

NOTICE of CHANGE dated 03/06/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«PVB19 ELITe MGB[®] Kit»

Ref. RTS070PLD

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

- *Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius[®]» instrument (REF INT040) and amniotic fluid matrix.*

Update of PERFORMANCE CHARACTERISTICS (pag.16):

- *Linear measuring range*
 - *Conversion factor to International Units*
- *Addition of UDI information.*

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



Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit

Reactivos para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

UDI 08033891483623



ÍNDICE

USO PREVISTO
PRINCIPIO DEL ENSAYO
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO
MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO
MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO
OTROS PRODUCTOS NECESARIOS
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES
MUESTRAS Y CONTROLES PARA EL ELITe InGenius y el ELITe BeGenius
PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius
PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL ELITe InGenius y DEL ELITe BeGenius
MUESTRAS Y CONTROLES PARA OTROS SISTEMAS
PROCEDIMIENTOS CON OTROS SISTEMAS
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS
BIBLIOGRAFÍA
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
PROBLEMAS Y SOLUCIONES
SÍMBOLOS
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA
ANEXO: GUÍA RÁPIDA

página 1
página 2
página 2
página 2
página 2
página 3
página 4
página 5
página 8
página 14
página 19
página 26
página 28
página 37
página 44
página 44
página 46
página 49
página 50
página A

USO PREVISTO

El producto **Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* concebido para su uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cualitativo y cuantitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la **detección y la cuantificación de ADN de parvovirus humano B19 (PVB19)** de los genotipos 1, 2, 3a y 3b en muestras de ADN extraídas de muestras clínicas.

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

El ensayo también se ha validado con el **7300 Real-Time PCR System** y el **7500 Real-Time PCR Instrument** utilizando muestras humanas de sangre (periférica y de la médula ósea) recogida en EDTA y muestras de plasma recogido en EDTA.

Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

Este producto se utiliza como ayuda en el diagnóstico y el seguimiento de infecciones por parvovirus B19. Los resultados deben interpretarse en combinación con todas las observaciones clínicas pertinentes del paciente así como los resultados de otras pruebas de laboratorio.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este es un ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real para la detección de ADN de parvovirus, aislado de muestras y amplificado mediante el uso del reactivo de ensayo **PVB19 Q PCR Mix**, que contiene cebadores y sondas con la tecnología ELITe MGB.

Las sondas ELITe MGB se activan cuando se hibridan con los productos de PCR relacionados. El **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** controlan el aumento de fluorescencia y calculan el ciclo umbral (Ct) y las temperaturas de fusión (Tm). La cantidad de ADN de **PVB19** se calcula basándose en una curva de calibración almacenada.

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

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **Parvovirus B19 ELITe MGB Kit** incluye el reactivo del ensayo **PVB19 Q PCR Mix**, que es una mezcla de PCR optimizada y estabilizada que contiene los cebadores y las sondas específicos para:

- la región **VP1** del PVB19, detectada en el canal **PVB19**; la sonda se estabiliza mediante la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher® y se marca con el colorante FAM.
- el Internal Control (IC), específico para **el promotor y la región 5' UTR** del gen de la **globina beta humana**, detectado en el canal **IC**; la sonda se estabiliza mediante la tecnología MGB, se inactiva mediante el Eclipse Dark Quencher® y se marca con el colorante AquaPhluor® 525 (AP525).

La mezcla **PVB19 Q-PCR Mix** también contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos, el fluoróforo AP593 (análogo a ROX o a Cy5) como referencia pasiva para la normalización de la fluorescencia, la enzima N-uracil glucosidasa (UNG) para inactivar la contaminación provocada por el producto de amplificación y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot start»).

El producto **Parvovirus B19 ELITe MGB Kit** contiene suficientes reactivos para **96 análisis** en el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** (**24 análisis por cada probeta**) y para **100 análisis** en **otros sistemas** (**25 análisis por cada probeta**), cuando se utilizan 20 µL por cada reacción.

El producto **Parvovirus B19 ELITe MGB Kit** también puede utilizarse con instrumentos equivalentes.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
PVB19 Q - PCR Mix ref. RTS070PLD	Mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real en una probeta con tapón transparente	4 × 540 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.
- Centrifugadora de sobremesa (aproximadamente 13.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (0,5–10 µL, 2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

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

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

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

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

Instrumentos y software	Productos y reactivos
ELiTe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030) ELiTe InGenius Software , versión 1.3.0.17 (o posterior) PVB19 ELiTe_STD , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores PVB19 ELiTe_PC , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control PVB19 ELiTe_NC , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) para el análisis del Negative Control PVB19 ELiTe_WB_200_100 , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de sangre PVB19 ELiTe_AF_200_100 , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de líquido amniótico	ELiTe InGenius SP200 (EG SpA, ref. INT032SP200) ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set (EG SpA, ref. INT032CS) ELiTe InGenius PCR Cassette (EG SpA, ref. INT035PCR), ELiTe InGenius Waste Box (EG SpA, ref. F2102-000) Puntas 300 µL Filter Tips Axygen (Corning Life Sciences Inc., ref. TF-350-L-R-S), solo con el ELiTe InGenius 1000 µL Filter Tips Tecan (Tecan, Suiza, ref. 30180118), solo con el ELiTe BeGenius CPE – Internal Control (EG SpA, ref. CTRCPE) Parvovirus B19 ELiTe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD) Parvovirus B19 – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD)
ELiTe BeGenius (EG SpA ref. INT040) ELiTe BeGenius Software versión 2.1.0. (o posterior) PVB19 ELiTe_Be_STD , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de los calibradores PVB19 ELiTe_Be_PC , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis del Positive Control. PVB19 ELiTe_Be_NC , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) para el análisis del Negative Control PVB19 ELiTe_Be_WB_200_100 , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de sangre PVB19 ELiTe_Be_AF_200_100 , Assay Protocol (Protocolo de ensayo) con parámetros para el análisis de las muestras de líquido amniótico	
7300 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, ref. 4351101) QIAasymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, ref. 200111) ELiTe GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020) ELiTe STAR (EG SpA ref. INT010)	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies, ref. N8010560) CPE – Internal Control (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE) Parvovirus B19 ELiTe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD) Parvovirus B19 – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD) QIAasymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, ref. 931236) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) ELiTe GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX) InviMag Universal Kit/IG (INVITEK, ref. 2450120100).

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

Instrumentos y software	Productos y reactivos
7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, ref. 4406985) QIAasymphony® SP/AS (QIAGEN GmbH, ref. 9001297, 9001301) NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux SA, ref. 200111) ELiTe GALAXY (EG S.p.A., ref. INT020) ELiTe STAR (EG SpA ref. INT010)	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate con código de barras, 0,1 mL (Life Technologies, ref. 4346906) CPE – Internal Control (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE) Parvovirus B19 ELiTe Standard (EG SpA, ref. STD070PLD) Parvovirus B19 – ELiTe Positive Control (EG SpA, ref. CTR070PLD) QIAasymphony® Midi kit (QIAGEN GmbH, ref. 931236) NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux SA, ref. 280130, 280131, 280132, 280133, 280134, 280135) ELiTe GALAXY 300 Extraction Kit (EG S.p.A., ref. INT021EX) InviMag Universal Kit/IG (INVITEK, ref. 2450120100).

Un factor de conversión (Fc) permite expresar los resultados del análisis cuantitativo en unidades internacionales (UI) de PVB19 según el «Tercer estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19» (código NIBSC 12/208, Reino Unido).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

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

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

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

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

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

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

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

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

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

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

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

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

Cuando la sesión de amplificación se configura manualmente, es necesario disponer de batas de laboratorio, guantes y herramientas que se empleen exclusivamente para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación.

No llevar nunca batas de laboratorio, guantes ni herramientas del área asignada a la amplificación/detección de productos de amplificación al área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos específicos para las sesiones de trabajo. Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN. Los reactivos deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN. Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de extracción deben manipularse de manera que se reduzca al mínimo la dispersión hacia el entorno. Los cartuchos PCR Cassette deben manipularse con cuidado y no deben abrirse nunca para evitar la dispersión del producto de PCR hacia el entorno, así como la contaminación de muestras y reactivos.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

Componente	Temperatura de almacenamiento	Uso a partir de la primera apertura	Ciclos de congelación y descongelación	Estabilidad con carga (ELiTe InGenius y ELiTe BeGenius)
PVB19 Q PCR Mix	-20 °C o menos (protegido de la luz)	un mes	máximo cinco	Hasta cinco sesiones independientes* de tres horas cada una o hasta 7 horas consecutivas (2 sesiones de 3 horas cada una y el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión)

*Con congelación intermedia

MUESTRAS Y CONTROLES PARA EL ELiTe InGenius y el ELiTe BeGenius

Muestras

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

Muestra	Requisitos de obtención	Condiciones transporte/almacenamiento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	+2 / +8 °C	-20 °C ± 10 °C	-70 °C ± 15 °C
Sangre	EDTA	≤24 horas	≤3 días	≤30 días	≤30 días
Líquido amniótico	recogidas sin conservantes	≤4 horas	≤4 horas	≤30 días	≤30 días

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

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

Assay Protocols (Protocolos de ensayo) para el producto Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit					
Muestra	Instrumento	Transfere ncia de muestras	Nombre del Assay Protocol (Protocolo de ensayo)	Informe	Características
Sangre	ELiTe InGenius	No se necesita	PVB19 ELiTe_WB_200_100	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
	ELiTe BeGenius	No se necesita	PVB19 ELiTe_Be_WB_200_100	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
Líquido amniótico	ELiTe InGenius	Se necesita, en la «Extraction Tube» (Tubo de extracción)	PVB19 ELiTe_AF_200_100	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
	ELiTe BeGenius	Se necesita, en la probeta Sarstedt de 2 mL	PVB19 ELiTe_Be_AF_200_100	copias/mL o UI/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de elución extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

Siempre que sea necesario, es preciso verter 200 µL de muestra en la «Extraction Tube» (Tubo de extracción), en el caso del ELiTe InGenius, o en una probeta Sarstedt de 2 mL, en el caso del ELiTe BeGenius.

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

Nota: El volumen de la muestra en la probeta primaria varía en función del tipo de probeta que se haya cargado. Para obtener más información sobre cómo configurar y realizar el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones del kit de extracción o las instrucciones de uso del ELiTe InGenius y del ELiTe BeGenius.

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

Consultar «Sustancias potencialmente interferentes» en la sección «Características de rendimiento» para comprobar los datos relativos a tales sustancias.

Calibradores y controles de PCR

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

- Para la curva de calibración, utilizar los cuatro niveles del producto **Parvovirus B19 ELiTe Standard** (no incluido en este kit) con los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) **PVB19 ELiTe_STD** o **PVB19 ELiTe_Be_STD**.

Nota: las concentraciones del producto Q-PCR Standard se expresan en copias/reacción (10⁵ copias/reacción, 10⁴ copias/reacción, 10³ copias/reacción, 10² copias/reacción).

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

- Para el Positive Control, utilizar el producto **Parvovirus B19 - ELiTe Positive Control** (no incluido en este kit) con los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) **PVB19 ELiTe_PC** o **PVB19 ELiTe_Be_PC**.
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit) con los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) **PVB19 ELiTe_NC** o **PVB19 ELiTe_Be_NC**.

Nota: El **ELiTe InGenius** y el **ELiTe BeGenius** permiten generar y guardar la curva de calibración y validar el control de PCR para cada lote de reactivo de PCR. Las curvas de calibración caducan **a los 60 días**, después de los cuales es necesario volver a realizar la calibración.

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

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

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

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO CON EL ELiTe InGenius

El procedimiento para utilizar el producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit** con el instrumento **ELiTe InGenius** comprende tres pasos:

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

PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el **ELiTe InGenius** e iniciar sesión en el modo «CLOSED».
- En el menú «Calibration» (Calibración) de la página «Home» (Inicio), verificar que los calibradores (**PVB19 Q - PCR Standard**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **PVB19 PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de calibradores válidos para el lote de mezcla **PVB19 PCR Mix**, realizar la calibración tal como se describe en los apartados siguientes.
- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de la PCR (**PVB19 - Positive Control**, **PVB19 Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de PCR Mix que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **PVB19 PCR Mix**, procesar los controles de PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
 - Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «Muestras y controles»).

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

Existen protocolos para el análisis cualitativo a petición.

PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** puede utilizarse con el **ELiTe InGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- B. Sesión con la muestra eluida (PCR Only).
- C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

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

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

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PVB19 Q PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **24 análisis** en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

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

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

	A. Sesión de la muestra (Extract + PCR).	B. Sesión con la muestra eluida; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
1	Identificar las muestras y, en caso necesario, descongelar a temperatura ambiente, mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. En caso necesario, verter 200 µL de muestra en una «Extraction Tube» (Tubo de extracción) previamente etiquetada. Descongelar las probetas de CPE necesarias a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones.	Descongelar la «Elution Tube» (Tubo de extracción) que contiene los ácidos nucleicos extraídos a temperatura ambiente. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.
2	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
4	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.	Para cada muestra, asignar un carril e introducir el «SampleID» o SID (ID de la muestra), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.
5	Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».	Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles».
6	Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» (Protocolo) sea «Extract + PCR» (Extracción + PCR).	Seleccionar «PCR Only» (Solo PCR) en la columna «Protocol» (Protocolo).
7	En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar la posición de carga «Extraction Tube» (Tubo de extracción) para la muestra. Asegurarse de que la opción «Dilution factor» (Factor de dilución) esté configurada a «1».	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]). Asegurarse de que la opción «Dilution factor» (Factor de dilución) esté configurada a «1».
8	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
9	Cargar el CPE y la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote del CPE y de la mezcla PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) del «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
12	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.

13	Cargar el PCR Cassette, los cartuchos de extracción ELiTe InGenius SP 200, así como todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse.	Cargar el PCR Cassette y las «Elution Tube» (Tubo de elución) con las muestras extraídas.
14	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
15	Cerrar la puerta del equipo.	Cerrar la puerta del equipo.
16	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

	C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)	D. Sesión del Positive Control y del Negative Control modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
1	Descongelar las probetas necesarias de Q-PCR Standard (Cal1: Q-PCR Standard 10 ² , Cal2: Q-PCR Standard 10 ³ , Cal3: Q-PCR Standard 10 ⁴ , Cal4: Q-PCR Standard 10 ⁵) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.	Descongelar las probetas de Positive Control a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado. Preparar el Negative Control vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en la «Elution Tube» (Tubo de elución) que se incluye con el ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).	Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
3	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.	Asegurarse de que «Extraction Input Volume» (Volumen inicial de extracción) esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume» (Volumen de elución extraído), a 100 µL.
4	Para el calibrador Q-PCR, asignar el carril («Track»), seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo) y, después, rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de los reactivos.	Seleccionar el Assay Protocol (Protocolo de ensayo) en la columna «Assay» (Ensayo); consultar la sección «Muestras y controles». Introducir el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control y del agua para biología molecular.
5	En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR).	En la columna «Protocol» (Protocolo), asegurarse de que esté seleccionado «PCR Only» (Solo PCR).
6	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).	Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» (Posición de la muestra) sea «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]).
7	Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.	Cargar la PCR Mix en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) en función de la «Load List» (Cargar lista) y, después, introducir el número de lote de la PCR Mix, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta.
8	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
9	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	Cargar el PCR Cassette y las probetas de Q-PCR Standard.	Cargar el PCR Cassette, el Positive Control y el Negative Control.
12	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
13	Cerrar la puerta del equipo.	Cerrar la puerta del equipo.
14	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

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

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

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

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

Nota: el calibrador **PVB19 Q-PCR Standard** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 2 horas cada una.

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

Nota: el componente **PVB19 Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

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

PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

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

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display». En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

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

El instrumento **ELiTe InGenius** genera los resultados con el producto **PVB19 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
- C. Validación de los resultados de las muestras
- D. Elaboración de los informes de resultados de las muestras

A. Validación de la curva de calibración

El **ELiTe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del calibrador utilizando los parámetros del Assay Protocol (Protocolo de ensayo) **PVB19 ELiTe STD**. La relación Ct a concentración resultante da lugar a la curva de calibración.

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

La curva de calibración caduca a los 60 días.

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

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

El **ELiTe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana de las reacciones del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros de los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) **PVB19 ELiTe_PC** y **PVB19 ELiTe_NC**. Los valores de Ct resultantes se convierten en concentraciones y se utilizan para verificar el sistema (lote de reactivos e instrumento).

Los resultados del Positive Control y del Negative Control, específicos para el lote de reactivos de PCR, se guardan en la base de datos («Calibration»), por lo que el personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede verlas siguiendo las instrucciones de la interfaz.

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

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

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

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

C. Validación de los resultados de la muestra

El **ELiTe InGenius Software** interpreta los resultados de la PCR para la diana (canal **PVB19**) y el Internal Control (canal **IC**) con los parámetros de los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) **PVB19 ELiTe_WB_200_100** y **PVB19 ELiTe_AF_200_100**. Los valores resultantes del Ct de la diana se convierten en concentración.

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

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

1) Curva de calibración	Estado
PVB19 Q-PCR Standard	APROBADO
2) Positive Control	Estado
PVB19 Positive Control	APROBADO
3) Negative Control	Estado
PVB19 Negative Control	APROBADO

El **ELiTe InGenius Software** interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del los Assay Protocols (Protocolos de ensayo).

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

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

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
PVB19: DNA Detected, quantity equal to XXX copies / mL or IU / mL (PVB19:ADN detectado, cantidad igual a "XXX" copias/mL)	Se ha detectado ADN de PVB19 en la muestra dentro del rango de medición del ensayo y se indica su concentración.
PVB19: DNA Detected, quantity below LLoQ copies / mL or IU / mL (PVB19:ADN detectado, cantidad por debajo de "LLoQ" copias/mL)	Se ha detectado ADN de PVB19 en la muestra, pero su concentración se encuentra por debajo del límite inferior de cuantificación del ensayo.
PVB19: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies / mL or IU / mL (PVB19:ADN detectado, cantidad alé de "ULoQ" copias/mL)	Se ha detectado ADN de PVB19 en la muestra, pero su concentración se encuentra por encima del límite superior de cuantificación del ensayo.
PVB19: DNA Not detected or below LoD copies / mL or IU / mL (PVB19:ADN no detectado o por debajo de "LoD" copias/mL)	No se ha detectado ADN de PVB19 en la muestra. La muestra es negativa para el ADN diana, o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
Invalid-Retest Sample (No válido-Volver a probar muestra)	Resultado no válido del ensayo causado por un fallo en el Internal Control (p. ej., debido a una extracción incorrecta o al arrastre de inhibidores). Es necesario repetir la prueba.

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

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

Las muestras que se notifican como «PVB19: DNA Not Detected or below LoD copies/mL» (PVB19:ADN no detectado o por debajo de "LoD" copias/mL) son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ADN de PVB19. En este caso, puede que la muestra sea negativa para ADN de PVB19, o que el ADN de PVB19 presente una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar la sección «Características de rendimiento»).

Si se detectan muestras positivas para ADN de PVB19 a una concentración inferior al límite de detección (y al límite inferior de cuantificación) del ensayo, estas se notifican como «PVB19: DNA Detected, quantity below "LLoQ" copies/mL» (PVB19:ADN detectado, cantidad por debajo de "LLoQ" copias/mL) (consultar la sección «Características de rendimiento»).

Las muestras positivas para ADN de PVB19 dentro del rango de medición lineal se detectan y notifican como «PVB19: DNA Detected, quantity equal to "XXX" copies / mL» (PVB19:ADN detectado, cantidad igual a "XXX" copias/mL) (consultar «Características de rendimiento»).

Las muestras positivas para ADN de VPB19 se encuentran por encima del límite superior de cuantificación se notifican como «PVB19: DNA Detected, quantity beyond "ULoQ" copies/mL» (PVB19:ADN detectado, cantidad alé de "ULoQ" copias/mL) y no son aptas para la cuantificación. En caso necesario, es posible diluir la muestra antes de la extracción o de la PCR y volver a analizarla para obtener resultados dentro del rango de medición lineal del ensayo (consultar «Características de rendimiento»).

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

Los resultados de la muestra se guardan en la base de datos y, si son válidos, pueden ser aprobados (en la ventana «Results Display») por personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst»), siguiendo las instrucciones de la interfaz. La ventana «Results 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 la muestra

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

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

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

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

PROCEDIMIENTO CON EL ELiTe BeGenius

El procedimiento para utilizar el producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** con el instrumento **ELiTe BeGenius** comprende tres pasos:

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

PASO 1. Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el **ELiTe BeGenius** e iniciar sesión en el modo «CLOSED».

- En el menú «Calibration» (Calibración) de la página «Home» (Inicio), verificar que los calibradores (**PVB19 Q - PCR Standard**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **PVB19 PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de calibradores válidos para el lote de mezcla **PVB19 PCR Mix**, realizar la calibración tal como se describe en los apartados siguientes.

- En el menú «Controls» (Controles) de la página «Home» (Inicio), verificar que los controles de PCR (**PVB19 Positive Control**, **PVB19 Negative Control**) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de **PVB19 PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de PCR válidos para el lote de **PVB19 PCR Mix**, procesar los controles de PCR tal como se describe en los apartados siguientes.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (Protocolos de ensayo) proporcionados por EG SpA (consultar la sección «Muestras y controles»).

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

Existen protocolos para el análisis cualitativo a petición.

PASO 2. Configuración de la sesión

El producto **PVB19 ELITe MGB Kit** puede utilizarse en el **ELITe BeGenius** para realizar las siguientes tareas:

- A. Sesión de la muestra; modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR)
- B. Sesión con la muestra eluida (PCR Only).
- C. Sesión de calibración; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)
- D. Sesión para el Positive Control y el Negative Control; modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR)

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

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

Antes de configurar una sesión:

Descongelar las probetas necesarias de **PVB19 PCR Mix** a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para **24 análisis** en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado, centrifugar el contenido durante 5 segundos y, después, conservarlo en hielo o en el bloque refrigerado.

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

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

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

15	Cargar el CPE y la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
16	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix o cada CPE, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en el Lane 2 (L2) de la «Cooler Unit» o, si está disponible, en el Lane 1 (L1). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
17	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
18	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
19	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
20	Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).
21	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
22	Cargar la «Extraction Rack» (contenedores de extracción) con los cartuchos de extracción ELiTe InGenius SP 200 y los consumibles de extracción necesarios.	No aplicable
23	Cerrar la puerta del equipo.	Cerrar la puerta del equipo.
24	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

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

10	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
11	Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).	Cargar la PCR Mix en la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución).
12	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en la «Cooler Unit», en el Lane 2 (L2). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).	Insertar la «Reagent/Elution Rack» (rejilla de reactivos/elución) en la «Cooler Unit», en el Lane 2 (L2). En caso necesario, para cada PCR Mix, rellenar el «S/N» (número de serie), el «Lot No.» (número de lote), la «Exp. Date» (fecha de caducidad) y el «T/R» (número de reacciones).
13	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
14	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.	Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (rack de puntas) de la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas de puntas que corresponda.
15	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
16	Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).	Cargar la «PCR Rack» con el PCR Cassette en la «Inventory Area» (área del inventario).
17	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.	Hacer clic en «Next» (Siguiente) para continuar.
18	Cerrar la puerta del equipo.	Cerrar la puerta del equipo.
19	Pulsar «Start» (Inicio).	Pulsar «Start» (Inicio).

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

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

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

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

Nota: el calibrador **PVB19 Q-PCR Standard** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 2 horas cada una.

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

Nota: el componente **PVB19 Positive Control** puede utilizarse para 4 sesiones independientes de 3 horas cada una.

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

PASO 3. Evaluación y aprobación de los resultados

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

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display». En esta pantalla se muestran los resultados y la información de la sesión. Desde esta pantalla, es posible aprobar dichos resultados, así como imprimir o guardar los informes («Sample Report» o «Track Report»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

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

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

El instrumento **ELiTe BeGenius** genera los resultados con el producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** mediante el siguiente procedimiento:

- Validación de la curva de calibración
- Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
- Validación de los resultados de las muestras
- Elaboración de los informes de resultados de las muestras

Nota: consultar el mismo apartado del **procedimiento con el ELiTe InGenius** para obtener más información.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO CON EL ELiTe InGenius y ELiTe BeGenius

Sensibilidad analítica: Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) de la amplificación de ADN permite detectar la presencia de unas 10 copias en 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

El límite de detección de este ensayo se determinó en el ELiTe InGenius utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con un 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. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	24	24	0

Sangre recogida en EDTA

El valor teórico del LoD se verificó analizando en el ELiTe InGenius y en el ELiTe BeGenius un panel de muestras de sangre recogida en EDTA, que se enriquecieron con material de referencia de Parvovirus B19 (Tercer estándar internacional de la OMS, NIBSC) a la concentración declarada (125 IU/mL).

Los resultados se muestran en la tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de sangre y el ELiTe InGenius o el ELiTe BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA	125 UI/mL	20	20	20	0
	250 copias/mL				

Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana del producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit**, tanto en el ELiTe InGenius como en el ELiTe BeGenius. El LoD para la diana de PVB19 cuando se utilizan muestras de sangre se confirmó a 125 UI/mL, lo que equivale a 250 copias/mL.

El valor en copias/mL se calculó aplicando el factor de conversión específico indicado en el apartado «Sensibilidad analítica».

Líquido amniótico

La LoD del ensayo utilizado con líquido amniótico se determinó en el instrumento ELiTe InGenius, analizando un panel de muestras de líquido amniótico negativas para parvovirus B19 (PVB19) y enriquecidas con material de referencia de PVB19 (Tercer estándar internacional de la OMS, NIBSC).. Se realizó un análisis de regresión Probit en los resultados y el LoD se calculó como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

Los resultados se muestran en la tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de líquido amniótico y el ELiTe InGenius			
Diana	Límite de detección	Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
PVB19	40 UI/mL	35 UI/mL	50 UI/mL
	40 copias/mL	35 copias/mL	50 copias/mL

El LoD expresado en copias/mL para líquido amniótico se calculó aplicando el factor de conversión específico (1 UI/copia) indicado en el apartado «Sensibilidad analítica».

El valor calculado para el LoD se verificó analizando en el ELiTe InGenius y el ELiTe BeGenius un panel de muestras de líquido amniótico enriquecidas con material de referencia certificado de PVB19 (Tercer estándar internacional de la OMS, NIBSC) a la concentración declarada.

Los resultados obtenidos confirmaron la concentración declarada para la diana del producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit**, tanto en el ELiTe InGenius como en el ELiTe BeGenius.

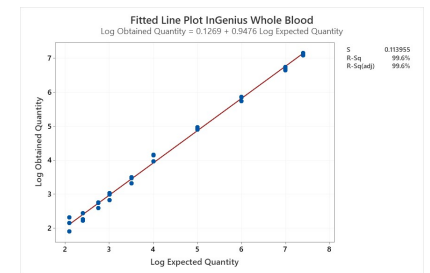
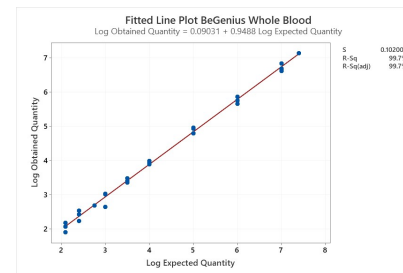
Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

El rango de medición lineal del ensayo se verificó con muestras de sangre y líquido amniótico en el ELiTe InGenius y el ELiTe BeGenius.

Sangre recogida en EDTA

El rango de medición lineal se verificó utilizando un panel de diluciones del material de referencia de PVB19 (Tercer estándar internacional de la OMS, NIBSC) en muestras negativas de sangre recogida en EDTA.

Los resultados se muestran en las figuras siguientes.



Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

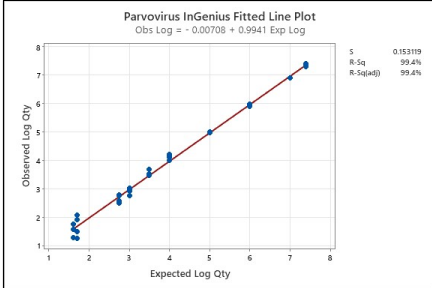
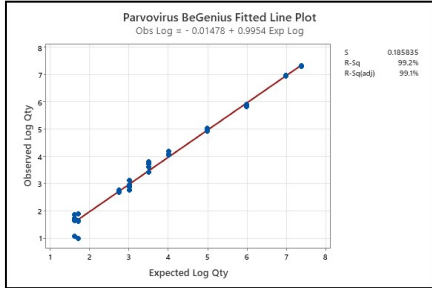
Rango de medición lineal para muestras de sangre y los instrumentos ELiTe InGenius y ELiTe BeGenius		
Unidad	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	125	25,000,000
copias/mL	250	50,000,000

El rango de medición lineal expresado en copias/mL para sangre recogida en EDTA se calculó aplicando el factor de conversión específico que se indica en el apartado siguiente.

Líquido amniótico

El rango de medición lineal se verificó utilizando un panel de diluciones del material de referencia de PVB19 (NIBSC) en muestras negativas de líquido amniótico.

Los resultados se muestran en las figuras siguientes.



Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de líquido amniótico y los instrumentos ELiTe InGenius y ELiTe BeGenius		
Unidad	Límite inferior	Límite superior
UI/mL	40	25,000,000
copias/mL	40	25,000,000

El rango de medición lineal expresado en copias/mL para líquido amniótico se calculó aplicando el factor de conversión específico que se indica en el apartado siguiente.

Repetibilidad

La repetibilidad dentro de las sesiones y entre sesiones del ensayo se evaluó en el ELiTe InGenius y el ELiTe BeGenius analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de PVB19 (Tercer estándar internacional, NIBSC).

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELiTe InGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8	35,81	0,52	1,46	100 %
10×LoD	8	34,31	0,28	0,83	100 %

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELiTe BeGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8	36,53	0,53	1,46	100 %
10×LoD	8	34,79	0,21	0,61	100 %

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

Repetibilidad entre sesiones con el ELiTe InGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	16	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	16	35,87	0,44	1,23	100 %
10×LoD	16	34,19	0,28	0,83	100 %

Repetibilidad entre sesiones con el ELiTe BeGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	16	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	16	36,40	0,45	1,23	100 %
10×LoD	16	34,68	0,27	0,79	100 %

En la prueba de repetibilidad, el producto Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit detectó la diana y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV del 1,46 %.

Reproducibilidad

La reproducibilidad entre instrumentos y entre lotes del ensayo se evaluó en el ELiTe InGenius y el ELiTe BeGenius analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA, inclusive una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de PVB19 (Tercer estándar internacional, NIBSC).

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

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELiTe InGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8	36,89	0,62	1,68	100 %
10×LoD	8	34,85	0,26	0,74	100 %

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELiTe BeGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8	37,00	0,37	1,00	100 %
10×LoD	8	35,14	0,51	1,46	100 %

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

Reproducibilidad entre lotes con el ELiTe InGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8	36,80	0,67	1,82	100 %
10×LoD	8	35,18	0,71	2,02	100 %

Reproducibilidad entre lotes con el ELiTe BeGenius					
Muestra	PVB19				
	N.	Ct medio	DE	%CV	% de concordancia
Negativas	8	N/A	N/A	N/A	100 %
3×LoD	8	37,41	0,27	0,72	100 %
10×LoD	8	35,31	0,32	0,90	100 %

En la prueba de reproducibilidad entre instrumentos y entre lotes, el producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB Kit** detectó correctamente todas las muestras tal como se esperaba y presentó una variación máxima de los valores de Ct de la diana como un %CV del 2,02 %.

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, definida como la reproducibilidad de valores de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «QCMD 2014 B19 Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), un panel de diluciones de PVB19. 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 en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión (Fc: 0,3 UI/copia) para el **ELiTe InGenius** y muestras de plasma y se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELiTe InGenius®				
Muestra	Consenso conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Muestras positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
B19DNA14-01	4,788	0,507	2/2	4,948
B19DNA14-02	2,878	0,437	2/2	2,902
B19DNA14-03	4,848	0,400	2/2	4,850
B19DNA14-04	Negativas	N/A	0/2	N/A
B19DNA14-05	5,802	0,465	2/2	5,847
B19DNA14-06	1,936	0,672	2/2	1,779
B19DNA14-07	3,913	0,371	2/2	3,955
B19DNA14-08	3,844	0,507	2/2	4,063

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

Factor de conversión a unidades internacionales

El factor de conversión (Fc) para notificar los resultados cuantitativos en unidades internacionales/mL, partiendo de copias/mL, se calculó en el **ELiTe InGenius** utilizando material de referencia calibrado y certificado de PVB19 (NIBSC).

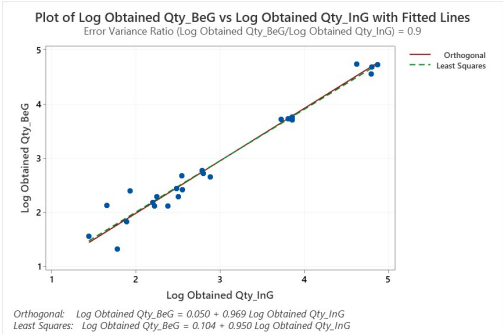
Sangre recogida en EDTA

El factor de conversión se determinó como 0,5 UI/copia en el **ELiTe InGenius** utilizando un panel de diluciones de material de referencia de PVB19 (Segundo estándar internacional de la OMS, NIBSC) en muestras negativas de sangre recogida en EDTA.

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

Factor de conversión a unidades internacionales, Fc = 0,5 UI/copia						
Muestra			Resultado			Diferencia logarítmica (referencia - prueba)
UI/mL	log UI/mL	N	Media de copias/mL	Media de UI/mL	Media de log UI/mL	
100000	5,0000	10	21,4661	107331	5,0210	-0,0210
10000	4,0000	10	21433	10716	4,0080	-0,0080
1000	3,0000	10	2136	1068	2,9850	+0,0150

El valor del factor de conversión se verificó en el **ELiTe InGenius** y el **ELiTe BeGenius** utilizando material de referencia calibrado y certificado (Tercer estándar internacional de la OMS, NIBSC), y se verificó desde 5.0000 Log UI/mL a 2.0970 Log UI/mL. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de regresión ortogonal y lineal con el fin de calcular la relación entre los métodos.



El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de 0,050 (IC del 95 %: 0,197; 0,296) y una pendiente de 0,969 (IC del 95 %: 0,889; 1,048). El análisis de regresión lineal generó un R² de 0,963.

Líquido amniótico

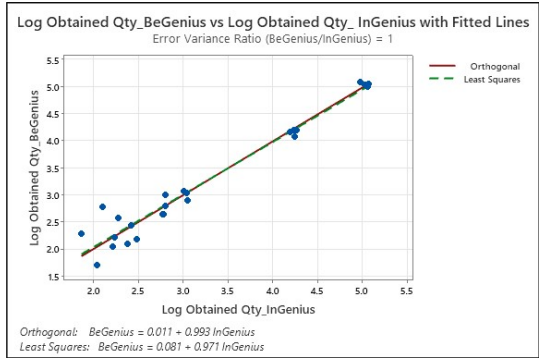
El factor de conversión se determinó como 1 UI/copia en el **ELiTe InGenius** utilizando un panel de diluciones de material de referencia de PVB19 (Tercer estándar internacional de la OMS, NIBSC) en muestras negativas de líquido amniótico.

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

Factor de conversión a unidades internacionales, Fc = 1 UI/copia						
Muestra			Resultado			Diferencia logarítmica (referencia - prueba)
UI/mL	log UI/mL	N	Media de copias/mL	Media de UI/mL	Media de log UI/mL	
316.228	5,5000	16	273,604	273604	5,4360	0,0640
100,000	5,0000	16	88,997	88,997	4,9470	0,0530
31,623	4,5000	16	34,559	34,559	4,5340	-0,0340
10,000	4,0000	16	11,089	11,089	4,0390	-0,0390
3,162	3,5000	15*	3,,704	3,704	3,5580	-0,0580
1,000	3,0000	16	932	932	2,9520	0,0480

*Un mismo resultado como valor atípico se excluyó del análisis.

El valor del factor de conversión se verificó en el **ELiTe InGenius** y el **ELiTe BeGenius** utilizando material de referencia calibrado y certificado (Tercer estándar internacional de la OMS, NIBSC), y se verificó desde 5.0000 Log UI/mL a 2.0970 Log UI/mL. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de regresión ortogonal y lineal con el fin de calcular la relación entre los métodos.



El análisis de regresión ortogonal generó una intersección de 0,0112 (IC del 95 %: 0,2879; 0,3103) y una pendiente de 0,9928 (IC del 95 %: 0,9046; 1,0810). El análisis de regresión lineal generó un R² de 0,957.

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

Factor de conversión a unidades internacionales con el ELiTe InGenius y el ELiTe BeGenius	
Matriz	Fc (UI copias)
Sangre	0,5
Líquido amniótico	1,0

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, expresada como confirmación de las muestras positivas, se evaluó utilizando el **ELiTe InGenius** y analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA y muestras clínicas de líquido amniótico, que se certificaron como positivas para la diana o se enriquecieron con material de referencia. Como el **ELiTe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELiTe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELiTe InGenius** también es aplicable al **ELiTe BeGenius**.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Muestras	N	Positivas	Negativas	% de sensibilidad diagnóstica
Sangre recogida en EDTA y enriquecida con ADN de PVB19	30	30	0	100
Líquido amniótico enriquecido con ADN PVB19	30	30	0	100

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

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

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Muestras	N	Positivas	Negativas	% de especificidad diagnóstica
Sangre recogida en EDTA y negativa para ADN de PVB19	30	0	30	100
Líquido amniótico negativo para el ADN de PVB19	30	0	30	100

El valor de corte para el Ct del IC se estableció a 35 para las muestras de sangre recogida en EDTA y para las muestras de líquido amniótico cuando se analizaron con el **ELiTe InGenius** y el **ELiTe BeGenius**.

MUESTRAS Y CONTROLES PARA OTROS SISTEMAS

Muestras

Este producto debe utilizarse con **ADN extraído** de las siguientes muestras clínicas: sangre (periférica y de médula ósea) recogida en EDTA y plasma recogido en EDTA.

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre (periférica y de la médula ósea) 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 a partir de muestras de sangre se realiza con el **ELiTe STAR** y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **UUNI_E100_S200_EL1**, 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 proteínas transportadora tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de muestras de sangre se realiza con el **ELiTe GALAXY** y la **versión 1.3.1 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el **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 + transportadora** tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para 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 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.

REF RTS070PLD

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

Parvovirus B19 ELITe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

PROCEDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS

- 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 (adquisición de fluorescencia)	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 PVB19 con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «PVB19».
- Configurar («Detector Manager») el «detector» para la sonda de Internal Control con el marcador («reporter») = «VIC» (AP525 es similar al VIC) y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «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 del ADN en la muestra inicial, configurar una serie de reacciones con los calibradores **Q-PCR Standard** (105 copias, 104 copias, 103 copias, 102 copias) a 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 fluorescencia («Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection») debe configurarse durante el paso de hibridación a 60 °C.

- Modificar la temporización como se indica en la tabla **«Ciclo térmico»**.
- Configurar el número de ciclos en **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

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

Antes de iniciar la sesión, es importante realizar lo siguiente:

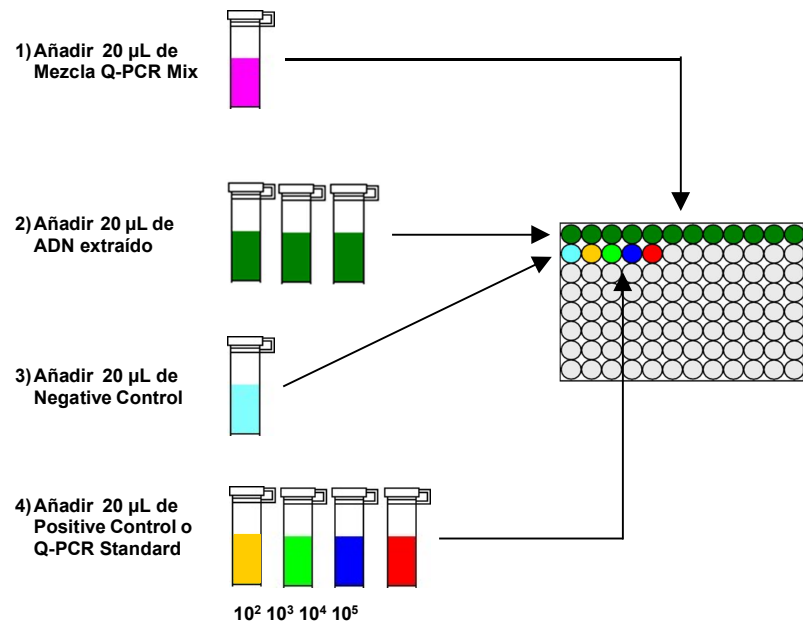
- Tomar y descongelar las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
 - Tomar y descongelar las probetas de **PVB19 Q - PCR Mix** necesarias para la sesión, teniendo en cuenta que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
 - Tomar y descongelar las probetas de **PVB19 - Positive Control** o de **PVB19 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 de forma exacta **20 µL** de mezcla **PVB19 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 de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de **ADN** extraído de la primera muestra en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma forma con otras muestras del **ADN extraído**.
 3. Pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de **agua de calidad para biología molecular** (no incluida en el volumen de suministro de este producto) en el pocillo de la **microplaca de amplificación** del control negativo de amplificación, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el Negative Control pipeteando el **agua de calidad para biología molecular** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.
 4. Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:
 - Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de PVB19), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de **PVB19 - Positive Control** en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el Positive Control pipeteando el producto **PVB19 - Positive Control** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación de ADN de PVB19), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de **PVB19 - 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 **PVB19 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 **PVB19 Q - PCR Standard (10³, 10⁴, 10⁵)**.

- Sellar de forma exacta la **microplaca de amplificación** con la **placa de sellado de amplificación**.
- 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-PVB19-EGSpA»).

Nota: al finalizar el ciclo térmico, la microplaca de amplificación que contiene los productos de reacción debe 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 figura siguiente muestra de forma esquemática la preparación de la reacción de amplificación.



Nota: si la preparación de la amplificación se realiza con el instrumento **QIAasymphony® 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 de las instrucciones de uso 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 las instrucciones de uso 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 PVB19 (detector FAM «PVB19») y por la sonda específica del Internal Control (detector VIC «IC») en las reacciones de amplificación deben analizarse con el software del instrumento.

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

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

Nota: en el caso de una muestra positiva con un alto título de ADN de PVB19, la fluorescencia FAM de la sonda específica del PVB19 puede empezar a aumentar antes del ciclo 15. En este caso, el rango de cálculo para el **punto de referencia** debe adaptarse del ciclo 6 al ciclo en el que la fluorescencia FAM de la muestra empieza a aumentar, según ha detectado 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 «PVB19» 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 «PVB19» 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 PVB19 («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 «PVB19»	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 PVB19, 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 Positive Control, degradación de la mezcla de reacción o del Positive Control, configuración incorrecta de la posición del Positive Control, 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 del ADN de PVB19, las reacciones de **Q - PCR Standard** se han configurado 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 PVB19 («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 «PVB19»	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 PVB19, significa que se ha detectado el ADN diana. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En la reacción de amplificación de cada **muestra**, el valor **Ct** del PVB19 se usa para detectar el ADN diana, mientras que el valor **Ct** del Internal Control se usa 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 de la región VP1 del PVB19 en la reacción de amplificación (límite de detección, véase 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	PVB19 DNA
detector FAM «PVB19»	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 PVB19 y **Ct > 35** o **Ct Undetermined** para el Internal Control, significa que ha sido imposible detectar correctamente el ADN para el Internal Control. En este caso, se han presentado problemas durante el paso de amplificación (amplificación no eficiente o ausente) o durante el paso de extracción (degradación del ADN muestra, muestra con un número no suficiente de células, reducción del título de ADN durante la extracción o la 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 PVB19 y **Ct ≤ 35** para el Internal Control, significa que no se ha detectado ADN de PVB19 en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de PVB19 tenga 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 PVB19, el Internal Control puede obtener el 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 PVB19. 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 PVB19 se utilizan para calcular la **curva estándar** («Results > Standard Curve») para la sesión de amplificación y validar la amplificación y la detección tal como se describe en la tabla siguiente:

Curva de calibración detector FAM «PVB19»	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 **Ct** del PVB19 en la reacción de amplificación de cada **muestra** y la **curva estándar** de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ADN diana presente en las reacciones de amplificación de las muestras.

Este producto puede cuantificar de 1.000.000 a 10 copias de ADN de la región VP1 del PVB19 en la reacción de amplificación (rango de medición lineal, consultar la sección «Características de rendimiento»), tal como se describe en la siguiente tabla:

Resultado de la muestra detector FAM «PVB19»	Copias de PVB19 por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1 × 10 ⁴ ≤ cantidad ≤ 1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad <1 × 10 ⁴	MENOS DE 10

Los resultados (**cantidad**) de cada **muestra** («Results > Report») se usan para calcular las copias de PVB19 presentes en la muestra extraída (**Nc**) según la siguiente fórmula:

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

Donde:

Vc es la cantidad de la muestra utilizada en la extracción con respecto a la unidad requerida de medición.

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

Ve es el volumen total del producto de extracción **expresado en µL**.

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

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

Cuando el **ELiTe STAR** se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA o muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado **expresado en copias/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre, plasma y el ELiTe STAR
Nc (copias/mL) = 28 × cantidad

Cuando el **ELiTe GALAXY** se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA o muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado **expresado en copias/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre, plasma y el ELiTe GALAXY
Nc (copias/mL) = 35 × cantidad

Cuando el sistema de extracción **NucliSENS® easyMAG®** se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado **expresado en copias/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma y el NucliSENS® easyMAG®
Nc (copias/mL) = 10 × cantidad

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

Fórmula simplificada para plasma y el QIAAsymphony® SP/AS
Nc (copias/mL) = 12 × cantidad

Cálculo de los límites del rango de medición lineal

Cuando se utiliza un método particular de extracción, los límites del rango de medición lineal se pueden calcular a partir del rango de medición lineal de la reacción de amplificación, según la siguiente fórmula:

$\text{Límite inferior (copias/mL)} = \frac{V_e \times 10 \text{ copias}}{V_c \times V_a \times E_p}$
$\text{Límite superior (copias/mL)} = \frac{V_e \times 1.000.000 \text{ copias}}{V_c \times V_a \times E_p}$

Cuando el sistema de extracción **ELiTe STAR** se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA o muestras de plasma recogido en EDTA, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (copias/mL) con el ELiTe STAR
Límite inferior (copias/mL) = 28 × 10 copias
Límite superior (copias/mL) = 28 × 1.000.000 copias
de 280 a 28.000.000 copias/mL

Cuando el sistema de extracción **ELiTe GALAXY** se utiliza con muestras de sangre recogidas en EDTA o muestras de plasma recogido en EDTA, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (copias/mL) con ELiTe GALAXY
Límite inferior (copias/mL) = 35 × 10 copias
Límite superior (copias/mL) = 35 × 1.000.000 copias
de 350 a 35.000.000 copias/mL

Cuando el sistema de extracción **NucliSENS® easyMAG®** se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA, la fórmula es la siguiente:

Límites del rango de medición (copias/mL) con el NucliSENS® easyMAG®
Límite inferior (copias/mL) = 10 × 10 copias
Límite superior (copias/mL) = 10 × 1.000.000 copias

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 (copias/mL) con el QIAAsymphony® SP/AS
Límite inferior (copias/mL) = 12 × 10 copias
Límite superior (copias/mL) = 12 × 1.000.000 copias
de 120 a 12.000.000 copias/mL

Conversión de los resultados a unidades internacionales (UI)

Fc es el factor de conversión establecido utilizando el material calibrado de referencia homologado por la OMS en el «Segundo estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19», código NIBSC 99/802, Reino Unido (consultar la sección «Características de rendimiento»).

Cuando el **ELiTe STAR** se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para sangre y el ELiTe STAR
$F_c = 0,98 \text{ UI/copias}$ $N_c \text{ (UI/mL)} = N_c \text{ (copias/mL)} \times F_c$
$N_c \text{ (UI/mL)} = 27,4 \times \text{cantidad}$

Cuando el **ELiTe STAR** se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma y el ELiTe STAR
$F_c = 0,69 \text{ UI/copias}$ $N_c \text{ (UI/mL)} = N_c \text{ (copias/mL)} \times F_c$
$N_c \text{ (UI/mL)} = 19,3 \times \text{cantidad}$

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

Fórmula simplificada para sangre y el ELiTe GALAXY
$F_c = 0,82 \text{ UI/copias}$ $N_c \text{ (UI/mL)} = N_c \text{ (copias/mL)} \times F_c$
$N_c \text{ (UI/mL)} = 28,7 \times \text{cantidad}$

Cuando el **ELiTe GALAXY** se utiliza con muestras de plasma recogido en EDTA y se necesita un resultado expresado en UI/mL, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para plasma y el ELiTe GALAXY
$F_c = 0,87 \text{ UI/copias}$ $N_c \text{ (UI/mL)} = N_c \text{ (copias/mL)} \times F_c$
$N_c \text{ (UI/mL)} = 30,5 \times \text{cantidad}$

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

Fórmula simplificada para plasma y el NucliSENS® easyMAG®
$F_c = 1 \text{ UI/copias}$ $N_c \text{ (UI/mL)} = N_c \text{ (copias/mL)} \times F_c$
$N_c \text{ (UI/mL)} = 10 \times \text{cantidad}$

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

Fórmula simplificada para plasma y el QIAAsymphony® SP/AS
$F_c = 1 \text{ UI/copias}$ $N_c \text{ (UI/mL)} = N_c \text{ (copias/mL)} \times F_c$
$N_c \text{ (UI/mL)} = 12 \times \text{cantidad}$

CARACTERÍSTICAS
DE RENDIMIENTO CON OTROS SISTEMAS

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

La sensibilidad analítica de este ensayo cuando se utilizan muestras de sangre y el **ELiTe STAR** se verificó con un panel de diluciones de parvovirus B19 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Segundo estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19» (código NIBSC 99/802, Reino Unido) en muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de parvovirus B19. Las concentraciones víricas oscilaron entre 3,161 UI/mL y 1000 UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción con el **ELiTe STAR** 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 %. Los resultados finales se indican en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de sangre y el ELiTe STAR (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	293 UI/mL	159 UI/mL	1053 UI/mL

Límite de detección para muestras de sangre y el ELiTe STAR (copias/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	299 copias/mL	162 copias/mL	1074 copias/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo cuando se utilizan muestras de plasma y el **ELiTe STAR** se verificó con un panel de diluciones de parvovirus B19 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Segundo estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19», código NIBSC 99/802, Reino Unido en muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de parvovirus B19. Las concentraciones víricas oscilaron entre 3,161 UI/mL y 1000 UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 8 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción con el **ELiTe STAR** 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 %.

Los resultados finales se indican en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de plasma y el ELiTe STAR (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	100 UI/mL	45 UI/mL	987 UI/mL

Límite de detección para muestras de plasma y el ELiTe STAR (copias/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	145 copias/mL	65 copias/mL	1430 copias/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo cuando se utilizan muestras de sangre y el **ELiTe GALAXY** se verificó con un panel de diluciones de parvovirus B19 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Segundo estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19» (código NIBSC 99/802, Reino Unido) en muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de parvovirus B19. Las concentraciones víricas oscilaron entre 10 UI/mL y 560 UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el **ELiTe GALAXY** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %. Los resultados finales se indican en las siguientes tablas.

Límite de detección para muestras de sangre y el ELiTe GALAXY (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	145 UI/mL	80 UI/mL	562 UI/mL

Límite de detección para muestras de sangre y el ELiTe GALAXY (copias/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	177 copias/mL	98 copias/mL	685 copias/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo cuando se utilizan muestras de plasma y el **ELiTe GALAXY** se verificó con un panel de diluciones de parvovirus B19 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo el «Segundo estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19», (código NIBSC 99/802), Reino Unido en muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de parvovirus B19. Las concentraciones víricas oscilaron entre 10 UI/mL y 560 UI/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el **ELiTe GALAXY** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %. Los resultados finales se indican en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de plasma y el ELiTe GALAXY (UI/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	79 UI/mL	54 UI/mL	174 UI/mL

Límite de detección para muestras de plasma y el ELiTe GALAXY (copias/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	91 copias/mL	62 copias/mL	200 copias/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.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

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 configuró en 10^6 moléculas por reacción, dentro de un logaritmo a partir del calibrador de amplificación Q - PCR Standard a la concentración más alta (10^5 moléculas/20 μ L).

El límite inferior del rango de medición lineal se configuró en 10 moléculas por reacción, dentro de un logaritmo a partir del calibrador de amplificación Q - PCR Standard a la concentración más baja (10^2 moléculas/20 μ L).

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal (UI/reacción)	
Límite superior	1.000.000 copias de ADN/reacción
Límite inferior	10 copias de ADN/reacción

Los límites del rango de medición lineal como UI/mL que conciernen al kit de extracción empleado se calculan en la página 33.

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión del ensayo, definida como la variabilidad de los resultados obtenidos con varios duplicados de una muestra probada en la misma sesión, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual (%CV) medio de un 20,4 % de las cantidades medidas, dentro del margen de 10^6 a 10^1 moléculas, en los 20 μ L de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

La exactitud del ensayo, definida como la diferencia entre el promedio de los resultados obtenidos con varios duplicados de una muestra probada en la misma sesión y la concentración teórica de la muestra, permitieron obtener una inexactitud porcentual media (% de inexactitud) de un 12,4 % de las cantidades medidas, dentro del margen de 10^6 a 10^1 moléculas, en los 20 μ L 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 usando otros ensayos en laboratorios diferentes, se verificó analizando un material de referencia calibrado.

Las pruebas se realizaron usando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de PVB19 dentro de la concentración límite («QCMD 2008 B19 Virus EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en duplicados realizando el análisis completo, la extracción y la amplificación con productos de ELiTechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados				
Muestra	Consenso de ensayo comercial conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Muestras positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
B1908-01	PVB19, 2,396	0,534	2/2	2,636
B1908-02	PVB19, 3,966	0,596	2/2	4,182
B1908-03	PVB19, 2,822	0,574	2/2	2,750
B1908-04	Negativo, NA	N/A	0/2	No detectado
B1908-05	PVB19, 2,894	0,607	2/2	2,928
B1908-06	PVB19, 2,061	0,577	2/2	1,969
B1908-07	PVB19, 2,926	0,648	2/2	3,026
B1908-08	PVB19, 3,575	0,595	2/2	3,627

Todas las muestras se detectaron correctamente. Todos los resultados cuantitativos obtenidos están dentro del rango definido mediante la desviación estándar (DE) de consenso del ensayo comercial ± 1 .

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

Se realizaron otras pruebas usando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de PVB19 dentro del límite de concentración («QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó en duplicados con la sesión del procedimiento entero de análisis: extracción con el **ELiTe STAR** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el **ELiTe STAR** y plasma y se muestran en la siguiente tabla.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELiTe STAR				
Muestra	Consenso de ensayo comercial conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Muestras positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
B1912-01	PVB19, 1,684	0,488	2/2	2,242
B1912-02	PVB19, 3,716	0,522	2/2	4,078
B1912-03	Negativo, N/A	-	0/2	-
B1912-04	PVB19, 6,378	0,686	2/2	6,675
B1912-05	PVB19, 4,486	0,641	2/2	4,849
B1912-06	PVB19, 2,687	0,577	1/2	2,837
B1912-07	PVB19, 5,565	0,487	2/2	5,639
B1912-08	PVB19, 2,704	0,386	2/2	2,839

Todas las muestras se detectaron correctamente. Seis (6) de siete muestras positivas se cuantificaron dentro del rango definido mediante consenso ± 1 DE y una muestra (B1912-01) se cuantificó dentro de un margen de ± 2 DE. Este resultado se explica por el hecho de que el título de la muestra está por debajo del límite de detección del sistema.

Se realizaron otras pruebas usando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de PVB19 dentro del límite de concentración («QCMD 2014 B19 Virus EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en duplicados con la sesión del procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el sistema **ELiTe GALAXY** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

Los resultados en UI/mL se calcularon aplicando el factor de conversión para el **ELiTe GALAXY** y plasma y se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELiTe GALAXY				
Muestra	Consenso de ensayos comerciales conc. virus Log ₁₀ UI/mL	Desviación estándar	Muestras positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ UI/mL
B19DNA14-01	PVB19, 4,788	0,507	2/2	4,977
B19DNA14-02	PVB19, 2,878	0,437	2/2	3,115
B19DNA14-03	PVB19, 4,848	0,400	2/2	4,848
B19DNA14-04	Negativo, N/A	-	0/2	-
B19DNA14-05	PVB19, 5,802	0,465	2/2	5,996
B19DNA14-06	PVB19, 1,936	0,672	2/2	1,653
B19DNA14-07	PVB19, 3,913	0,371	2/2	3,972
B19DNA14-08	PVB19, 3,844	0,507	2/2	4,555

Todas las muestras se detectaron correctamente. Seis (6) de siete muestras positivas se cuantificaron dentro del rango definido mediante consenso ± 1 DE y una muestra (B19DNA14-08) se cuantificó dentro de un margen de ± 2 DE.

Sensibilidad analítica: Factor de conversión a unidades internacionales

Sangre recogida en EDTA

El factor de conversión se determinó usando un panel de tres diluciones (0,5 log₁₀ entre diluciones) de material de referencia calibrado homologado por la OMS («Segundo estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19», código NIBSC 99/802, Reino Unido) en muestras de sangre recogida en EDTA.

Cada muestra del panel se analizó en 15 duplicados con la sesión del procedimiento entero de análisis: extracción con el **ELiTe STAR** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

El análisis de los datos obtenidos permite calcular un factor de conversión medio (Fc) de 0,9 UI por copia de PVB19 detectado con muestras de sangre. Los resultados se indican en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con sangre y el ELiTe STAR				
Fc = 0,98 UI/copia				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media copias/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
31,623	4,500	29,023	28,434	4,443
10,000	4,000	9,631	9,435	3,947
3,162	3,500	4,346	4,258	3,607

Cada punto del panel se analizó en 15 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el **ELiTe GALAXY** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permite calcular un factor de conversión medio (Fc) de 0,8 UI por copia de PVB19 detectado con muestras de sangre. Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Conversión a unidades internacionales con sangre y el ELiTe GALAXY				
Fc = 0,82 UI/copia				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media copias/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
31,623	4,500	48,688	39,924	4,471
10,000	4,000	13,885	11,386	4,029
3,162	3,500	6,085	4,990	3,506

Plasma recogido en EDTA

El factor de conversión se determinó utilizando un panel de tres diluciones (0,5 Log₁₀ entre diluciones) de material de referencia calibrado aprobado por la OMS («Segundo estándar internacional de la OMS para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de ADN de parvovirus B19», código 99/802, Reino Unido) en muestras de plasma recogido en EDTA.

Cada muestra del panel se analizó en 15 duplicados con la sesión del procedimiento entero de análisis: extracción con el **ELiTe STAR** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permite calcular un factor de conversión medio (Fc) de 0,6 UI por copia de PVB19 detectado con muestras de plasma. Los resultados se indican en la siguiente tabla.

Conversión a unidades internacionales con plasma y el ELiTe STAR				
Fc = 0,69 UI/copia				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media copias/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
31,623	4,500	39,888	27,403	4,425
10,000	4,000	14,901	10,237	3,987
3,162	3,500	5,862	4,027	3,588

Cada punto del panel se analizó en 15 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el **ELiTe GALAXY** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos permite calcular un factor de conversión medio (Fc) de 0,8 UI por copia de PVB19 detectado con muestras de plasma. Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Conversión a unidades internacionales con plasma y el ELiTe GALAXY				
Fc = 0,87 UI/copia				
Conc. esperada UI/mL	Conc. esperada log ₁₀ UI/mL	Cantidad media copias/mL	Cantidad media UI/mL	Cantidad media log ₁₀ UI/mL
31,623	4,500	30,768	26,768	4,423
10,000	4,000	15,154	13,184	4,119
3,162	3,500	3,378	2,939	3,458

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

El factor de conversión medio que debe utilizarse con este ensayo en combinación con los sistemas de extracción **NucliSENS® easyMAG®** o **QIAAsymphony® SP/AS** para convertir el resultado cuantitativo de copias/mL a unidades internacionales/mL se definió en 1 UI por copia de ADN diana.

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

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

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de la sonda fluorescente en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para la región VP1 del PVB19, inclusive los genotipos 1, 2, 3a y 3b, mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como eficiencia de detección y cuantificación en distintos genotipos/subtipos, se evaluó empleando algunas construcciones plasmídicas correspondientes a los genotipos 1, 2 y 3a o 3b.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo se verificó utilizando tres plásmidos que contenían la secuencia de la región amplificada de los genotipos 1, 2 y 3 (la misma para los subtipos 3a y 3b). Los plásmidos se diluyeron de 105 copias por reacción a 102 copias por reacción. Estas muestras se analizaron en tres duplicados realizando la amplificación con los productos de ELiTechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Análisis con plásmidos correspondientes al genotipo 1, al genotipo 2 y al genotipo 3				
Concentración esperada copias/reacción	Concentración esperada log ₁₀ copias/reacción	Cantidad media genotipo 1 detectado log ₁₀ copias / reacción	Cantidad media genotipo 2 detectado log ₁₀ copias / reacción	Cantidad media genotipo 3 detectado log ₁₀ copias / reacción
100,000	5,000	5,013	4,882	4,849
10,000	4,000	4,009	3,910	3,862
1,000	3,000	3,024	2,911	2,848
100	2,000	2,037	2,026	1,921

Los resultados están dentro del rango definido por el valor esperado $\pm 0,2 \text{ Log}_{10}$.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica se evaluó usando 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de PVB19, que se enriquecieron con ADN de PVB19 mediante la adición de la muestra B1912-05, del «QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de PVB19, que se enriquecieron con ADN de PVB19 mediante la adición de la muestra B1912-05 del «QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis: extracción con el sistema **ELiTe STAR** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre entera recogida en EDTA con incremento para el ADN del PVB19	30	30	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de PVB19	30	30	0

Todas las muestras se detectaron correctamente como positivas para ADN del PVB19.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó usando 30 muestras de plasma negativas para ADN de parvovirus B19, que se enriquecieron con ADN de parvovirus B19 DNA mediante la adición de la muestra B1912-05 del «QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 30 muestras de sangre negativas para ADN de parvovirus B19, que se enriquecieron con ADN de parvovirus B19 mediante la adición de la muestra B1912-05 del «QCMD 2012 B19 Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el sistema **ELiTe GALAXY** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de parvovirus B19	30	30	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de parvovirus B19	30	30	0

Todas las muestras se detectaron correctamente como positivas para ADN del PVB19.
 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 PVB19, inclusive genomas completos del parvovirus 4, del bocavirus y del dependovirus, los virus humanos más similares al PVB19, mostró especificidad y ausencia de homologías reseñables.

La especificidad analítica del ensayo, definida como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, se evaluó mediante el uso de muestras clínicas negativas para ADN de PVB19 y positivas para ADN de otros patógenos.

La especificidad analítica se evaluó utilizando como material de referencia 22 muestras de sangre (periférica) recogida en EDTA, negativas para ADN de PVB19 pero positivas para ADN de otros patógenos como PVB19, EBV, CMV, VZV, HSV1 y HHV8 (que se habían analizado con productos para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para procedimientos de amplificación). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELiTechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de PVB19 y positiva para ADN de otros patógenos	22	0	22

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

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras negativas, se evaluó analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de PVB19, que habían dado un resultado negativo para ADN de PVB19.

La especificidad diagnóstica se evaluó usando 30 muestras de plasma recogidas en EDTA, negativas para ADN de PVB19, y 30 muestras de sangre recogida en EDTA, negativas para ADN de PVB19

(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: 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
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de PVB19	30	0	30
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de PVB19	30	0	30

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

La especificidad diagnóstica se evaluó usando 34 muestras de plasma recogidas en EDTA, negativas para ADN de parvovirus B19, y 34 muestras de sangre recogida en EDTA, negativas para ADN de parvovirus B19 (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: extracción y configuración de la PCR con el sistema **ELiTe GALAXY** y amplificación, con productos de ELiTechGroup S.p.A.

Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit
Reactivo para la PCR de ADN en tiempo real

REF RTS070PLD

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

Muestras	N	positivas	negativas
Plasma recogido en EDTA supuestamente negativo para ADN de parvovirus B19	34	0	34
Sangre recogida en EDTA supuestamente negativa para ADN de parvovirus B19	33	1	32

Una muestra de sangre presentó resultado positivo (31 copias/mL) diferente del resto. El título de esta muestra estaba por debajo del límite de detección del método. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 98,5 %.

NOTA: los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la documentación técnica del producto **Parvovirus B19 ELiTe MGB® Kit**, FTP RTS070PLD.

BIBLIOGRAFÍA

F. McOmish et al. (1993) *J. Clin. Microbiol.* **31**: 323 - 328
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30
 K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* **50**: 732-740.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con las muestras clínicas siguientes: sangre (periférica y de médula ósea) recogida en EDTA, plasma recogido en EDTA y líquido amniótico.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN de la diana no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de la diana presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «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 Internal Control. Si esto ocurre, es necesario volver a analizar la muestra, empezando por el paso de extracción, lo que puede dar lugar a retrasos en la obtención de los resultados definitivos.

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

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

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

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ELiTe InGenius y ELiTe BeGenius

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

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

Reacción no válida de la muestra	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la PCR Mix, la del Internal Control y la de la muestra. Comprobar el volumen de la PCR Mix, el del Internal Control y el de la muestra.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	No utilizar la PCR Mix durante más de 7 sesiones independientes: 3 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No utilizar la PCR Mix durante más de 3 sesiones consecutivas: 7 horas en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) o en la «Cooler Unit». No dejar la PCR Mix a temperatura ambiente durante más de 30 minutos. Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Degradación de la plantilla del Internal Control.	Utilizar una nueva alícuota del Internal Control.

Inhibición debida a la presencia de sustancias interferentes en la muestra.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only» (Solo PCR). Repetir la extracción con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra en una sesión realizada en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR).
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELiTechGroup.

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

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

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

Plataforma abierta:

No se ha detectado ADN diana en las reacciones del Positive Control o 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. Revisar los volúmenes del Positive Control o del calibrador distribuido.
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 Positive Control o de calibrador.
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la configuración de la posición del Positive Control o las reacciones del calibrador en el instrumento. Comprobar la configuración del ciclo térmico en el instrumento.

Se ha detectado ADN diana 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 o los calibradores en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.
Error al configurar el instrumento	Comprobar la configuración de la posición de las muestras, de los controles negativos, de los controles positivos o de los calibradores 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 estéril.
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.

Fluorescencia de fondo irregular o alto 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 Positive Control.	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.

SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo.
	Límite superior de temperatura.
LOT	Código de lote.
	Fecha de caducidad (último día del mes).
IVD	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> .
CE	Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Contenido suficiente para «N» análisis.
UDI	Identificador único del producto
	Atención: Consultar las instrucciones de uso.
CONT	Contenido.
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Fabricante.

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA
LIMITADA

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

Los reactivos de detección ELITe® MGB® están cubiertos por una varias patentes de EE. UU. 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, así como por las patentes europeas 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 y por solicitudes de patentes pendientes en la actualidad.

Las tecnologías ELITe InGenius® y ELITe BeGenius® están cubiertas por patentes y solicitudes de patentes.

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

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

NucliSENS® easyMAG® son marcas registradas de bioMérieux SA.

QIA Symphony® es una marca registrada de QIAGEN GmbH.

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