquido cefalorraquídeo, todas negativas para ADN de VHS2, utilizando el **ELITe InGenius**. 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**.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 34 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VHS2, 39 muestras de plasma recogido en EDTA de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VHS2 y 22 muestras de LCR de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VHS2. Cada muestra se analizó realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el **ELITe InGenius** y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de VHS2	34	0	34
Plasma recogido en EDTA y negativo para ADN de VHS2	39	0	39
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VHS2	22	0	22

Todas las muestras de sangre, plasma y líquido cefalorraquídeo fueron válidas y negativas. El valor de corte para el Ct de IC del Internal Control se ha establecido a 35. En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

**ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
ABI 7300 Real-Time System**

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con **ADN extraído** de las siguientes muestras biológicas: líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre recogida en EDTA y plasma recogido en EDTA.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

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

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

Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de líquido cefalorraquídeo se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **UUNI_E100S200_ELI**, que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL. Las muestras de las probetas primarias pueden cargarse directamente en el **ELITe STAR**. Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteinasa transportadora tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

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

Nota: cuando la extracción de ADN de líquido cefalorraquídeo se realiza con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», es necesario utilizar el protocolo de extracción «**Generic 2.0.1**» y seguir estas indicaciones: verter **500 µL** de muestra en la tira de 8 pocillos y llevar a cabo la extracción. Una vez transcurridos los 10 minutos de incubación, añadir **5 µL** de Internal Control **CPE** antes de añadir el producto «**NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**» y, después, continuar con la extracción. Eluir los ácidos nucleicos en **100 µL** de solución tampón de elución.

Sangre recogida en EDTA

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

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

Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **UUNI_E100S200_ELI**, que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL. Las muestras en las probetas primarias se pueden cargar directamente en el «**ELITe STAR**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteinasa transportadora tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza utilizando el kit «**EXTRAblood**», deben seguirse las indicaciones de las instrucciones de uso: comenzar con **200 µL** de muestra (no más de 2 millones de leucocitos) y eluir el ADN en **100 µL** de solución tampón de elución.

Plasma recogido en EDTA

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

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

Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**UUNI_E100S200_ELI**», que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL. Las muestras en las probetas primarias se pueden cargar directamente en el «**ELITe STAR**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteinasa transportadora tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», es necesario utilizar el protocolo de extracción «**Generic 2.0.1**» y seguir estas indicaciones: verter **500 µL** de muestra en la tira de 8 pocillos y llevar a cabo la extracción. Una vez transcurridos los 10 minutos de incubación, añadir **5 µL** de Internal Control **CPE** antes de añadir el producto «**NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**» y, después, continuar con la extracción. Eluir los ácidos nucleicos en **100 µL** de solución tampón de elución.

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

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 antiviricos, antibióticos, antineoplásicos o inmunodepresores.

Controles de amplificación

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

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

Para el control positivo, utilizar el producto «HSV2 - ELITE Positive Control» o el producto «HSV2 ELITE Standard».

Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis de cada sesión de extracción y amplificación, analizando los controles del proceso, como una muestra que tenga un resultado negativo y una que tenga uno positivo o un material de referencia calibrado.

PROCEDIMIENTO

Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

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

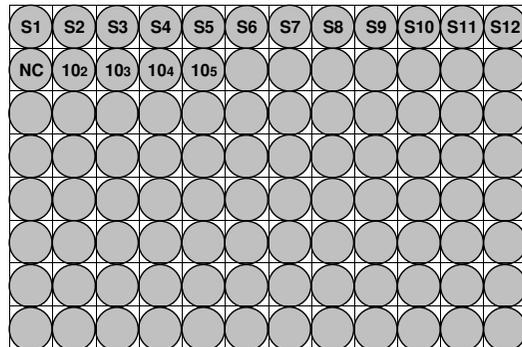
Cuando se utiliza el instrumento del **sistema de PCR en tiempo real 7300**.

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

- Encender el termociclador en tiempo real, encender el ordenador, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de cuantificación absoluta («Absolute quantification»).
- Configurar (administrador del detector) el «detector» para la sonda de VHS2 con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «HSV2».
- 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 denominarlo «IC».
- Para cada pocillo utilizado en la microplaca, configurar (en «Well Inspector») el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir), la referencia pasiva («passive reference») o «ROX» (AP593 se utiliza en lugar de ROX, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o calibrador en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

Nota: para determinar el título de ADN en la muestra inicial, configurar una serie de reacciones con los calibradores «Q - PCR Standard» (105 copias, 104 copias, 103 copias, 102 copias) con el fin de obtener la **curva de calibración**.

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



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

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

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

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

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

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 (recogida de datos)	30 s
	72 °C	20 s
Disociación (opcional)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

Cuando se utiliza un «7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument».

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

- Encender el termociclador en tiempo real, encender el ordenador, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de cuantificación absoluta («Absolute quantification») y configurar «Run mode: Fast 7500».
- Configurar (administrador del detector) el «detector» para la sonda de VHS2 con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «HSV2».
- Configurar («Detector Manager») el «detector» para la sonda de control interno con el marcador («reporter») = «VIC» (AP525 es similar al VIC) y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «IC».
- Para cada pocillo empleado en la microplaca, configurar (en «Well Inspector») el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir, la referencia pasiva («passive reference») o «CY5» (AP593 se utiliza en lugar de CY5, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o calibrador en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

Nota: para determinar el título de ADN en la muestra inicial, configurar una serie de reacciones con los calibradores «Q - PCR Standard» (105 copias, 104 copias, 103 copias, 102 copias) con el fin de obtener la **curva de calibración**.

La configuración del análisis cuantitativo de algunas muestras se indica, a manera de ejemplo, en el apartado anterior, donde se describe el procedimiento para el «7300 Real Time PCR System».

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

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

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

- Modificar el tiempo tal como se indica en la tabla «Ciclo térmico».
- Establecer el número de ciclos a **45**.
- Configurar el volumen para la emulación del software de la transferencia térmica a la reacción («Sample volume») en **30 µL**.

- Opcional: añadir la fase de disociación («Add Dissociation Stage») y configurar una temperatura de **40 °C a 80 °C**.

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

Configuración de la amplificación

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

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

- Tomar y descongelar las probetas que contienen las muestras que se van a analizar. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
- Tomar y descongelar las probetas de «HSV2 Q - PCR Mix» necesarias para la sesión, teniendo en cuenta que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
- Tomar y descongelar las probetas de «HSV2 - Positive Control» o de «HSV2 Q - PCR Standard». Mezclar suavemente, centrifugar durante 5 segundos y conservar en hielo.
- Tomar la **microplaca de amplificación** que va a utilizarse durante la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.

1. Pipetear con precisión **20 µL** de mezcla «HSV2 Q - PCR Mix» en el fondo de los pocillos de la **placa de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Evitar la formación de burbujas.

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

2. Pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de **extracto de ADN** de la primera muestra en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma forma con otras muestras del **ADN extraído**.
3. Pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción, **20 µL** de **agua para biología molecular** (no incluida en este producto) en el pocillo de la **microplaca de amplificación** del control negativo de amplificación, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando el **agua para biología molecular** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

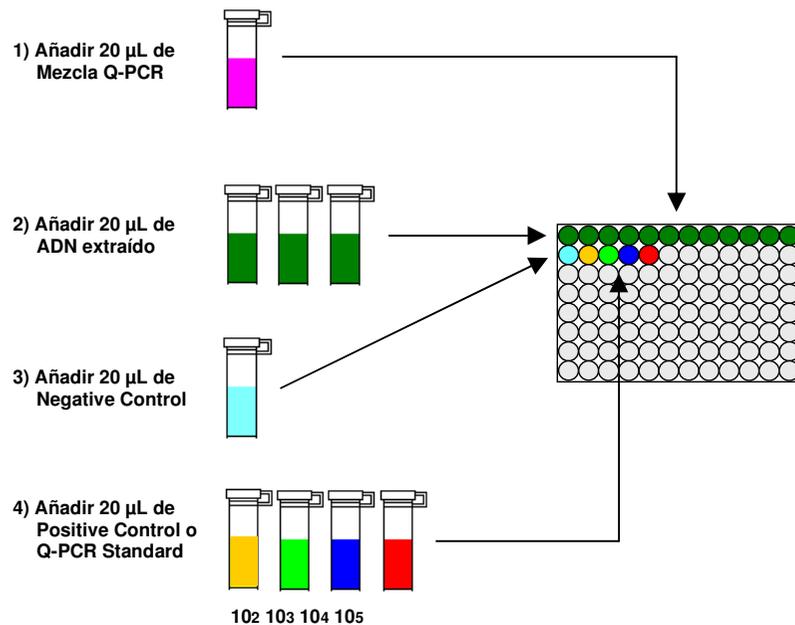
4. Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:
 - Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de HSV2), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «HSV2 - Positive Control» en el pocillo correspondiente de la **placa de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando el producto «HSV2 - Positive Control» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

- Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación de ADN de VHS2), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «HSV2 - PCR Standard 102» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el calibrador pipeteando el calibrador «HSV2 Q - PCR Standard 102» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma manera con los demás calibradores «HSV2 Q - PCR Standard» (103, 104, 105).

5. Sellar de forma exacta la **microplaca de amplificación** con la **placa de sellado de amplificación**.
6. Transferir la **microplaca de amplificación** al termociclador en tiempo real del área de amplificación/detección de los productos de amplificación y comenzar el ciclo térmico para la amplificación guardando la configuración de la sesión con un nombre de archivo único y reconocible (por ejemplo «año-mes-día-VHS2-EGSpA»).

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

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



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

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

Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica del VHS2 (detector FAM «HSV2») y por la sonda específica del Internal Control (detector VIC «IC») en las reacciones de amplificación deben ser analizarse con el software del instrumento.

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

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

Nota: en el caso de una muestra positiva con un alto título de ADN de VHS2, la fluorescencia FAM de la sonda específica del VHS2 puede empezar a aumentar antes del ciclo 15. En este caso, el rango de cálculo para el **punto de referencia** debe adaptarse desde el ciclo 6 hasta el ciclo en el que la fluorescencia FAM de la muestra empieza a aumentar, según detecta el software del instrumento («Results > Component»).

Si se utiliza un instrumento «7300 Real-Time PCR System», proceder del modo siguiente:

- Configurar manualmente el **umbral** para el detector FAM «HSV2» en **0.1**.
- Configurar manualmente el **umbral** para el «IC» del detector VIC a **0,05**.

Si se utiliza un «7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument», tener en cuenta lo siguiente:

- Configurar manualmente el **umbral** para el detector FAM «HSV2» en **0.2**.
- Configurar manualmente el **umbral** para el «IC» del detector VIC a **0,1**.

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

En la reacción de amplificación del **Positive Control***, el valor de **Ct** del VHS2 («Results > Report») se utiliza para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la tabla siguiente:

Reacción del Positive Control detector FAM «HSV2»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Positive Control** es **Ct > 25** o **Ct Undetermined** para el VHS2, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante los pasos de amplificación o detección (dosificación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

***Nota:** cuando este producto se utiliza para la cuantificación de ADN de VHS2, se configuran las reacciones de «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 105» (Ct ≤25).

En la reacción de amplificación del **Negative Control**, el valor de **Ct** del VHS2 («Results > Report») se utiliza para validar la amplificación y la detección tal como se describe en la tabla siguiente:

Reacción del Negative Control detector FAM «HSV2»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado del **Negative Control** de la reacción de amplificación es diferente de **Ct Undetermined** para el VHS2, significa que se ha detectado el ADN diana. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En la reacción de amplificación de cada **muestra**, el valor de **Ct** del VHS2 se utiliza para detectar el ADN diana, mientras que el valor de **Ct** del Internal Control se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

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

Este producto puede detectar una cantidad mínima de unas 10 copias de ADN del gen de la gpG del VHS2 en la reacción de amplificación, que corresponde a 10 equivalentes genómicos por reacción (límite de detección, consultar la sección «Características de rendimiento»).

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

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ADN de VHS2
detector FAM «HSV2»	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

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VHS2 y **Ct >35** o **Ct Undetermined** para el Internal Control, significa que no ha sido posible detectar correctamente el ADN del Internal Control. En este caso, se han producido problemas durante el paso de amplificación (amplificación ineficaz o ausencia de amplificación) o durante el paso de extracción (reducción del título de ADN o presencia de inhibidores), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra no es idónea, el ensayo no es válido y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VHS2 y **Ct ≤ 35** para el Internal Control, significa que no se ha detectado ADN de VHS2 en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VHS2 presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

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

***Nota:** cuando en la reacción de amplificación de una muestra se detecta ADN de VHS2, el Internal Control puede dar un resultado **Ct > 35** o **Ct Undetermined**. De hecho, la reacción de amplificación de baja eficiencia para el Internal Control puede reemplazarse con la reacción de amplificación de alta eficiencia para ADN de VHS2. En este caso, la muestra es apta de todos modos y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis cuantitativo de los resultados

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

En las reacciones de amplificación de los cuatro calibradores «Q-PCR Standard», los valores de **Ct** del VHS2 se utilizan para calcular la **curva de curva de calibración** («Results > Standard Curve») para la sesión de amplificación y validar la amplificación y la detección tal como se describe en la tabla siguiente:

Curva de calibración detector FAM «HSV2»	Rango de aceptabilidad	Amplificación/Detección
Coefficiente de correlación (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTA

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

Los valores de **Ct** del VHS2 en la reacción de amplificación de cada **muestra** y la **curva de calibración** de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ADN diana presente en las reacciones de amplificación de las muestras.

Este producto puede cuantificar de 1.000.000 a 10 copias de ADN del gen de la gpG del VHS2 en la reacción de amplificación, que corresponden a los equivalentes genómicos por reacción (rango de medición lineal, consultar la sección «Características de rendimiento»), tal como se describe en la tabla siguiente:

Resultado de la muestra detector FAM «HSV2»	Equivalentes genómicos de VHS2 por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1×10 ¹ ≤ cantidad ≤1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad <1 × 10 ¹	MENOS DE 10

Los resultados (**cantidad**) de cada **muestra** («Results > Report») se utilizan para calcular los equivalentes genómicos (**cp**) de VHS2 presentes en la muestra extraída (**Nc**) según la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

Quando el «**ELITe STAR**» se utiliza con muestras de sangre, muestras de plasma recogido en EDTA o muestras de líquido cefalorraquídeo recogido en EDTA y se necesita un resultado **expresado en cp/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo y el «ELITe STAR»

$$Nc (cp/mL) = 28 \times cantidad$$

Quando el «**ELITe GALAXY**» se utiliza con muestras de sangre, muestras de plasma recogido en EDTA o muestras de líquido cefalorraquídeo recogido en EDTA y se necesita un resultado **expresado en cp/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo y el «ELITe GALAXY»

$$Nc (cp/mL) = 35 \times cantidad$$

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

Fórmula simplificada para sangre y el «EXTRAblood»

$$Nc (cp/mL) = 25 \times cantidad$$

Quando el sistema de extracción «**NucliSENS® easyMAG®**» se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA o con muestras de líquido cefalorraquídeo y se necesita un resultado **expresado en cp/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y el «NucliSENS® easyMAG®»

$$Nc (cp/mL) = 10 \times cantidad$$

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

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

$$Nc (cp/mL) = 12 \times cantidad$$

Cálculo de los límites del rango de medición lineal

Cuando se utiliza un método de extracción concreto, los límites del rango de medición lineal, expresados como cp/mL de la muestra, pueden calcularse a partir del rango de medición lineal de la reacción de amplificación según la siguiente fórmula:

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

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

Cuando el kit de extracción «EXTRAblood» se utiliza con muestras de sangre recogidas en EDTA, la fórmula es:

Límites del rango de medición (cp/mL) con el kit «EXTRAblood»

Límite inferior (cp/mL) = 25 × 10 cp
 Límite superior (cp/mL) = 25 × 1.000.000 cp

de 250 a 25.000.000 cp/mL

Cuando el sistema de extracción «ELITe STAR» se utiliza con muestras de sangre, muestras de plasma recogido en EDTA o muestras de líquido cefalorraquídeo, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (cp/mL) con el «ELITe STAR»

Límite inferior (cp/mL) = 28 × 10 cp
 Límite superior (cp/mL) = 28 × 1.000.000 cp

de 280 a 28.000.000 cp/mL

Cuando el sistema de extracción «ELITe GALAXY» se utiliza con muestras de sangre, muestras de plasma recogido en EDTA o muestras de líquido cefalorraquídeo, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (cp/mL) con el «ELITe GALAXY»

Límite inferior (cp/mL) = 35 × 10 cp
 Límite superior (cp/mL) = 35 × 1.000.000 cp

de 350 a 35.000.000 cp/mL

Cuando se utiliza el sistema de extracción «NucliSENS® easyMAG®» con muestras de plasma recogidas en EDTA o muestras de líquido cefalorraquídeo, la fórmula es:

Límites del rango de medición (cp/mL) con el «NucliSENS® easyMAG®»

Límite inferior (cp/mL) = 10 × 10 cp
 Límite superior (cp/mL) = 10 × 1.000.000 cp

de 100 a 10.000.000 cp/mL

Cuando el sistema de extracción «QIAAsymphony® SP/AS» se utiliza con muestras de plasma recogidas en EDTA, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (cp/mL) con el «QIAAsymphony® SP/AS»

Límite inferior (cp/mL) = 12 × 10 cp
 Límite superior (cp/mL) = 12 × 1.000.000 cp

de 120 a 12.000.000 cp/mL

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección

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

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

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente:

Muestras	N.º	Positivas	Negativas
10 copias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	50	50	0

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» se verificó con un panel de diluciones de VHS2 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo la muestra «HSV08-12» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido) en una muestra de plasma recogida en EDTA negativa para ADN de VHS2. Las concentraciones víricas oscilaron entre 10 cp/mL y 560 cp/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe GALAXY» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

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

Límite de detección para muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» (cp/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	171 cp/mL	112 cp/mL	505 cp/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» se verificó con un panel de diluciones de VHS2 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo la muestra «HSV08-12» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido) en una muestra de plasma recogido en EDTA negativa para ADN de VHS2. Las concentraciones víricas oscilaron entre 10 cp/mL y 560 cp/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe GALAXY» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

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

Límite de detección para las muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» (cp/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	119 cp/mL	75 cp/mL	547 cp/mL

Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

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

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

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS032PLD

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

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

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

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente:

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

Los límites del rango de medición lineal que se refieren al kit de extracción utilizado, expresados como cp/mL, se calculan en la página 26.

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión del ensayo, expresada como variabilidad de los resultados obtenidos con varios duplicados de una misma muestra analizada en la misma sesión, permitió obtener un coeficiente de variación (% CV) porcentual medio de un 18,6 % de las cantidades medidas, dentro del rango de 10⁶ a 10 moléculas, en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

La exactitud del ensayo, definida como la diferencia entre la media de los resultados obtenidos con varios duplicados de una muestra de la misma sesión y la concentración teórica de la muestra, permitieron obtener una inexactitud porcentual media (% de inexactitud) de un 14,4 % de las cantidades medidas, dentro del margen de 10⁶ a 10 moléculas, en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

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

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con un material de referencia calibrado

La sensibilidad analítica del ensayo, definida como la reproducibilidad de los resultados comparados con los resultados obtenidos utilizando otros ensayos en laboratorios diferentes, se comprobó analizando un panel de eficacia.

Las pruebas se realizaron utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VHS2 dentro del límite de concentración («QCMD 2009 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «ELITe STAR» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Pruebas con materiales de referencia calibrados y el «ELITe STAR»				
Muestra	Virus	Consenso de concentración log ₁₀ de virus	Desviación estándar	Media de resultados Log ₁₀ cp/mL
HSV09-01	VHS1	2,215	0,789	-
HSV09-02	VHS2	2,236	0,938	1,687
HSV09-03	VHS2	3,293	0,915	3,700
HSV09-04	VHS2	2,314	0,898	2,329
HSV09-05	Negativa	N/A	-	-
HSV09-06	VHS1	2,402	0,665	-
HSV09-07	VHS1	4,189	0,599	-
HSV09-08	VHS2	2,389	0,827	2,352
HSV09-09	Negativa	N/A	-	-
HSV09-10	VHS1	3,205	0,767	-

Todas las muestras se detectaron correctamente. Los resultados cuantitativos están dentro del rango definido mediante la desviación estándar de consenso ± 1.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS032PLD

Se realizaron más pruebas utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VHS2 dentro del límite de concentración («QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «ELITe GALAXY» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente, expresados en cp/mL.

Pruebas con materiales de referencia calibrados y el «ELITe GALAXY»				
Muestra	Consenso de concentración log ₁₀ de virus	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ cp/mL
HSV12-01	Negativo, N/A	-	0/2	-
HSV12-02	VHS1, 3,910	0,582	0/2	-
HSV12-03	VHS2, 1,948	0,305	1/2	2,128
HSV12-04	VHS1, 3,680	0,547	0/2	-
HSV12-05	VHS2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	VHS1, 2,318	0,441	0/2	-
HSV12-07	VHS1, 2,014	0,296	0/2	-
HSV12-08	VHS2, 3,424	1,098	2/2	3,634
HSV12-09	Negativo, N/A	-	0/2	-
HSV12-10	VHS2, 3,417	1,042	2/2	3,861

Todas las muestras negativas se notificaron correctamente. Las muestras positivas dentro del límite de detección teórico del sistema (350 copias/mL) se detectaron correctamente dentro del rango del valor de «consenso» medio del ensayo comercial ± 1 desviación estándar. Una muestra por debajo del límite teórico de detección del sistema (22,5 copias/mL) se notificó como negativa. Las muestras con un título inferior al límite de detección pueden notificarse como positivas o negativas de forma aleatoria.

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

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

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de la sonda fluorescente en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para el gen de la gpG del VHS2 mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó de analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA, que habían dado un resultado positivo para ADN de VHS2.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 20 muestras de sangre de donantes recogida en EDTA que eran supuestamente negativas (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lion, Francia) y habían dado un resultados positivo a un bajo título de ADN de VHS2 con el producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra de sangre se utilizó para llevar a cabo el análisis entero, a saber, extracción con el «EXTRAblood» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA positiva para ADN de VHS2	20	20	0

Todas las muestras enriquecidas se detectaron correctamente como positivas para ADN de VHS2. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS032PLD

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «IQC032RH» de ELITechGroup S.p.A., 30 muestras de plasma negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV08-12» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 30 muestras de sangre negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV08-12» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITe STAR**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VHS2	22	22	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VHS2	30	30	0
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS2	30	29	0

Una muestra positiva para VHS2 resultó ser no válida.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 21 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VHS2 que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV2MQP01 - High» del producto «Molecular Q Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), 30 muestras de plasma negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV08-12» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 32 muestras de sangre negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV08-12» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y la muestra «HSV10-01» del producto «QCMD 2010 Herpes Simplex Human Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITe GALAXY**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VHS2	21	21	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VHS2	30	30	0
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS2	32	32	0

Todas las muestras enriquecidas se detectaron correctamente como positivas para ADN de VHS2.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

Especificidad analítica: ausencia de marcadores potencialmente interferentes con reactividad cruzada

La especificidad analítica del ensayo, definida como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, se evaluó comparando las secuencias con bases de datos de nucleótidos.

El análisis de la alineación de las secuencias de los cebadores y de la sonda fluorescente con las secuencias disponibles en las bases de datos de microorganismos diferentes del VHS2, inclusive los genomas completos del VHS1 y del VVZ, el virus del herpes humano que es más similar al VHS2, mostró especificidad y ausencia de homología reseñables.

La especificidad analítica del ensayo, definida como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, se evaluó analizando un panel de eficacia.

La especificidad analítica se evaluó utilizando como material de referencia calibrado un panel que incluía muestras positivas para VHS1 y positivas para VVZ (producto «QCMD 2007 Herpes Simplex Virus EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó en duplicados, realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se incluyen en el apartado «Sensibilidad analítica: reproducibilidad con un material de referencia calibrado».

No se detectó reactividad cruzada con muestras positivas para VHS1 y VVZ.

HSV2 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS032PLD

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras negativas, se analizó utilizando algunas muestras clínicas negativas para ADN de VHS2, así como muestras de sangre recogida en EDTA que habían dado un resultado negativo para ADN de VHS2.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 24 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes supuestamente negativas para ADN de VHS2 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lion, Francia). Cada muestra de sangre se utilizó para llevar a cabo el análisis entero, a saber, extracción con el «**EXTRAblood**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VHS2	24	0	24

Todas las muestras se detectaron como negativas para ADN de VHS2.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 24 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VHS2, 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VHS2 y 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VHS2 (que se habían analizado con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITe STAR**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VHS2	24	0	24
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VHS2	30	0	30
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VHS2	30	0	30

Todas las muestras se detectaron como negativas para ADN de VHS2.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo que eran negativas para ADN de VHS2, 34 muestras de plasma recogido en EDTA que eran supuestamente negativas para ADN de VHS2 y 36 muestras de sangre recogida en EDTA que eran supuestamente negativas para ADN de VHS2. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITe GALAXY**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VHS2	22	0	22
Plasma recogido en EDTA supuestamente negativo para ADN de VHS2	34	0	34
Sangre recogida en EDTA supuestamente negativa para ADN de VHS2	36	0	36

Todas las muestras se detectaron correctamente como negativas para ADN de VHS2.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

Nota: los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «HSV2 ELITe MGB Kit», FTP RTS032PLD.

HSV2 ELITE MGB® KitReactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

Roche cobas z 480 analyzer

MUESTRAS Y CONTROLES

MuestrasEste producto debe utilizarse con **ADN extraído** de las muestras clínicas siguientes:**Sangre recogida en EDTA**

Las muestras de sangre para la extracción de ADN deben recogerse en EDTA e identificarse de acuerdo con las prácticas para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

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

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse de +2 °C a +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

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

Sustancias interferentes

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

Controles de amplificación

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

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

Para el control positivo, utilizar el producto «**HSV2 - ELITE Positive Control**» o, de manera alternativa, el producto «**HSV2 - ELITE Positive Control RF**» o el producto «**HSV2 ELITE Standard**».

HSV2 ELITE MGB® KitReactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis de cada sesión de extracción y amplificación, analizando los controles del proceso, como una muestra que tenga un resultado negativo y una que tenga uno positivo o un material de referencia calibrado.

PROCEDIMIENTO**Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real**

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

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

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

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

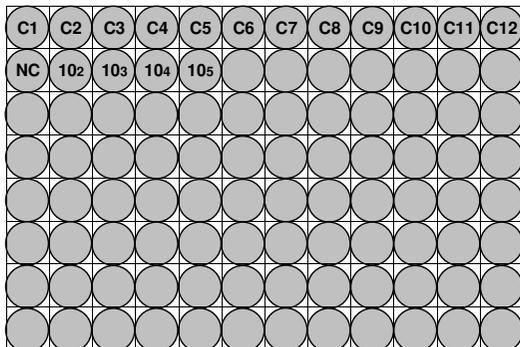
Nota: la adquisición de fluorescencia se produce de forma individual; configurar la velocidad de rampa «Ramp Rate» (°C/s) a 4,4 °C/s.

- seleccionar los canales de detección de la señal: «detector» para el sensor de VHS2 con el «channel FAM 465-510» y «detector» para el sensor del control interno IC con «channel VIC 540-580»;

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

Nota: para determinar la concentración de ADN en la muestra de origen, es necesario realizar varias reacciones con el calibrador «**Q-PCR Standard**» (10⁵ copias, 10⁴ copias, 10³ copias, 10² copias) a fin de obtener la **curva de calibración**.

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



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

Configuración de la amplificación

Esta tarea debe realizarse en la extracción/preparación del área de reacción de amplificación.

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

- Recuperar y descongelar las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar las probetas que contienen la mezcla «**HSV2 Q - PCR Mix**» que se necesita para la sesión, recordando que cada una de ellas es suficiente para realizar **25 reacciones**. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar las probetas que contienen el producto «**HSV2 - Positive Control**» o, de manera alternativa, el producto «**HSV2 - ELITe Positive Control RF**» o las probetas que contienen el producto «**HSV2 Q - PCR Standard**». Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Recuperar la **placa AD** que va a utilizarse en la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.

1. Sin que se formen burbujas y colocándola con precisión en el fondo, verter **20 µL** de la mezcla de reacción «**HSV2 Q - PCR Mix**» en los pocillos de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**.

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

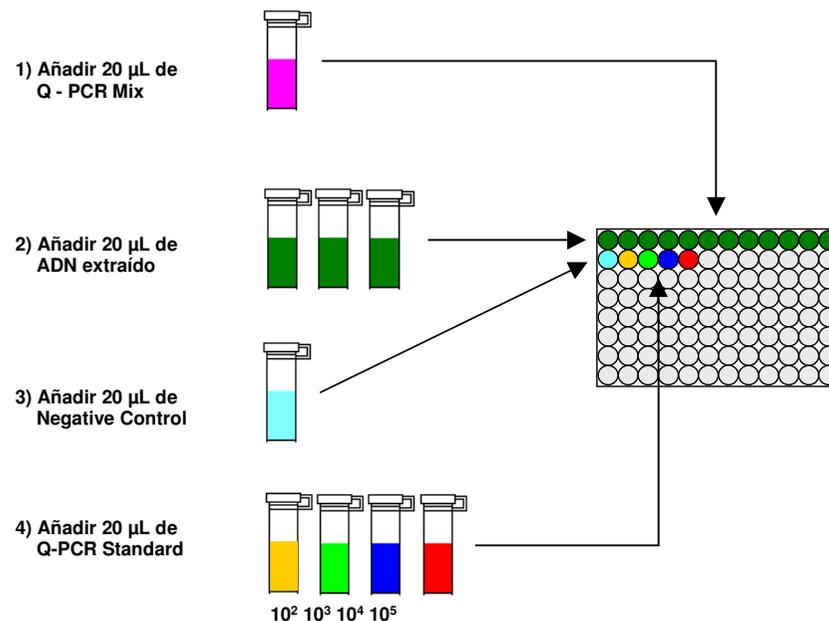
2. Colocándola con precisión en la mezcla de reacción, verter **20 µL** de **ADN extraído** de la primera muestra en el pocillo correspondiente de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** tres veces en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

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

- Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:
 - Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de VHS2), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «**HSV2 - Positive Control**» o, de manera alternativa, el producto «**HSV2 - ELITe Positive Control RF**» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando el producto «**HSV2 - Positive Control**» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
 - Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación de ADN de VHS2), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «**HSV2 - PCR Standard 10²**» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el calibrador pipeteando el calibrador «**HSV2 Q - PCR Standard 10²**» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma manera con los demás calibradores «**HSV2 Q - PCR Standard**» (10³, 10⁴, 10⁵).
- Sellar cuidadosamente la **placa AD** con **película selladora**.
- Transferir la **placa AD** al termociclador en tiempo real en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación y comenzar el ciclo térmico de la amplificación guardando la configuración de la sesión con un nombre de archivo único y reconocible (por ejemplo «año-mes-día-VHS2-EGSpA»).

Nota: al finalizar el ciclo térmico, la **placa AD** y los productos de la reacción deben extraerse del instrumento y eliminarse sin contaminar el medio ambiente. Para evitar que se produzcan fugas de los productos de reacción, **no retirar la película de sellado de la microplaca de amplificación**.

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



Análisis de los resultados cualitativos

Los valores de fluorescencia emitidos registrados por el detector de VHS2 y el detector del Internal Control (IC) durante las reacciones de amplificación deben analizarse con el software del instrumento.

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

Seleccionar el grupo de muestras que se quiere analizar.

De acuerdo con la documentación del instrumento, antes de comenzar el análisis es necesario realizar las siguientes operaciones:

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

Para muestras de **plasma**:

- Configurar manualmente los campos «Threshold» y «Noiseband» para el detector FAM «HSV2» en **0.55**.
- Configurar manualmente los campos «Threshold» y **Noiseband** para el detector VIC «IC» en **1.2**.

Para muestras de **sangre**:

- Configurar manualmente los campos «Threshold» y «Noiseband» para el detector FAM «HSV2» en **0.80**.
- Configurar manualmente los campos «Threshold» y **Noiseband** para el detector VIC «IC» en **1.5**.

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

Los valores de **Ct** para el VHS2 en las reacciones de amplificación de los cuatro calibradores «**Q-PCR Standard**» se utilizan para calcular la **curva de calibración** («Results > Standard Curve») de dicha sesión de amplificación y validar la amplificación y la detección tal como se muestra en la tabla siguiente:

Reacción Q - PCR Standard 10 ⁵ Detector «HSV2»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Positive Control** es **Ct > 25** o **Ct Undetermined** para el VHS2, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante los pasos de amplificación o detección (dosificación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

* **Nota:** cuando este producto se utiliza para la cuantificación de ADN de VHS2, se configuran las reacciones de «**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 10⁵**» (**Ct ≤25**).

Durante la reacción de amplificación del **Negative Control**, el valor de **Ct** para el VHS2 (ventana «Analysis») sirve para validar la amplificación y la detección, tal como se muestra en la tabla siguiente:

Reacción del Negative Control Detector «HSV2»	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 VHS2, significa que se ha detectado la presencia del ADN diana. Se han producido problemas durante la fase de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir de la fase de amplificación.

Durante las reacciones de amplificación para cada **muestra**, el valor de **Ct** del VHS2 se utiliza para detectar la presencia de ADN diana, mientras que el valor de **Ct** del Internal Control se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

Nota: utilizar el software del instrumento (ventana «Analysis») para comprobar que el valor de **Ct** se haya determinado mediante un aumento rápido y regular de los valores de fluorescencia y no mediante picos o un aumento de la señal de fondo (fondo irregular o alto).

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

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ADN de VHS2
Detector «HSV2»	Detector «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

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VHS2 y **Ct > 35** o **Ct Undetermined** para el Internal Control, significa que no ha sido posible detectar correctamente el ADN del Internal Control. En este caso, se han producido problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficaz o nula) o durante el paso de extracción (degradación del ADN de la muestra, muestra con un número insuficiente de células, reducción del título de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el ADN extraído), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra es no idónea, el ensayo es no válido y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VHS2 y **Ct ≤35** para el Internal Control, significa que el ADN de VHS2 no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VHS2 presente una concentración inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Características de rendimiento»). En este caso el resultado podría ser un falso negativo.

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

Nota: si se detecta ADN de VHS2 durante la reacción de amplificación de una muestra, la amplificación del Internal Control puede producir un resultado de «Ct > 35» o «Ct Undetermined». De hecho, la reacción de amplificación del Internal Control de baja eficiencia puede eliminarse a partir de la competencia con la reacción de alta eficiencia del VHS2. En este caso, la muestra será de todas maneras idónea y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis de los resultados cuantitativos

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

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

Los valores de **Ct** para el VHS2 en las reacciones de amplificación de cada **muestra** y la **curva de calibración** (botón «Standard Curve») de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ADN diana presente en las reacciones de amplificación relacionadas con las muestras.

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

Resultado de la muestra Detector FAM «HSV2»	Copias de VHS2 por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1.0 × 10 ¹ ≤ cantidad ≤ 1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad >1,0 × 10 ¹	MENOS DE 10

Los resultados (cantidad) relacionados con cada muestra (ventana «Analysis») sirven para calcular las copias de VHS2 presentes en la muestra origen (Nc) según la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

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

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

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

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

Si se utilizan muestras de sangre recogida en EDTA o de plasma recogido en EDTA y el sistema de extracción «MagNA Pure 24» y el resultado debe expresarse en copias/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y plasma y el MagNA Pure 24

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección

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

La sensibilidad analítica de este ensayo, como límite de detección, se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a una concentración de 10 copias/20 µL en 150.000 copias de globina beta/20 µL. Esta muestra se utilizó en 27 duplicados realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias de ADN plasmídico + 150.000 copias de globina beta	27	27	0

Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

La sensibilidad analítica de este ensayo, expresada como rango de medición lineal, permite cuantificar de unas 25.000.000 a 25 copias en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

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

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

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

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

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

Las conversiones de copias/mL a copias/reacción y viceversa se calcularon tal como se muestra en la página 39.

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión de este ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando diferentes duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual (%CV) medio máximo de los valores de Ct inferior al 1 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La precisión de este ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual medio (%CV) de las cantidades medidas de alrededor del 9 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La exactitud de este ensayo, expresada como la diferencia entre la media de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra y el valor de concentración teórico de la muestra, permitió obtener un porcentaje de inexactitud media de la cantidad logarítmica medida de alrededor del 6,4 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

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

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, definida como la reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el producto «HSV2 Molecular 'Q' Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático MagNA Pure 24 y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «MagNA Pure 24»	
Muestra	Positivos/Duplicados
HSV2MQP01-High	2/2
HSV2MQP01-Medium	2/2
HSV2MQP01-Low	2/2
HSV2MQP01-Negative	0/2

Todas las muestras se detectaron correctamente.

La sensibilidad analítica del ensayo, definida como la reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2017 Herpes Simplex Virus DNA Panel» (HSV DNA 17S Ltd, Reino Unido), un panel de diluciones de VHS2. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático MagNA Pure 24 y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «MagNA Pure 24»		
Muestra	Estado de la muestra	Positivas/Duplicados
HSVDNA17S-01	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA17S-02	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA17S-03	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA17S-04	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA17S-05	Positivo para VHS1, negativo para VHS2	0/2
HSVDNA17S-06	VHS2 detectado con frecuencia	2/2
HSVDNA17S-07	VHS2 detectado con frecuencia	2/2
HSVDNA17S-08	VHS2 detectado con frecuencia	2/2
HSVDNA17S-09	VHS2 detectado	2/2
HSVDNA17S-10	VHS2 detectado con frecuencia	2/2

Todas las muestras se detectaron correctamente.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV2MQP01-High» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VHS2, que se enriquecieron con ADN de VHS2 añadiendo la muestra «HSV2MQP01-High» (Qnostics Ltd, Reino Unido).

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

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS2	30	30	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VHS2	30	30	0

Todas las muestras fueron válidas en el primer análisis y se confirmaron como positivas para ADN de VHS2.

La sensibilidad diagnóstica total del ensayo fue del 100 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 40 muestras de sangre recogida en EDTA supuestamente negativas para ADN de VHS2, así como 34 muestras de plasma recogido en EDTA supuestamente negativas para ADN de VHS2.

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

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA supuestamente negativa para ADN de VHS2	40	0	40
Plasma recogido en EDTA supuestamente negativo para ADN de VHS2	34	0	34

Todas las muestras fueron válidas en el primer análisis y se confirmaron como negativas para ADN de VHS2.

La especificidad diagnóstica total del ensayo fue del 100 %.

Nota: los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «HSV2 ELITe MGB Kit», FTP RTS032PLD.

BIBLIOGRAFÍA

E. Aurelius et al. (1993) *J. Med. Virology* **39**: 179 - 186
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

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 el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: suspensiones de leucocitos, suspensiones de granulocitos y líquido amniótico.

Utilizar este producto únicamente con los instrumentos validados y las muestras clínicas asociadas que se indican en la sección «Muestras y controles».

No se dispone de datos sobre la inhibición provocada por antiviricos, 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 para la extracción de ácidos nucleicos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de amplificación en tiempo real utilizado en este producto puede desarrollar contaminación cruzada con las muestras positivas para VHS2, los controles positivos y los propios productos de amplificación. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar la contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

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 ropa de trabajo y áreas que sean adecuadas para procesar muestras biológicas potencialmente infecciosas o productos químicos clasificados como peligrosos.

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

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

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo e instrumentos especiales para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

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

Un resultado negativo obtenido con este producto significa que no se ha detectado ADN de VHS2 en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VHS2 presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden ser «no válidos» debido a un error en el control interno, por lo que pueden necesitar un nuevo análisis y, en consecuencia, dar lugar a retrasos en la obtención de los resultados definitivos.

Los posibles polimorfismos en la región del genoma vírico cubierto por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección de ADN de VHS2.

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

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

No se ha detectado ADN diana en las reacciones del Positive Control ni del calibrador «Q-PCR Standard», o el coeficiente de correlación de la curva de calibración no es válido

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

ADN de la diana detectado en la reacción del Negative Control

Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra. Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra. Prestar atención al distribuir las muestras, los controles negativos, los controles positivos y los estándares en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.
Configuración incorrecta de la sesión en el ELITe InGenius.	Comprobar la posición de la mezcla de reacción o la del control negativo. Comprobar el volumen de la mezcla de reacción o el del control negativo.
Error al configurar el instrumento	Revisar las configuraciones de la posición de las muestras, los controles negativos, los controles positivos y los estándares en el instrumento.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Proceder con cuidado al sellar la microplaca.
Contaminación del agua para biología molecular.	Utilizar una nueva alícuota de agua.
Contaminación de la mezcla de reacción.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de reacción.
Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación.	Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

HSV2 ELITe MGB® KitReactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

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

Niveles irregulares o altos de fluorescencia de fondo en las reacciones	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta de la muestra.	Mezclar con cuidado las muestras, los controles negativos y los controles positivos o los calibradores en la mezcla de reacción, pipeteando tres veces. Evitar la formación de burbujas.
Error de configuración del punto de referencia.	Configurar el rango de cálculo de referencia entre los ciclos en los que la fluorescencia de fondo ya se ha estabilizado (comprobar los datos de «Results» o «Component») y la fluorescencia de la señal aún no ha empezado a aumentar, p. ej., del ciclo 6 al ciclo 15. Utilizar el cálculo automático del punto de referencia configurando la opción «Auto Baseline».

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

HSV2 ELITe MGB® KitReactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

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

SÍMBOLOS

Número de catálogo



Límite superior de temperatura



Código de lote



Fecha de caducidad (último día del mes)

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Consejo relativa a los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.

Contenido suficiente para «N» análisis.



Atención: consultar las instrucciones de uso.



Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante

HSV2 ELITe MGB® KitReactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS032PLD

**AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA
LIMITADA**

Este producto contiene reactivos fabricados por Life Technologies Corporation, que se venden conforme a acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus afiliadas y Life Technologies Corporation. 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 la compra de una licencia de este producto para fines distintos de los establecidos anteriormente, contactar con Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Teléfono: +1 (760) 603-7200. Fax: +1 (760) 602-6500. Correo electrónico: outlicensing@thermofisher.com.

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

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

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

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

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

Ficol® es una marca registrada de GE Healthcare.

HSV2 ELITE MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS032PLD



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

A. Intended use

The «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELITE InGenius®** and **ELITE BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix


X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
96 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **ELITE InGenius®** instrument: INT030
- › **ELITE BeGenius®** instrument: INT040
- › **ELITE InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- › **ELITE InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- › **ELITE InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
- › **HSV2 - ELITE Standard:** STD032PLD
- › **HSV2 - ELITE Positive Control:** CTR032PLD
- › **CPE – Internal Control:** CTRCPE
- › **ELITE InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

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

G. Performance ELITE InGenius® and ELITE BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	171 cp / mL	171 – 25,000,000	96% 22/23*	100% 34/34*
Plasma	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 39/39*
CSF	119 cp /mL	119 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

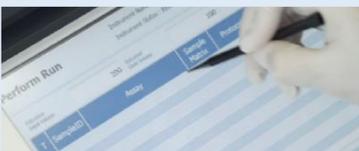
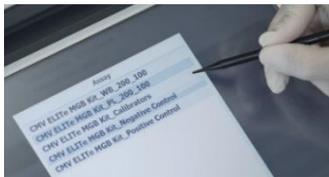
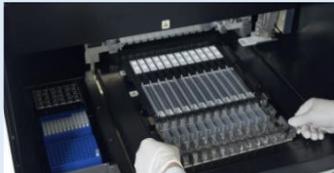
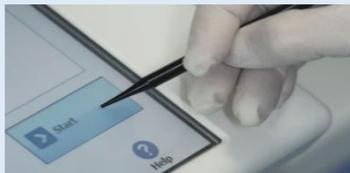
H. Procedures ELITE InGenius®

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

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"</p>	<p>2. Verify calibrators: HSV2 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HSV2 positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the Q- PCR-Mix and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	--	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

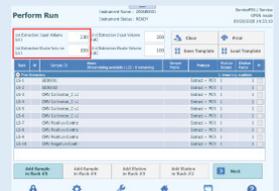
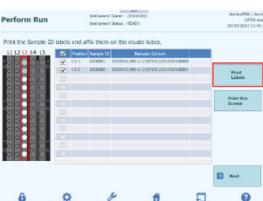
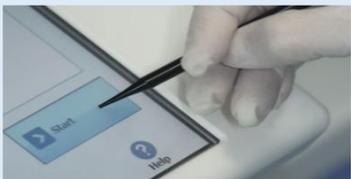
L. Procedures ELITE BeGenius®

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

Before analysis

<p>1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”</p>	<p>2. Verify calibrators: HSV2 Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: HSV2 pos. and neg. controls in the “Control menu” <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired</p>	<p>3. Thaw the HSV2 Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec</p>
--	---	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

<p>1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»</p> 	<p>2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active</p> 	<p>3. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “100 µL”</p> 
<p>4. Select the “Assay protocol” of interest</p>  <p>Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4</p>	<p>5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area</p> 	<p>6. Load the Q-PCR-Mix and the CPE Internal Control in Reagent Rack and insert it in the cooling area</p> 
<p>7. Load: Filter Tips, Extraction rack, and PCR rack</p> 	<p>8. Close the door. Start the run</p> 	<p>9. View, approve and store the results</p> 

Procedure 2 - PCR only

1. Select "Perform Run" on the touch screen and the click on the run mode «PCR Only»	2. Load the extracted nucleic acid barcoded tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area	3. Select the "Assay protocol" of interest
4. Load the Q-PCR-Mix in Reagent Rack and insert it in the cooling area Load filter tips and the PCR rack	5. Close the door. Start the run	6. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4 : Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" in the Assay Protocol selection screen.	6. Load the CPE Internal Control in the Elution Rack and insert it in the cooling area
7. Load : Filter Tips and the Extraction Rack	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample

HSV2 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS032PLD



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

A. Intended use

The «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIASymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx and 7300 PCR Instrument
- › ELITE STAR: INT010
- › ELITE STAR 200 extraction kit: INT011EX
- › ELITE GALAXY: INT020
- › ELITE GALAXY 300 extraction kit: INT021EX
- ›

- › HSV2 ELITE Standard: STD032PLD
- › HSV2 - ELITE Positive Control: CTR032PLD
- › CPE - Internal Control: CTCRPE
- › easyMAG - Generic protocol 2.0.1
- › QIASymphony - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › Molecular biology grade water

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	171 gEq/mL	100% (32/32)*	100% (36/36)*
	Plasma	119 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (21/21)*	100% (22/22)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITE Star	WB, Plasma, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITE Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIASymphony	Plasma	500 µL	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

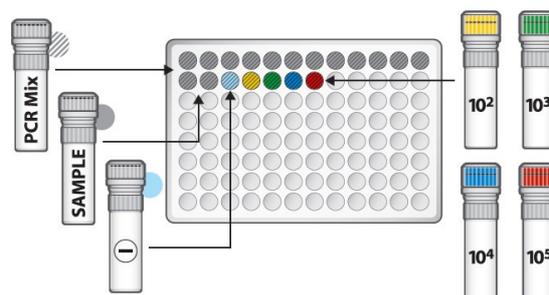
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridation step at 60°C

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

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

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HSV2 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	HSV2 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HSV2 Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	–	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The HSV2 Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ cp/reaction or approximately from 100 to 10⁷ cp/mL.

HSV2 ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS032PLD



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

A. Intended use

The «**HSV2 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 2 Herpes Simplex human virus (HSV2)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV2	Glicoprotein G (gpG)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole blood EDTA**
- › **Plasma EDTA**

D. Kit content

HSV2 Q-PCR Mix



X 4

Ready-to-use PCR Master Mix
4 tubes of 540 µL
100 reactions per kit
5 freeze-thaw cycles per tube

- › Maximum shelf-life: 24 months
- › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › **Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument**
- › **MagNA Pure 24 System**, software 1.0
- › **HSV2 - ELITE Positive Control**: CTR032PLD
- › **HSV2 ELITE Standard**: STD032PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (40/40)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
MagNA Pure 24	WB, Plasma	200 µL	350 µL	100 µL	20 µL

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

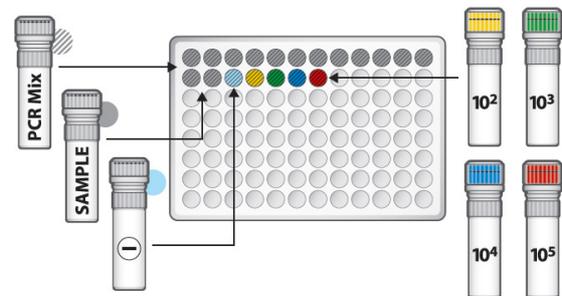
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV2" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

Stage	Temperature	Timing
Decontamination	50°C	2 min
Denaturation	94°C	2 min
Amplification and detection	94°C	10 sec
	60°C	30 sec
45 cycles	72°C	20 sec

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

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw HSV2 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet 20 µL of Q-PCR Mix in all microplate wells in use
4. Add, 20 µL of extracted DNA in sample wells, 20 µL of molecular grade water in Negative Control well, and 20 µL of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells
Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	HSV2 FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

*manually set the Threshold and Noiseband

Interpretation - Qualitative results

HSV-1 Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	-	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

*Repeat the assay starting from the extraction

Interpretation - Quantitative results

The HSV2 Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 100 to 10⁷ copies/mL.

