

NOTICE of CHANGE dated 29/09/2022

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HSV1 ELITe MGB® Kit» Ref. RTS031PLD

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

- *Update for the use of the product for CSF matrix in association with «ELITe BeGenius®» instrument (REF INT040).*
- *Confirmed LoD and ULoQ/LLoQ value calculated on CSF matrix*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE

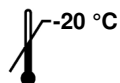
	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE 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



HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD



ÍNDICE

USO PREVISTO	página 1
PRINCIPIOS DEL ENSAYO	página 2
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	página 3
MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 3
MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 3
OTROS PRODUCTOS NECESARIOS	página 3
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	página 5
ELITE INGENIUS®	página 6
MUESTRAS Y CONTROLES	página 6
PROCEDIMIENTO	página 8
ELITE BEGENIUS®	página 15
MUESTRAS Y CONTROLES	página 15
PROCEDIMIENTO	página 17
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL ELITE InGenius® y DEL ELITE BeGenius®	página 22
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System	página 31
MUESTRAS Y CONTROLES	página 31
PROCEDIMIENTO	página 33
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 42
Analizador Roche cobas z 480	página 47
MUESTRAS Y CONTROLES	página 47
PROCEDIMIENTO	página 48
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 54
BIBLIOGRAFÍA	página 56
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	página 56
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	página 57
SÍMBOLOS	página 60
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	página 61

USO PREVISTO

El producto «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» es un ensayo cualitativo y cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos para la **detección y cuantificación de ADN de virus del herpes simple tipo 1 (VHS1)** en muestras de ADN extraídas de líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre recogida en EDTA o plasma recogido en EDTA.

El producto se utiliza para el diagnóstico y la monitorización de infecciones por el VHS1 junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

HSV1 ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

PRINCIPIO DEL ENSAYO

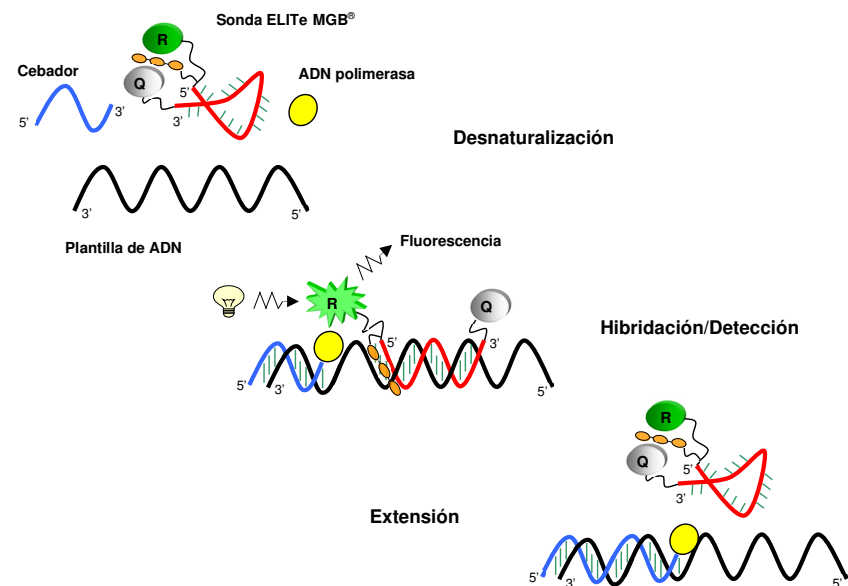
El ensayo consiste en una reacción de amplificación en tiempo real con un termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia (termociclador de amplificación en tiempo real).

En cada pocillo se realizan dos reacciones de amplificación a partir del ADN extraído de las muestras que se están analizando: una reacción específica de una región de la **glucoproteína D (gpD)** del VHS1 y una reacción específica para una región del **gen de la globina beta humana** (Internal Control de inhibición). La sonda específica del VHS1 con la tecnología ELITE MGB®, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del VHS1. La sonda específica del Internal Control con la tecnología ELITE MGB®, marcada con el fluoróforo AP525 (análogo al VIC), se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación para el Internal Control. A medida que aumenta el producto específico de la reacción de amplificación, la emisión de fluorescencia también aumenta y el instrumento la mide y la registra. El procesamiento de los datos permite detectar la presencia y el título de ADN de VHS1 en la muestra inicial.

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

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

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



HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**HSV1 ELITE MGB Kit**» incluye la mezcla completa «**HSV1 Q - PCR Mix**» lista para el uso para la amplificación en tiempo real en una solución estabilizadora, dividida en cuatro probetas desechables. Cada probeta contiene 540 µL de solución, suficiente para 24 análisis (procesando al menos 2 muestras por sesión) cuando se utilizan los instrumentos «**ELITE InGenius**» y «**ELITE BeGenius**», o bien para 25 análisis cuando se utilizan otros sistemas.

Los cebadores y la sonda específica del VHS1 (estabilizados con el grupo MGB, marcados con el fluoróforo FAM e inactivados con una molécula no fluorescente) son específicos de una región de la gpD del VHS1 (región US6).

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

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

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

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

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
HSV1 Q - PCR Mix	Mezcla completa de reacción	4x540 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

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

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

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

Para la extracción manual de ADN de las muestras que van a analizarse, se ha validado el uso de los productos genéricos «**EXTRAgen**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTG01), que es un kit para la extracción de ADN de muestras acelulares y «**EXTRAblood**» (ELITechGroup S.p.A., ref. EXTB01), que es un kit para la extracción de ADN de muestras celulares y acelulares.

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

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

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

- para los calibradores, «**HSV1 ELITE STD**»,
- para el control positivo de amplificación, «**HSV1 ELITE PC**»,
- para el control negativo de amplificación, «**HSV1 ELITE NC**»,
- para el análisis de las muestras, «**HSV1 ELITE WB 200 100**», «**HSV1 ELITE PL 200 100**» y «**HSV1 ELITE CSF 200 100**».

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

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

- para los calibradores, «**HSV1 ELITE Be STD**»;
- para el control positivo de amplificación, «**HSV1 ELITE Be PC**»;
- para el control negativo de amplificación, «**HSV1 ELITE Be NC**»;
- para el análisis de las muestras, «**HSV1 ELITE Be WB 200 100**», «**HSV1 ELITE Be PL 200 100**» y «**HSV1 ELITE Be CSF 200 100**».

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

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

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

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

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

Como control positivo para la extracción de ácidos nucleicos de muestras acelulares y como control de inhibición, es necesario utilizar el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE), que es una solución estabilizada que contiene dos ADN plasmídicos y el ARN genómico del

HSV1 ELITE MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF RTS031PLD**

bacteriófago MS2.

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

Cuando se utiliza un «7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument», es necesario utilizar el producto genérico «**MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL**» (Life Technologies, ref. 4346906), que contiene microplacas con pocillos de 0,1 mL y placas de sellado adhesivas para la amplificación en tiempo real.

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

Si se necesita una detección de ADN de VHS1 para un análisis cualitativo, es preciso utilizar el producto «**HSV1 - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR031PLD) o el producto «**HSV1 - ELITE Positive Control RF**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR031PLD-R), que contiene el control positivo del ADN plasmídico.

Si se necesitan una detección y una cuantificación de ADN de VHS1 para un análisis cuantitativo, es preciso utilizar el producto «**HSV1 ELITE Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD031PLD), que contiene cuatro diluciones de ADN plasmídico en cantidad conocida para obtener la curva de calibración.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

Advertencias y precauciones generales

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

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

Usar ropa de protección y guantes adecuados y protegerse los ojos y la cara.
No pipetear ninguna solución con la boca.
No comer, beber, fumar ni aplicarse cosméticos en el área de trabajo.
Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.
Eliminar los reactivos sobrantes y los residuos conforme a las normas vigentes.
Leer atentamente todas las instrucciones proporcionadas con el producto 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

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

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

HSV1 ELITE MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF RTS031PLD**

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

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

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

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

Advertencias y precauciones específicas para los componentes

La mezcla «**HSV1 Q - PCR Mix**» debe conservarse a -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La mezcla «**HSV1 Q - PCR Mix**» puede congelarse y descongelarse hasta **cinco veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

La mezcla «**HSV1 Q - PCR Mix**» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una (utilizando el modo de procesamiento «Extract + PCR»).

ELITE InGenius**MUESTRAS Y CONTROLES****Muestras**

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Sangre recogida en EDTA

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «**ELITE InGenius**» y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**HSV1 ELITE WB_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Plasma recogido en EDTA

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

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

HSV1 ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el «**ELITE InGenius**» y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**HSV1 ELITE_PL_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Las muestras de LCR para la extracción del ácido nucleico se deben extraer de acuerdo con las directrices del laboratorio, evitando su contaminación con sangre del paciente, así como transportarse a +2/+8 °C y almacenarse a +2/+8 °C durante un máximo de cuatro horas; en caso contrario, es necesario congelarlas y almacenarlas a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante periodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «**ELITE InGenius**» y la versión 1.3 del **software ELITE InGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**HSV1 ELITE_CSF_200_100**». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control **CPE** a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Otras muestras:

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: suspensiones de leucocitos, suspensiones de granulocitos y líquido amniótico.

Sustancias interferentes

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

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

Calibradores de amplificación y controles de amplificación

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

Como conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del producto «**HSV1 ELITE Standard**» junto con el protocolo «**HSV1 ELITE_STD**».

Como Positive Control de amplificación, utilizar el producto «**HSV1 - ELITE Positive Control**» junto con el protocolo «**HSV1 ELITE_PC**».

Como Negative Control de amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en el kit) junto con el protocolo «**HSV1 ELITE_NC**».

Nota: El sistema «**ELITE InGenius**» requiere resultados aprobados y válidos de la curva de calibración y de los controles de amplificación para cada lote de reactivos de amplificación guardado en su base de datos. Las curvas de calibración, aprobadas y guardadas en la base de datos, caducan a los **60 días**. Al llegar la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar los calibradores «**Q-PCR Standard**» con el lote de reactivos de amplificación.

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

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

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

HSV1 ELITE MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO

El procedimiento para utilizar el producto «**HSV1 - ELITE MGB® Kit**» con el sistema **ELITE InGenius** comprende tres pasos:

- Verificación de la disponibilidad del sistema
- Configuración de la sesión
- Revisión y exportación de los resultados

Verificación de la disponibilidad del sistema

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

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

- Comprobar que los calibradores («**HSV1 Q - PCR Standard**») se hayan procesado y aprobado con el lote de reactivos de amplificación que va a utilizarse, así como que no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede comprobar en el menú «**Calibration**» de la página de inicio. Si no se dispone de calibradores aprobados o válidos, procesarlos tal como se describe en los apartados siguientes.

- Comprobar que los controles de amplificación («**HSV1 Positive Control**», «**HSV1 Negative Control**») se hayan procesado y aprobado con el lote de reactivos de amplificación que va a utilizarse, así como que no hayan caducado («**Status**»). Esto se puede comprobar en el menú «**Control**» de la página de inicio. Si no se dispone de controles de amplificación aprobados o válidos, procesarlos tal como se describe en los apartados siguientes.

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

Los protocolos de ensayo disponibles para el producto «**HSV1 ELITE MGB Kit**» se describen en la tabla siguiente.

Protocolos de ensayo para el producto « HSV1 ELITE MGB Kit » y el ELITE InGenius			
Nombre	Matriz	Informe	Características
HSV1 ELITE_WB_200_100	Sangre	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV1 ELITE_PL_200_100	Plasma	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV1 ELITE_CSF_200_100	LCR	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

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

Los protocolos para el análisis cualitativo están disponibles bajo petición.

Configuración de la sesión

El producto «HSV1 ELITE MGB Kit» puede utilizarse con el sistema «ELITE InGenius» para realizar las siguientes tareas:

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

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

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

Los pasos principales para la configuración de los tres tipos de sesión se describen en los siguientes apartados.

A. Sesión integrada

Para configurar una sesión integrada con la extracción y amplificación de la muestra, seguir las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación:

- Descongelar una cantidad suficiente de probetas de la mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» para la sesión a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: descongelar la mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

- Descongelar las probetas de CPE para la sesión a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- Para cada carril deseado, rellenar el ID de la muestra («SampleID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se va a utilizar (p. ej., «HSV1 ELITE_PL_200_100»).
- Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» sea «Extract + PCR».
- En la columna «Sample Position», seleccionar la posición de carga de la muestra.
Si se utiliza una probeta primaria, seleccionar «Primary Tube».
Si se utiliza una probeta secundaria, seleccionar «Extraction Tube».
Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar el CPE y la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de ambos componentes. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario («Inventory Area») seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar los cartuchos de PCR, así como los cartuchos de extracción «ELITE InGenius SP 200», todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse, siguiendo las

instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

12. Cerrar la puerta del instrumento.

13. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 °C. Evitar derramar la muestra extraída.

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

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

B. Sesión de amplificación

Para configurar la sesión de amplificación a partir del ADN extraído, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

- Descongelar un número suficiente de probetas de mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» para la sesión a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: descongelar la mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

- Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
- Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- Para cada carril deseado, rellenar el SID escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «HSV1 ELITE_PL_200_100»).
- En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
- Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» sea «Elution Tube (fila inferior)». Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de dicha mezcla. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario («Inventory Area») seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar los cartuchos «PCR Cassette» y las muestras del ácido nucleico extraído siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cerrar la puerta del instrumento.
- Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C durante un mes como máximo. Evitar cualquier derrame de la muestra extraída.

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

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

C. Sesión de calibración

Para configurar la sesión de calibración para los estándares Q-PCR, seguir las instrucciones de la interfaz de usuario que se indican a continuación:

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de la mezcla «**HSV1 Q - PCR Mix**» para la sesión a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: descongelar la mezcla «**HSV1 Q - PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar las probetas de «**HSV1 Q - PCR Standard**» (Cal1: HSV1 Q - PCR Standard 10², Cal2: HSV1 Q - PCR Standard 10³, Cal3: HSV1 Q - PCR Standard 10⁴, Cal4: HSV1 Q - PCR Standard 10⁵) a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
5. En el carril deseado, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
6. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo «HSV1 ELITE STD» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del calibrador «HSV1 P-PCR Standard».
7. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de dicha mezcla. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área de inventario («Inventory Area») seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz que se indican a continuación. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos «PCR Cassette» y las probetas de «**HSV1 Q-PCR Standard**» siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C durante un mes como máximo. Evitar cualquier derrame de la muestra extraída.

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

Nota: la mezcla «PCR Mix» puede utilizarse para 5 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o bien conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de

3 horas cada una. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

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

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

1. Descongelar un número suficiente de probetas de mezcla «**HSV1 Q - PCR Mix**» para la sesión a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: descongelar la mezcla «**HSV1 Q - PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.

2. Para la sesión de amplificación del Positive Control, descongelar las probetas de «**HSV1 - Positive Control**» a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua para biología molecular para las sesiones en una probeta de elución incluida en el conjunto de consumibles «ELITE InGenius® SP Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 50 µL.
6. En el carril deseado, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
7. Para el Positive Control, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo «HSV1 ELITE_PC» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control de VHS1 («Positive Control HSV1»).
8. Para el Negative Control, seleccionar el protocolo de ensayo «HSV1 ELITE_NC» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del agua para biología molecular.
9. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en el bloque de inventario seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de dicha mezcla. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar/revisar las gradillas de puntas en el área de inventario seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», la probeta de «HSV1 Positive Control» y la probeta de Negative Control siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

Nota: Al finalizar la sesión, el Positive Control puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a -20 °C. El Negative Control que queda debe eliminarse.

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

los productos de reacción.

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

Revisión y aprobación de los resultados

Al finalizar la sesión, aparece automáticamente la pantalla «Results Display», en la que se muestran los resultados de la muestra/los controles y la información relativa a la sesión. En esta pantalla, es posible aprobar el resultado, 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 sistema **ELITE InGenius** puede conectarse al sistema de información de ubicaciones (LIS, «Location Information System»), que permite enviar los resultados de la sesión de trabajo al centro de datos del laboratorio. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

El sistema «**ELITE InGenius**» genera los resultados con el producto «**HSV1 ELITE MGB Kit**» mediante el siguiente procedimiento:

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

A. Validación de la curva de calibración

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica del VHS1 («HSV1») en las reacciones de amplificación del calibrador utilizando los parámetros incluidos en el protocolo de ensayo «HSV1 ELITE_STD».

La curva de calibración, específica para el lote de reactivos de amplificación, se registra en la base de datos («Calibration»). El personal cualificado como administrador («Administrator») o analista («Analyst») puede consultarla y aprobarla siguiendo las instrucciones de la interfaz.

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

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

Nota: si la curva de calibración se procesa junto con las muestras y el resultado no es válido, las muestras no se cuantifican y no pueden aprobarse. En este caso, también es necesario repetir la amplificación de todas las muestras.

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

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica del VHS1 («HSV1») y por la sonda específica del Internal Control («IC») en la reacción de amplificación del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «HSV1 ELITE_PC» y «HSV1 ELITE_NC».

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

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

Antes de analizar cualquier muestra, es imprescindible verificar que la amplificación del Positive Control y del Negative Control se haya procesado con el lote de reactivos de amplificación pertinente y que los resultados se hayan aprobado y sean válidos. La disponibilidad de los resultados aprobados («Approved») de la amplificación del Positive Control y del Negative Control («Status») se muestra en la ventana «Controls» de la interfaz de usuario. Si no se dispone de resultados de la amplificación del Positive Control y del Negative Control, es necesario generarlos como se ha descrito anteriormente.

El software del instrumento utiliza los resultados de las sesiones de amplificación del Positive Control y del Negative Control para calcular la configuración de los gráficos de control («Control Charts»). Se

necesitan cuatro resultados del Positive Control y del Negative Control de cuatro sesiones diferentes para configurar el gráfico de control. Después de esto, los resultados del Positive Control y del Negative Control se utilizan para controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso.

Nota: si el resultado del Positive Control o del Negative Control de amplificación no cumple los criterios de aceptación, el instrumento muestra el mensaje «Failed» en la pantalla «Controls» y no es posible aprobarlo. En este caso, es necesario repetir la reacción de amplificación del Positive Control o del Negative Control.

Nota: si el Positive Control o el Negative Control se procesan junto con las muestras que van a analizarse y el resultado no es válido, las muestras pueden aprobarse, pero los resultados no se validan. En este caso, también es necesario repetir la amplificación de todas las muestras.

C. Validación de los resultados de las muestras

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por la sonda específica del VHS1 (canal «HSV1») y por la sonda específica del Internal Control (canal «IC») en cada reacción de amplificación de la muestra utilizando los parámetros incluidos en el protocolo de ensayo.

antes de analizar cualquier muestra, es imprescindible generar y aprobar la curva de calibración y los controles de amplificación para el lote de reactivos utilizado. Aunque es opcional, se recomienda procesar el Positive Control y el Negative Control junto con los calibradores. La disponibilidad de una curva de calibración y de resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación con estado aprobado («Approved») aparece en las ventanas «Calibration» y «Controls» del software ELITE InGenius y se indica en la sección de los parámetros de ensayo («Assay Parameters»).

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

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

1) Curva de calibración	Estado
HSV1 Q - PCR Standard	APROBADO
2) Positive Control	Estado
HSV1 - Positive Control	APROBADO
3) Negative Control	Estado
HSV1 - Negative Control	APROBADO

Para cada muestra, el cálculo de la carga vírica es realizado automáticamente por el **software ELITE InGenius** tal como se establece en el algoritmo y en los parámetros del protocolo del ensayo.

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

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
HSV1: DNA Detected, quantity equal to XXX copies/mL	Se ha detectado ADN de VHS1 dentro del rango de medición del ensayo; la cantidad es la mostrada.
HSV1: DNA Detected, quantity below LLoQ copies/mL	Se ha detectado ADN de VHS1 por debajo del límite inferior de cuantificación del ensayo.
HSV1: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies/mL	Se ha detectado ADN de VHS1 más allá del límite superior de cuantificación del ensayo
HSV1: DNA Not Detected or below LoD copies/mL	No se ha detectado ADN de VHS1 o se encuentra por debajo del límite de detección del ensayo.
Invalid - Retest Sample	Resultado del ensayo no válido debido a un error del Internal Control (extracción incorrecta o presencia de inhibidores).

Las muestras que el **software ELITE InGenius** notifica como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de los resultados. En este caso, el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente debido a problemas en el paso de amplificación o de extracción (degradación o reducción del título de ADN durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse, tal cual o diluida, con una sesión de amplificación en el modo de procesamiento «PCR Only». Si se produce un segundo

HSV1 ELITE MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF RTS031PLD**

resultado no válido, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de la extracción de una nueva alícuota en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Las muestras que se notifican como «HSV1 DNA Not Detected or below LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ADN de VHS1. En este caso, no puede descartarse que el ADN de VHS1 presente una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar la sección «Características de rendimiento»).

Cuando el ensayo detecta muestras positivas para VHS1 a una concentración inferior al LoD, estas se notifican como «HSV1: DNA Detected, quantity below LLoQ» (consultar la sección «Características de rendimiento»).

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

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

D. Generación del informe de los resultados de las muestras

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

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

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

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

ELITE BeGenius**MUESTRAS Y CONTROLES****Muestras**

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Sangre recogida en EDTA

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «ELITE BeGenius» y la versión 2.0.0 del software ELITE BeGenius (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «HSV1 ELITE Be_WB_200_100». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control CPE a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Plasma recogido en EDTA

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

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

HSV1 ELITE MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF RTS031PLD**

Nota: cuando la extracción de ADN de 200 µL de plasma se realiza con el «ELITE BeGenius» y la versión 2.0.0 del software ELITE BeGenius (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «HSV1 ELITE Be_PL_200_100». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control CPE a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Las muestras de LCR para la extracción del ácido nucleico se deben extraer de acuerdo con las directrices del laboratorio, evitando su contaminación con sangre del paciente, así como transportarse a +2/+8 °C y almacenarse a +2/+8 °C durante un máximo de cuatro horas; en caso contrario, es necesario congelarlas y almacenarlas a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «ELITE BeGenius» y la versión 2.0.0 del software ELITE BeGenius (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «HSV1 ELITE Be_CSF_200_100». Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el Internal Control CPE a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

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

Otras muestras:

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: suspensiones de leucocitos, suspensiones de granulocitos y líquido amniótico.

Sustancias interferentes

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

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

Calibradores de amplificación y controles de amplificación

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

Como conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del producto «HSV1 ELITE Standard» junto con el protocolo «HSV1 ELITE Be_STD».

Como Positive Control de amplificación, utilizar el producto «HSV1 - ELITE Positive Control» junto con el protocolo «HSV1 ELITE Be_PC».

Como Negative Control de amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en el kit) junto con el protocolo «HSV1 ELITE Be_NC».

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

Las curvas de calibración, aprobadas y guardadas en la base de datos, caducan **a los 60 días**. Al llegar la fecha de caducidad, es necesario volver a procesar el conjunto de calibradores.

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

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

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

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO

El procedimiento para utilizar el producto «HSV1 ELITE MGB Kit» con el sistema ELITE BeGenius comprende tres pasos:

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

Verificación de la disponibilidad del sistema

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

- Encender el ELITE BeGenius® y seleccionar el modo «CLOSED».
- Verificar que los calibradores («HSV1 Q-PCR Standard») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («Status»). Esto se puede comprobar en el menú «Calibration» de la página «Home».
- Verificar que los controles de amplificación («HSV1 Positive Control» y «HSV1 Negative Control») se hayan procesado, estén aprobados y no hayan caducado («Status»). Esto se puede comprobar en el menú «Control» de la página «Home».
- Elegir el tipo de sesión y configurarla, siguiendo las instrucciones de la interfaz para la configuración de la sesión y utilizando los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits ELITE MGB, las matrices correspondientes y el instrumento ELITE BeGenius.

Los protocolos de ensayo disponibles para el producto «HSV1 ELITE MGB Kit» se describen en la tabla siguiente.

Protocolos de ensayo para el producto «HSV1 ELITE MGB Kit» y el ELITE BeGenius			
Nombre	Matriz	Informe	Características
HSV1 ELITE_Be_WB_200_100	Sangre	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV1 ELITE_Be_PL_200_100	Plasma	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
HSV1 ELITE_Be_CSF_200_100	LCR	copias/mL	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen de eluido extraído: 100 µL Internal Control: 10 µL Factor de dilución: 1 Volumen de la mezcla de PCR: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

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

Configuración de la sesión

El producto «HSV1 ELITE MGB Kit» puede utilizarse en combinación con el «ELITE BeGenius» para realizar las siguientes tareas:

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

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

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

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

A. Sesión de la muestra

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de CPE para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las gradillas de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «Extract + PCR».
6. Cargar las muestras en las gradillas 5 y 4 (comenzando siempre por la gradilla 5).
7. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

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

8. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «HSV1 ELITE_Be_WB_200_100»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Si se utiliza la gradilla 4, repetir los pasos del 7 al 9 para ella.
11. Cargar las probetas de elución en las gradillas 3 y 2 (comenzando siempre por la gradilla 3).

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

12. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Si se utiliza la gradilla 2, repetir el paso 12 para ella.
14. Cargar el CPE y la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en la gradilla 1.
15. Insertar la gradilla 1 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
16. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
17. Cargar la cesta con el cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.

18. Cargar la cesta con los cartuchos de extracción «ELITE InGenius SP 200» y los consumibles de extracción necesarios siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
19. Cerrar la puerta del instrumento.
20. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

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

B. Sesión de amplificación

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de CPE para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
6. Cargar las muestras en las gradillas 3 y 2 (comenzando siempre por la gradilla 3).
7. Insertar la gradilla en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Aunque no vaya a realizarse ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «HSV1 ELITE_Be_WB_200_100»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Repetir los pasos del 7 al 9 para la gradilla 2.
11. Cargar el CPE y la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en la gradilla 1.
12. Insertar la gradilla 1 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
14. Cargar la cesta con el cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
15. Cerrar la puerta del instrumento.
16. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

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

C. Sesión de calibración

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar las probetas de calibrador «HSV1 Q - PCR Standard» (Cal1: HSV1 Q-PCR Standard 10², Cal2: HSV1 Q-PCR Standard 10³, Cal3: HSV1 Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: HSV1 Q-PCR Standard 10⁵). Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
6. Cargar las probetas del calibrador en la gradilla 3.
7. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «HSV1 ELITE_Be_STD»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en la gradilla 2.
9. Insertar la gradilla 2 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar la cesta con el cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

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

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

D. Sesión del Positive Control y del Negative Control

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

1. Descongelar una cantidad suficiente de probetas de mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» para la sesión. Cada probeta nueva es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar el producto «HSV1 - ELITE Positive Control», para la amplificación del Positive Control. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua para biología molecular (como Negative Control) para las sesiones en una probeta de elución incluida en el conjunto de consumibles «ELITE InGenius SP Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
6. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «PCR Only».
7. Cargar las probetas de Positive Control y Negative Control en la gradilla 3.
8. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se va a utilizar («HSV1 ELITE_Be_PC» y «HSV1 ELITE_Be_NC»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar la mezcla «HSV1 Q-PCR Mix» en la gradilla 2.
10. Insertar la gradilla 2 en la unidad de refrigeración. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar las gradillas de puntas en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar la cesta con el cartucho «PCR Cassette» en el área de inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

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

Revisión y aprobación de los resultados

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

El ELITE BeGenius genera los resultados con el producto «HSV1 ELITE MGB Kit» mediante el siguiente procedimiento:

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

Nota: para obtener más información, consultar los mismos capítulos del manual del ELITE InGenius.

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

**CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO
ELITE InGenius y ELITE BeGenius****Sensibilidad analítica: Límite de detección**

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

El límite de detección de este ensayo se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con el espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a un título de 10 copias/20 µL en ADN genómico humano a un título de 500 ng/20 µL. Esta muestra se analizó en 24 duplicados (en el modo de procesamiento «PCR Only») realizando la amplificación con productos de ELITEchGroup S.p.A. en dos instrumentos distintos.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Muestra	N	Válido	Positiv s	Negativ as
10 copias de ADN plasmídico + 500 ng de ADN genómico humano	24	24	24	0

El límite de detección (LoD) del producto «HSV1 ELITE MGB Kit» se verificó con muestras de **sangre** recogida en EDTA, muestras **plasma** recogido en EDTA y muestra de **LCR** utilizando los sistemas «ELITE InGenius» y «ELITE BeGenius» (modo de procesamiento «Extract + PCR»).

En las muestras de sangre:

El LoD de este ensayo se verificó analizando 20 duplicados de muestras de sangre enriquecidas a 211 copias/mL en los sistemas InGenius y ELITE BeGenius con el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia «Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Culture Fluid Heat Inactivated» de ZeptoMetrix.

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo según la directiva EP17-A del CLSI.

Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de sangre y el ELITE InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiva s	Negativa s
Sangre recogida en EDTA	211 copias/mL	20	20	19	1

Límite de detección para muestras de sangre y el ELITE BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiva s	Negativa s
Sangre recogida en EDTA	211 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VHS1 se confirmó a 211 copias/mL cuando se utilizó sangre recogida en EDTA.

En las muestras de plasma:

El LoD de este ensayo se verificó analizando 20 duplicados de muestras de plasma enriquecidas a 250 copias/mL en los sistemas ELITE InGenius y ELITE BeGenius con el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia «Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Culture Fluid Heat Inactivated» de ZeptoMetrix.

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo según la directiva EP17-A del CLSI.

Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de plasma y el ELITE InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positiva s	Negativa s
Plasma recogido en EDTA	250 copias/mL	20	20	20	0

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Límite de detección para muestras de plasma y el ELITE BeGenius

Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Plasma recogido en EDTA	250 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VHS1 se confirmó a 250 copias/mL cuando se utilizó plasma recogido en EDTA.

En las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR):

El LoD de este ensayo se verificó analizando 20 duplicados de muestras de LCR enriquecidas a 250 copias/mL en los sistemas ELITE InGenius y ELITE BeGenius con el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia «Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Culture Fluid Heat Inactivated» de ZeptoMetrix.

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo según la directiva EP17-A del CLSI.

Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de LCR y el ELITE InGenius

Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo	250 copias/mL	20	20	20	0

Límite de detección para muestras de LCR y el ELITE BeGenius

Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo	250 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VHS1 se confirmó a 250 copias/mL cuando se utilizó líquido cefalorraquídeo.

Rango de medición lineal y límites de cuantificación

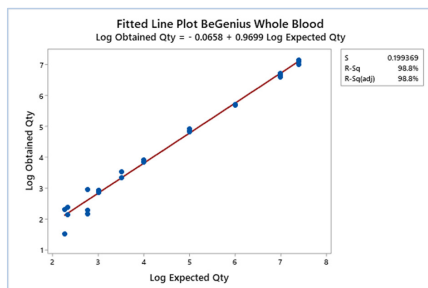
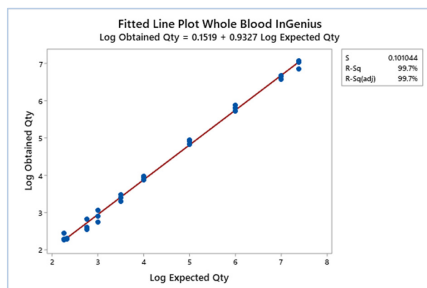
El rango de medición lineal del producto «HSV1 ELITE MGB Kit» utilizado con muestras de **sangre** recogida en EDTA, muestras de **plasma** recogido en EDTA y muestras de **LCR** en los instrumentos «**ELITE InGenius**» y «**ELITE BeGenius**» se verificó con un panel de diluciones de VHS1. El panel se preparó diluyendo el material de referencia «Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Culture Fluid Heat Inactivated» (ZeptoMetrix) en matrices negativas para ADN de VHS1.

En las muestras de sangre:

El panel constaba de diez puntos de dilución que abarcaron de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ copias/mL a 178 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de sangre, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R^2) de 0,997 para el instrumento **ELITE InGenius** y de 0,988 para el instrumento **ELITE BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.

**HSV1 ELITE MGB® Kit**

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,253 log copias/mL para el «**ELITE InGenius**» y de 0,305 log copias/mL para el «**ELITE BeGenius**») y exacta (sesgo de 0,133 log copias/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,491 log copias/mL para el **ELITE BeGenius**): 211 copias/mL.

El límite superior de cuantificación (ULOQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,117 log copias/mL para el «**ELITE InGenius**» y de 0,068 log copias/mL para el «**ELITE BeGenius**») y exacta (sesgo de 0,393 log copias/mL para el **ELITE InGenius** y de 0,297 log copias/mL para el **ELITE BeGenius**): 25.000.000 copias/mL.

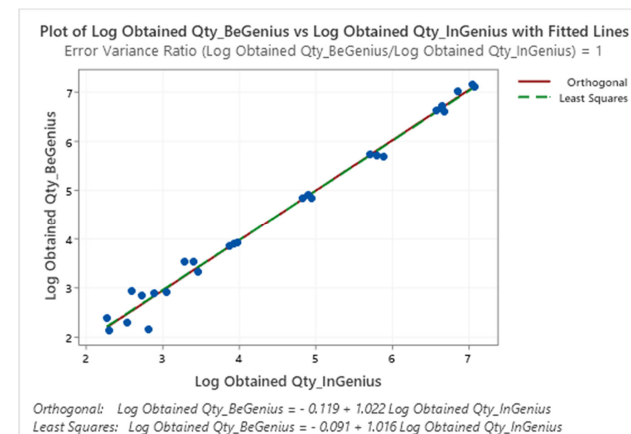
Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de sangre y los instrumentos ELITE InGenius y ELITE BeGenius

Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
copias/mL	211	25.000.000

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

Los resultados se resumen en la siguiente figura.



En este análisis, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente de 1,022 (IC del 95 %: 0,977 a 1,067) y una intersección de -0,119 (IC del 95 %: -0,333 a 0,094). El análisis de regresión lineal generó un R^2 de 0,988.

En las muestras de plasma:

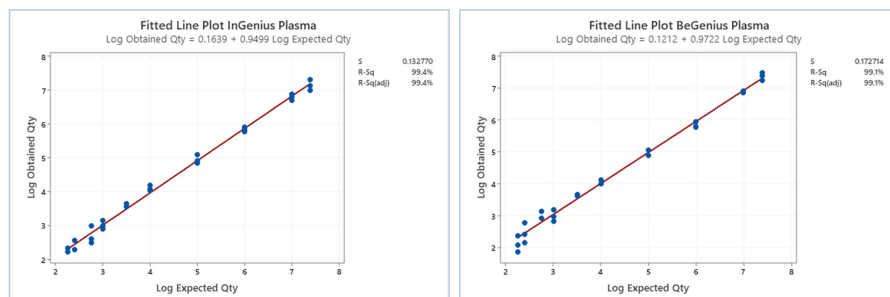
El panel constaba de diez puntos de dilución que abarcaron de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ copias/mL a 178 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de sangre, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R^2) de 0,994 para el instrumento **ELITE InGenius** y de 0,991 para el instrumento **ELITE BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD



El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,192 log copias/mL para el «**ELiTe InGenius**» y de 0,270 log copias/mL para el «**ELiTe BeGenius**») y exacta (sesgo de 0,197 log copias/mL para el «**ELiTe InGenius**» y de 0,163 log copias/mL para el «**ELiTe BeGenius**»): 250 copias/mL.

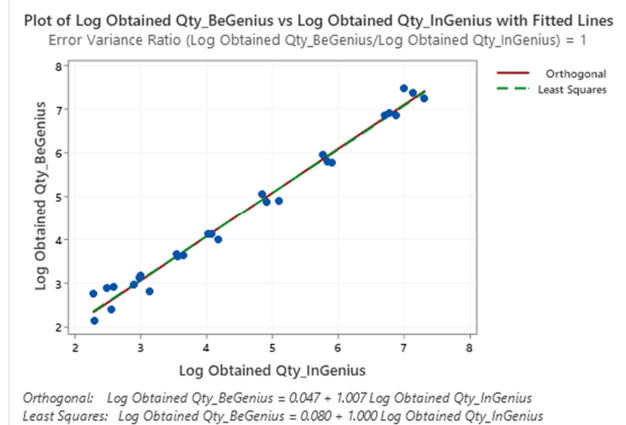
El límite superior de cuantificación (ULOQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,117 log copias/mL para el «**ELiTe InGenius**» y de 0,068 log copias/mL para el «**ELiTe BeGenius**») y exacta (sesgo de 0,393 log copias/mL para el «**ELiTe InGenius**» y de 0,297 log copias/mL para el «**ELiTe BeGenius**»): 25.000.000 copias/mL.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de plasma y los instrumentos ELITE InGenius y ELITE BeGenius		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
copias/mL	250	25.000.000

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

Los resultados se resumen en la siguiente figura.



En esta prueba, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente igual a 1,007 (IC del 95 %: 0,960; 1,054) y una intersección igual a 0,047 (IC del 95 %: - 0,180; 0,274). El análisis de regresión lineal generó un R^2 de 0,986.

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

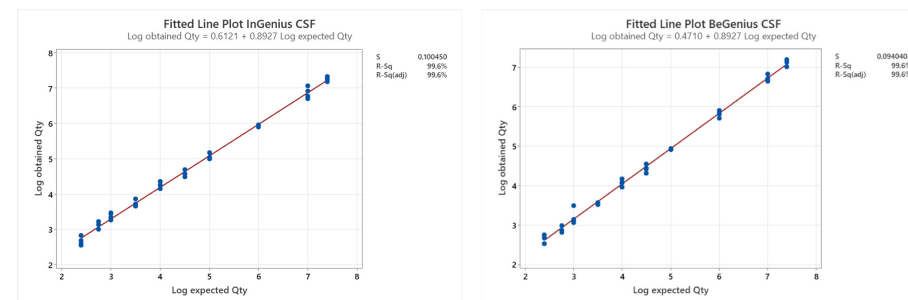
REF RTS031PLD

En las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR):

El panel constaba de diez puntos de dilución que abarcaron de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ copias/mL a 250 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 4 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de LCR, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R^2) de 0,996 para el instrumento **ELiTe InGenius** y de 0,996 para el instrumento **ELiTe BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



El límite inferior de cuantificación (LLOq) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,1209 log copias/mL para el «**ELiTe InGenius**» y de 0,0941 log copias/mL para el «**ELiTe BeGenius**») y exacta (sesgo de 0,2680 log copias/mL para el «**ELiTe InGenius**» y de 0,2527 log copias/mL para el «**ELiTe BeGenius**»): 250 copias/mL.

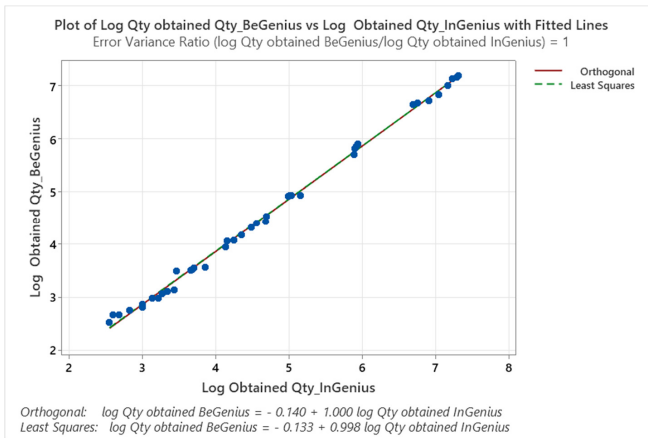
El límite superior de cuantificación (ULOQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0661 log copias/mL para el «**ELITE InGenius**» y de 0,0811 log copias/mL para el «**ELITE BeGenius**») y exacta (sesgo de 0,1434 log copias/mL para el «**ELITE InGenius**» y de 0,2804 log copias/mL para el «**ELITE BeGenius**»): 25.000.000 copias/mL.

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal para muestras de LCR y los instrumentos ELiTe InGenius y ELiTe BeGenius		
Unidad de medida	Límite inferior	Límite superior
copias/mL	250	25.000.000

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

Los resultados se resumen en la siguiente figura.

HSV1 ELITE MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF RTS031PLD**

En esta prueba, el análisis de regresión ortogonal generó una pendiente igual a 1,000 (IC del 95 %: 0,982; 1,016) y una intersección igual a 0,140 (IC del 95 %: - 0,223; 0,056). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,997.

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto «HSV1 ELITE MGB Kit» en los sistemas «**ELITE InGenius**» y «**ELITE BeGenius**» se evaluó analizando un panel de muestras de sangre recogidas en EDTA. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de VHS1 («Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Culture Fluid Heat Inactivated», ZeptoMetrix) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 633 copias/mL) y de 10 veces el LoD (aproximadamente 2110 copias/mL).

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

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

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

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELite InGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	-	-	-	24/24	23,59	0,41	1,72
3×LoD	8/8	36,31	0,51	1,40				
10×LoD	8/8	34,25	0,42	1,22				

Repetibilidad entre sesiones con el ELite InGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	-	-	-	48/48	23,64	0,55	2,31
3×LoD	16/16	36,15	0,52	1,44				
10×LoD	16/16	34,24	0,42	1,21				

En la prueba de repetibilidad con el «**ELITE InGenius**», el ensayo detectó la diana de VHS1 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS1 como para el Internal Control.

HSV1 ELITE MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF RTS031PLD**

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

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

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

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITE BeGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	-	-	-	24/24	26,87	0,59	2,19
3xLoD	8/8	37,82	0,65	1,73				
10xLoD	8/8	35,82	0,47	1,32				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITE InGenius BeGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	-	-	-	48/48	27,04	0,57	2,12
3xLoD	16/16	37,53	0,64	1,71				
10xLoD	16/16	35,55	0,53	1,50				

En la prueba de repetibilidad con el «**ELITE BeGenius**», el ensayo detectó la diana de VHS1 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS1 como para el Internal Control.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto «HSV1 ELITE MGB Kit» junto con los sistemas «**ELITE InGenius**» y «**ELITE BeGenius**» se evaluó analizando un panel de muestras de sangre. El panel incluyó una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con material de referencia certificado de VHS1 («Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Culture Fluid Heat Inactivated», ZeptoMetrix) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 633 copias/mL) y de 10 veces el LoD (aproximadamente 2110 copias/mL).

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

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

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

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

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITE InGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	-	-	-	24/24	23,55	0,57	2,40
3xLoD	8/8	36,91	0,77	2,10				
10xLoD	8/8	35,15	0,48	1,37				

HSV1 ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Reproducibilidad entre lotes con el ELITe InGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	-	-	-	24/24	23,09	0,63	2,73
3×LoD	8/8	36,99	0,61	1,64				
10×LoD	8/8	34,71	0,53	1,51				

En prueba de reproducibilidad con el «ELITe InGenius», el ensayo detectó la diana de VHS1 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS1 como para el Internal Control.

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

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

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

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

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe BeGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	-	-	-	24/24	26,84	0,76	2,81
3×LoD	8/8	37,26	0,59	1,58				
10×LoD	8/8	36,12	0,79	2,18				

Reproducibilidad entre lotes con el ELITe BeGenius								
Muestra	VHS1				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	-	-	-	24/24	26,55	0,85	3,21
3×LoD	8/8	37,96	1,08	2,83				
10×LoD	8/8	36,40	0,69	1,91				

En prueba de reproducibilidad con el «ELITe BeGenius», el ensayo detectó la diana de VHS1 tal como se esperaba y mostró valores de Ct con un %CV inferior al 5 % tanto para el VHS1 como para el Internal Control.

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, expresada como reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «HSV1 Molecular "Q" Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados, con el ELITe InGenius y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «ELITe InGenius»				
Muestra	Título nominal copias/mL	Título nominal log ₁₀ copias/mL	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ copias/mL
HSV1MQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	4,890
HSV1MQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	3,859
HSV1MQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	2,736
HSV1MQP01-Negative	Negativas	-	0/2	-

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

HSV1 ELITe MGB® Kit
Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Se realizaron análisis adicionales utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2014 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), que era un panel de diluciones de VHS1. Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, amplificación, detección e interpretación de los resultados con el «ELITe InGenius» y productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «ELITe InGenius»				
Muestra	Consenso conc. virus Log ₁₀	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ copias/mL
HSVDNA14-01	VHS1, 3,657	0,563	2/2	3,716
HSVDNA14-02	Negativo, N/A	N/A	0/2	No detectado
HSVDNA14-03	VHS1, 3,001	0,578	2/2	2,520
HSVDNA14-04	VHS1, 2,256	0,512	1/2	0,940
HSVDNA14-05	VHS1, 4,070	0,481	2/2	3,774
HSVDNA14-06	VHS2, 3,033	0,906	0/2	No detectado
HSVDNA14-07	VHS2, 2,394	0,618	0/2	No detectado
HSVDNA14-08	VHS2, 3,504	0,899	0/2	No detectado
HSVDNA14-09	VHS1, 2,481	0,477	2/2	1,976
HSVDNA14-10	VVZ, N/A	N/A	0/2	No detectado

Todas las muestras negativas se detectaron correctamente como negativas y todas las muestras positivas se detectaron como positivas de acuerdo con los resultados cualitativos definidos mediante consenso de un control de calidad externo (EQA). La muestra HSVDNA14-04 solo presentó un resultado positivo en 2 duplicados. Esto se explica con el hecho de que el título de la muestra está por debajo del límite de detección. Todas las muestras por encima del límite de detección se cuantificaron dentro del rango definido mediante el consenso para pruebas comerciales de PCR en tiempo real ± 2 desviaciones estándar.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas de sangre recogida en EDTA, plasma recogido en EDTA y líquido cefalorraquídeo utilizando el «ELITe InGenius». Como el ELITe BeGenius presentó un rendimiento analítico equivalente al del ELITe InGenius, puede suponerse que los resultados de sensibilidad diagnóstica obtenidos con el instrumento ELITe InGenius son aplicables también al instrumento ELITe BeGenius.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 50 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo «HSV12-04», una muestra del producto «QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, UK) (N=30) y añadiendo «HSV1 ELITe-IQC High» (ELITech Group S.p.A.) (N=20) a un título de 750 copias/mL, 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo «HSV1 ELITe-IQC High» (ELITech Group S.p.A.) a un título de 750 copias/mL y 20 muestras de LCR negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo «HSV1 ELITe-IQC High» (ELITech Group S.p.A.) a un título de 750 copias/mL.

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

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS1	50	49	1
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VHS1	30	30	0
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VHS1	20	20	0

49 de 50 muestras se confirmaron como positivas. Una muestra dio un resultado negativo. Esto puede explicarse por la imprecisión del título del material calibrado que se utilizó para el proceso de enriquecimiento (HSV12-04 sd = 0,517 log). En las muestras enriquecidas, esto puede dar lugar a una carga vírica inferior al límite de detección, por lo que las muestras pueden dar un resultado negativo de forma aleatoria.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a muestras de sangre fue del 98 %. Todas las muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo fueron válidas y positivas.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a muestras de plasma y de líquido cefalorraquídeo fue del 100 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas de sangre recogida en EDTA, plasma recogido en EDTA y líquido cefalorraquídeo, todas negativas para ADN de VHS1, utilizando el «**ELITe InGenius**». Como el **ELITe BeGenius** presentó un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, puede suponerse que los resultados de especificidad diagnóstica obtenidos con el instrumento **ELITe InGenius** son aplicables también al instrumento **ELITe BeGenius**.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 34 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VHS1, 38 muestras de plasma recogido en EDTA de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VHS1 y 22 muestras de LCR de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VHS1.

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

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VHS1	34	0	34
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VHS1	38	0	38
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VHS1	22	0	22

Todas las muestras de sangre, plasma y líquido cefalorraquídeo fueron válidas y negativas. En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

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

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

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

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Las muestras de LCR para la extracción del ácido nucleico se deben extraer de acuerdo con las directrices del laboratorio, evitando su contaminación con sangre del paciente, así como transportarse a +2/+8 °C y almacenarse a +2/+8 °C durante un máximo de cuatro horas; en caso contrario, es necesario congelarlas y almacenarlas a -20 °C durante treinta días como máximo, o a -70 °C durante periodos más largos.

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de LCR se realiza utilizando el kit «**EXTRAgen**», deben seguirse las indicaciones de las instrucciones de uso: empezar por **300 µL** de muestra y añadir **5 µL** de **CPE** para el Internal Control al principio de la extracción. Disolver la miniesfera de ácidos nucleicos extraídos en **60 µL** de agua ultrapura.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de líquido cefalorraquídeo se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **UUNI_E100S200_EL1**, que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL. Las muestras incluidas en las probetas primarias pueden cargarse directamente en el «**ELITe STAR**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 400 µL de **CPE** en la probeta de proteína transportadora tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN de líquido cefalorraquídeo se realiza con el «**ELITe GALAXY**» y la **versión**

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

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

Sangre recogida en EDTA

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

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**UUNI_E100S200_EL1**», que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL. Las muestras en las probetas primarias se pueden cargar directamente en el «**ELITe STAR**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteína transportadora tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza utilizando el kit «**EXTRAblood**», deben seguirse las indicaciones de las instrucciones de uso: comenzar por **200 µL** de muestra (con un máximo de 2 millones de leucocitos) y eluir el ADN en **100 µL** de tampón de elución.

Plasma recogido en EDTA

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

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**UUNI_E100S200_EL1**», que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL. Las muestras en las probetas primarias se pueden cargar directamente en el «**ELITe STAR**». Para cada muestra se necesita siempre un volumen mínimo de 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteína transportadora tal como se indica en el manual del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el «**ELITe GALAXY**» y la **versión**

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

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

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

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

Otras muestras:

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: suspensiones de leucocitos, suspensiones de granulocitos y líquido amniótico.

Sustancias interferentes

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

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

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

Controles de amplificación

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

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

Para el control positivo, utilizar el producto «HSV1 - ELITE Positive Control» o el producto «HSV1 ELITE Standard».

PROCEDIMIENTO

Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

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

Si se utiliza un «7300 Real-Time PCR System».

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

- Encender el termociclador en tiempo real, encender el ordenador, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de cuantificación absoluta («Absolute quantification»).
- Configurar (administrador del detector) el «detector» para la sonda de VHS1 con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «HSV1».
- Configurar («Detector Manager») el «detector» para la sonda de Internal Control con el marcador

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

(«reporter») = «VIC» (AP525 es análogo a VIC) y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «IC».

- Para cada pocillo utilizado en la microplaca, configurar (en «Well Inspector») el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir), la referencia pasiva («passive reference») o «ROX» (AP593 se utiliza en lugar de ROX, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o calibrador en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

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

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

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
NC	102	103	104	105							

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

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

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

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

- Modificar el tiempo tal como se indica en la tabla «Ciclo térmico».

- Establecer el número de ciclos a **45**.

- Configurar el volumen para la emulación del software de la transferencia térmica a la reacción («Sample volume») en **30 µL**.

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

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

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

	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 VHS1 con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «HSV1».
- Configurar («Detector Manager») el «detector» para la sonda de control interno con el marcador («reporter») = «VIC» (AP525 es similar al VIC) y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «IC».
- Para cada pocillo empleado en la microplaca, configurar (en «Well Inspector») el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir), la referencia pasiva («passive reference») o «CY5» (AP593 se utiliza en lugar de CY5, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o calibrador en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

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

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

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

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

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

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

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

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

Configuración de la amplificación

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

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

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

- Tomar y descongelar las probetas que contienen las muestras que se van a analizar. Mezclar suavemente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
- Tomar y descongelar las probetas de «HSV1 Q - PCR Mix» necesarias para la sesión, teniendo en cuenta que cada una de ellas es suficiente para preparar **25 reacciones**. Mezclar delicadamente, centrifugar el contenido durante 5 segundos y conservarlo en hielo.
- Tomar y descongelar las probetas de «HSV1 - ELITE Positive Control» o de HSV1 Q - PCR Standard. Mezclarlos delicadamente, centrifugarlos durante 5 segundos centrifugando el contenido y conservarlos en hielo.
- Tomar la **microplaca de amplificación** que va a utilizarse durante la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.

1. Pipetear con precisión **20 µL** de mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» en la parte inferior 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 con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción, **20 µL** de **agua para biología molecular** (no incluida en este producto) en el pocillo de la **microplaca de amplificación** del control negativo de amplificación, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando el **agua de grado molecular para biología** 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:

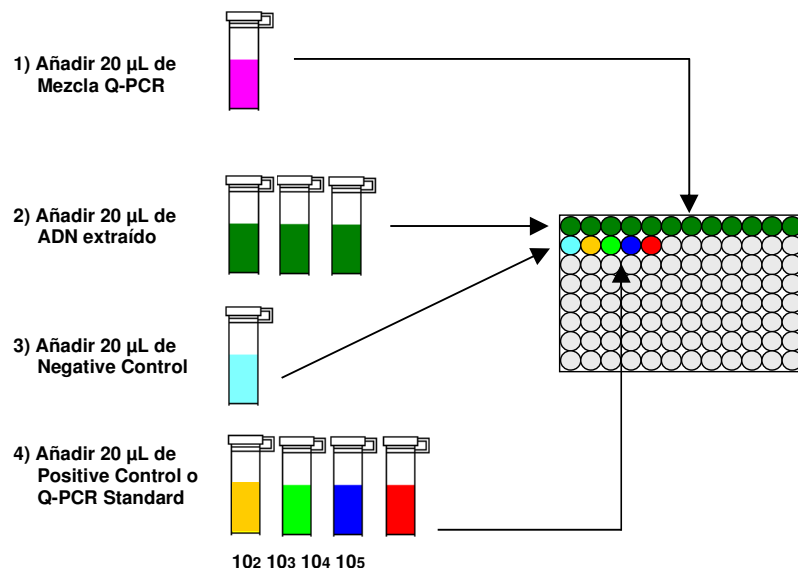
- Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de VHS1), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «HSV1 - ELITE Positive Control» en el pocillo correspondiente de la **placa de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando el producto «HSV1 - ELITE Positive Control» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

- Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación de ADN de VHS1), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «HSV1 - 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 «HSV1 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 «HSV1 Q - PCR Standard» (103, 104, 105).

5. Sellar de forma exacta la **microplaca de amplificación** con la **placa de sellado de amplificación**.
6. Transferir la **microplaca de amplificación** al termociclador en tiempo real del área de amplificación/detección de los productos de amplificación y comenzar el ciclo térmico para la amplificación guardando la configuración de la sesión con un nombre de archivo único y reconocible (por ejemplo «año-mes-día-VHS1-EGSpA»).

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

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



Nota: si la preparación de la amplificación se realiza con el instrumento «**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 en las instrucciones del manual de usuario para la configuración del módulo y los pasos indicados por el software.

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

Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica del VHS1 (detector FAM «HSV1») 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 VHS1, la fluorescencia FAM de la sonda específica del VHS1 puede empezar a aumentar antes del ciclo 15. En este caso, el rango de cálculo para el **punto de referencia** debe adaptarse desde el ciclo 6 hasta el ciclo en el que la fluorescencia FAM de la muestra empieza a aumentar, que detecta el software del instrumento («Results > Component»).

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

- Configurar manualmente el **umbral** para el detector FAM «HSV1» 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 «HSV1» 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 VHS1 («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 «HSV1»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Positive Control** es **Ct > 25** o **Ct Undetermined** para el VHS1, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante los pasos de amplificación o detección (dosificación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

***Nota:** cuando este producto se utiliza para la cuantificación de ADN de VHS1, se configuran las reacciones de «**Q - PCR Standard**» en lugar de la reacción del **Positive Control**. En este caso, es necesario validar la amplificación y la detección conforme a la reacción de amplificación del calibrador «**Q - PCR Standard 105**» (**Ct ≤25**).

En la reacción de amplificación del **Negative Control**, el valor de **Ct** del VHS1 (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 «HSV1»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado del **Negative Control** de la reacción de amplificación es diferente de **Ct Undetermined** para el VHS1, significa que se ha detectado el ADN diana. Esto significa que se han producido problemas durante el paso de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

En la reacción de amplificación de cada **muestra**, el valor de **Ct** del VHS1 se utiliza para detectar el ADN diana, mientras que el valor de **Ct** del Internal Control se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

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

Este producto puede detectar una cantidad mínima de unas 10 copias de ADN del gen de la gpD del VHS1 en la reacción de amplificación, que corresponde a 10 equivalentes genómicos por reacción (límite de detección, consultar la sección «Características de rendimiento»).

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

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ADN de VHS1
detector FAM «HSV1»	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	idóneo*	válida, positiva	DETECTADO
	Ct ≤35	Idónea	Válido, positivo	DETECTADO

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VHS1 y **Ct > 35** o **Ct Undetermined** para el Internal Control, significa que no ha sido posible detectar correctamente el ADN del Internal Control. En este caso, se han producido problemas durante el paso de amplificación (amplificación ineficaz o ausencia de amplificación) o durante el paso de extracción (reducción del título de ADN o presencia de inhibidores), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra no es idónea, el ensayo no es válido y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VHS1 y **Ct ≤ 35** para el Internal Control, significa que no se ha detectado ADN de VHS1 en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VHS1 presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

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

***Nota:** cuando en la reacción de amplificación de una muestra se detecta ADN de VHS1, el Internal Control puede dar un resultado **Ct > 35** o **Ct Undetermined**. De hecho, la reacción de amplificación de baja eficiencia para el Internal Control puede reemplazarse con la reacción de amplificación de alta eficiencia para ADN de VHS1. 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 VHS1 se utilizan para calcular la **curva de calibración** («Results > Standard Curve») para la sesión de amplificación y validar la amplificación y la detección tal como se describe en la tabla siguiente:

Curva de calibración detector FAM «HSV1»	Rango de aceptabilidad	Amplificación/Detección
Coefficiente de correlación (R2)	0,990 ≤ R2 ≤ 1,000	CORRECTA

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

Los valores de **Ct** del VHS1 en la reacción de amplificación de cada **muestra** y la **curva de calibración** de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ADN diana presente en las reacciones de amplificación de las muestras.

Este producto puede cuantificar de 1.000.000 a 10 copias de ADN del gen de la gpD del VHS1 en la reacción de amplificación, que corresponden a los equivalentes genómicos por reacción (rango de medición lineal, consultar la sección «Características de rendimiento»), tal como se describe en la tabla siguiente:

Resultado de la muestra detector FAM «HSV1»	Equivalentes genómicos del VHS1 por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1 × 10 ¹ ≤ cantidad ≤ 1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad <1 × 10 ¹	MENOS DE 10

Los resultados (**cantidad**) de cada **muestra** («Results > Report») se utilizan para calcular los equivalentes genómicos (**gEq**) del VHS1 presentes en la muestra extraída (**Nc**) según la siguiente fórmula:

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

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Donde:

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

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

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

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

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

Cuando el kit de extracción «EXTRAgen» se utiliza con muestras de líquido cefalorraquídeo y se necesita un resultado expresado en **gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para líquido cefalorraquídeo y el «EXTRAgen»

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 12,5 \times \text{Cantidad}$$

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

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

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

Cuando el sistema de extracción «ELITE GALAXY» se utiliza con muestras de sangre o de plasma recogidas en EDTA o con muestras de líquido cefalorraquídeo y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

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

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

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

Fórmula simplificada para sangre y el «EXTRAblood»

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

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

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

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 10 \times \text{Cantidad}$$

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

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

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

Cálculo de los límites del rango de medición lineal

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

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

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

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

Límites del rango de medición lineal (gEq/mL) con el «EXTRAgen»
Límite inferior (gEq/mL) = $12,5 \times 10$ gEq Límite superior (gEq/mL) = $12,5 \times 1.000.000$ gEq
de 125 a 12.500.000 gEq/mL

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

Límites del rango de medición (gEq/mL) con «EXTRAblood»
Límite inferior (gEq/mL) = 25×10 gEq Límite superior (gEq/mL) = $25 \times 1.000.000$ gEq
de 250 a 25.000.000 gEq/mL

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

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «ELITe STAR»
Límite inferior (gEq/mL) = 28×10 gEq Límite superior (gEq/mL) = $28 \times 1.000.000$ gEq
de 280 a 28.000.000 gEq/mL

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

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «ELITe GALAXY»
Límite inferior (gEq/mL) = 35×10 gEq Límite superior (gEq/mL) = $35 \times 1.000.000$ gEq
de 350 a 35.000.000 gEq/mL

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

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «NucliSENS® easyMAG®»
Límite inferior (gEq/mL) = 10×10 gEq Límite superior (gEq/mL) = $10 \times 1.000.000$ gEq
de 100 a 10.000.000 gEq/mL

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

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «QIAasymphony® SP/AS»
Límite inferior (gEq/mL) = 12×10 gEq Límite superior (gEq/mL) = $12 \times 1.000.000$ gEq
de 120 a 12.000.000 gEq/mL

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección

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

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

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

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

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» se verificó con un panel de diluciones de VHS1 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo la muestra «HSV08-01» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido) en una muestra de sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VHS1. Las concentraciones virales variaron entre 10 gEq/mL y 560 gEq/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe GALAXY» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

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

Límite de detección para muestras de sangre y el «ELITe GALAXY» (gEq/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	211 gEq/mL	135 gEq/mL	498 gEq/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» se verificó con un panel de diluciones de VHS1 dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo la muestra «HSV08-01» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics, Ltd, Reino Unido) en una muestra de plasma recogida en EDTA negativa para ADN de VHS1. Las concentraciones virales variaron entre 10 gEq/mL y 560 gEq/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción y configuración de la PCR con el «ELITe GALAXY» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

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

Límite de detección para las muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» (gEq/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	95 gEq/mL	55 gEq/mL	554 gEq/mL

Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

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

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

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

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

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

Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente:

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

Los límites del rango de medición lineal que se refieren al kit de extracción utilizado, expresados como gEq/mL, se calculan en la página 25.

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión del ensayo, expresada como variabilidad de los resultados obtenidos con varios duplicados de una misma muestra analizada en la misma sesión, han permitido obtener un coeficiente de variación (% CV) porcentual medio de un 22,7 % de las cantidades medidas, dentro del rango de 10⁶ a 10¹ moléculas, en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

La exactitud del ensayo, 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, permitió obtener una inexactitud porcentual media (% de inexactitud) de un 10,1 % de las cantidades medidas, dentro del margen de 10⁶ a 10¹ moléculas, en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

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

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con un material de referencia calibrado

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

Las pruebas se realizaron utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VHS1 dentro del límite de concentración («QCMD 2007 Herpes Simplex Virus EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se utilizó en duplicados para llevar a cabo el análisis entero, a saber, extracción con el **EXTRAgen** y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «EXTRAgen»				
Muestra	Consenso de concentración log ₁₀ de virus	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
HSV07-01	VHS2, 4,243	0,730	0/2	No detectado
HSV07-02	VHS1, 4,282	0,363	2/2	4,292
HSV07-03	Negativo, N/A	N/A	0/2	No detectado
HSV07-04	VHS1, 2,593	0,536	2/2	3,040
HSV07-05	VHS2, 2,695	1,301	0/2	No detectado
HSV07-06	Negativo, N/A	N/A	0/2	No detectado
HSV07-07	VHS1, 7,292	0,387	2/2	7,396
HSV07-08	VHS1, 4,204	0,339	2/2	4,336
HSV07-09	VHS2, 1,890	0,313	0/2	No detectado
HSV07-10	VHS1, 5,275	0,292	2/2	5,351
HSV07-11	VHS2, 6,134	0,897	0/2	No detectado
HSV07-12	VVZ, N/A	N/A	0/2	No detectado

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

Se realizaron más pruebas utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VHS1 dentro del límite de concentración («QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el **ELITe STAR** y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Pruebas con materiales de referencia calibrados y el «ELITe STAR»				
Muestra	Consenso de concentración log ₁₀ de virus	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
HSV12-01	Negativo, N/A	-	0/2	-
HSV12-02	VHS1, 3,910	0,582	2/2	4,047
HSV12-03	VHS2, 1,948	0,305	0/2	-
HSV12-04	VHS1, 3,680	0,547	2/2	4,070
HSV12-05	VHS2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	VHS1, 2,318	0,441	2/2	2,353
HSV12-07	VHS1, 2,014	0,296	0/2	-
HSV12-08	VHS2, 3,424	1,098	0/2	-
HSV12-09	Negativo, N/A	-	0/2	-
HSV12-10	VHS2, 3,417	1,042	0/2	-

Todas las muestras negativas se notificaron correctamente. Las muestras positivas dentro del LoD teórico del sistema (280 copias/mL) se detectaron correctamente dentro del rango del valor de «consenso» medio del ensayo comercial ± 1 desviación estándar. Una muestra por debajo del límite teórico de detección del sistema (103 copias/mL) se notificó como negativa. Las muestras con un título inferior al límite de detección pueden notificarse como positivas o negativas de forma aleatoria.

Se realizaron más pruebas utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de VHS1 dentro del límite de concentración («QCMD 2012 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó llevando a cabo el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el **ELITe GALAXY** y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Pruebas con materiales de referencia calibrados y el «ELITe GALAXY»				
Muestra	Consenso de concentración log ₁₀ de virus	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
HSV12-01	Negativo, N/A	-	0/2	-
HSV12-02	VHS1, 3,910	0,582	2/2	3,895
HSV12-03	VHS2, 1,948	0,305	0/2	-
HSV12-04	VHS1, 3,680	0,547	2/2	3,867
HSV12-05	VHS2, 1,352	0,629	0/2	-
HSV12-06	VHS1, 2,318	0,441	2/2	2,215
HSV12-07	VHS1, 2,014	0,296	1/2	1,962
HSV12-08	VHS2, 3,424	1,098	0/2	-
HSV12-09	Negativo, N/A	-	0/2	-
HSV12-10	VHS2, 3,417	1,042	0/2	-

Todas las muestras negativas se notificaron correctamente. Las muestras positivas se detectaron correctamente dentro del rango del valor de «consenso» medio del ensayo comercial ± 1 desviación estándar. Uno de los dos duplicados de la muestra «HSV12-07» no se detectó. Este resultado diferente se explica por el hecho de que el bajo título de la muestra (103,28 gEq/mL) se encuentra en torno al límite de detección del método. De todos modos, la muestra se notificó como positiva.

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

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

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de la sonda fluorescente en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para el gen de la gpD del VHS1 mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó de analizando muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo y de sangre recogida en EDTA, que habían dado un resultado positivo para ADN de VHS1.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 21 muestras negativas de líquido cefalorraquídeo, que se enriquecieron a un título bajo de ADN de VHS1 añadiendo las muestras «HSV07-02», «HSV07-08» y «HSV07-10» del producto «QCMD 2007 Herpes Simplex Virus Proficiency Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 20 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VHS1 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, Francia), enriquecidas a un título bajo de ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV08-03» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra de líquido cefalorraquídeo se utilizó para llevar a cabo el análisis entero, a saber, extracción con el «**EXTRAgen**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Cada muestra de sangre se utilizó para llevar a cabo el análisis entero, a saber, extracción con el «**EXTRAblood**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VHS1	21	21	0
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS1	20	20	0

Todas las muestras enriquecidas se detectaron correctamente como positivas para ADN de VHS1. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV08-07» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), 30 muestras de plasma negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV08-03» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 30 muestras de sangre negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV08-03» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITE STAR**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VHS1	22	22	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VHS1	30	30	0
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS1	30	27	1

Dos muestras positivas para VHS1 resultaron ser no válidas.

Una muestra reportó un resultado negativo. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 98,7 %.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 20 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV08-07» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido), 30 muestras de plasma negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV08-07» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 30 muestras de sangre negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV08-07» del producto «QCMD 2008 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y la muestra «HSV10-07» del producto «QCMD 2010 Herpes Simplex Human virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITE GALAXY**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VHS1	20	20	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VHS1	30	30	0
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS1	30	30	0

Todas las muestras enriquecidas se detectaron correctamente como positivas para ADN de VHS1. En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 %.

Especificidad analítica: ausencia de marcadores potencialmente interferentes con reactividad cruzada

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

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

La especificidad analítica se evaluó utilizando como material de referencia calibrado un panel que incluía muestras positivas para VHS2 y positivas para VVZ (producto «QCMD 2007 Herpes Simplex Virus EQA Panel», Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra se analizó en duplicados, realizando el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

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

No se detectó reactividad cruzada con muestras positivas para VHS2 y VVZ.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras negativas, se analizó utilizando algunas muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VHS1, así como muestras de sangre recogida en EDTA que habían dado un resultado negativo para ADN de VHS1.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 28 muestras de líquido cefalorraquídeo que eran negativas para ADN de VHS1 (que se habían analizado con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real) y 24 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes supuestamente negativas para ADN de VHS1 (Biological Sample Library Europe S.A.S., Lyon, Francia). Cada muestra de líquido cefalorraquídeo se utilizó para llevar a cabo el análisis entero, a saber, extracción con el «**EXTRAgen**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. Cada muestra de sangre se utilizó para llevar a cabo el análisis entero, a saber, extracción con el «**EXTRAblood**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VHS1	28	0	27
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VHS1	24	1	23

Una muestra de líquido cefalorraquídeo dio un resultado no válido, posiblemente por la presencia de un inhibidor.

Una muestra de sangre presentó un resultado diferente con un título vírico bajo (menos de 1 gEq/reacción). Esta muestra dio un resultado negativo, pero válido en una sesión de amplificación independiente y se encuentra por debajo del límite de detección del producto que presenta de forma aleatoria resultados negativos o positivos en las distintas sesiones.

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

El resultado diferente se explica por el hecho de que la muestra de sangre solo es supuestamente negativa para ADN de VHS1, un virus ampliamente extendido de forma latente entre la población. En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 98,0 %.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 24 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VHS1, 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VHS1 y 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VHS1 (que se habían analizado con un producto para diagnóstico *in vitro* con marcado CE para amplificación en tiempo real). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITE STAR**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VHS1	24	0	24
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VHS1	30	0	30
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VHS1	30	1	28

Una muestra negativa para VHS1 resultó ser no válida.

Una muestra presentó un resultado positivo con un título vírico de 65 gEq/mL. Como consecuencia del bajo título, las muestras no pudieron detectarse durante el análisis con el método de referencia. En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 98,8 %.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo que eran negativas para ADN de VHS1, 34 muestras de plasma recogido en EDTA que eran supuestamente negativas para ADN de VHS1 y 36 muestras de sangre recogida en EDTA que eran supuestamente negativas para ADN de VHS1. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «**ELITE GALAXY**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VHS1	22	0	22
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VHS1	34	0	34
Sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VHS1	36	0	36

Todas las muestras se detectaron correctamente como negativas para ADN de VHS1.

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

Analizador Roche cobas z 480

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

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

Sangre recogida en EDTA

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

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

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

Plasma recogido en EDTA

Las muestras de plasma para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse e identificarse de acuerdo con las directrices para laboratorios,

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

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

Otras muestras:

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: líquido cefalorraquídeo, suspensiones de leucocitos, suspensiones de granulocitos y líquido amniótico.

Substancias interferentes

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

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

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

Controles de amplificación

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

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

Para el control positivo, utilizar el producto «**HSV1 - ELITE Positive Control**» o, de manera alternativa, el producto «**VHS1 - ELITE Positive Control RF**» o el producto «**HSV1 ELITE Standard**».

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO

Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

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

Cuando se utiliza el **analizador cobas z 480 (Roche)**:

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

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

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

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

- seleccionar los canales de detección de la señal: «detector» para el sensor de VHS1 con el «channel FAM 465-510» y «detector» para el sensor del control interno IC con «channel VIC 540-580»;

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

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

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

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
NC	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

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

Configuración de la amplificación

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

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

- Recuperar y descongelar las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar las probetas que contienen la mezcla «HSV1 Q - PCR Mix» que se necesita para la sesión, recordando que cada una de ellas es suficiente para realizar **25 reacciones**. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar las probetas que contienen el producto «HSV1 - Positive Control» o, de manera alternativa, el producto «HSV1 - ELITE Positive Control RF» o el calibrador «HSV1 Q - PCR Standard». Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrífuga durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y luego conservarlas en hielo.

- Tomar la **placa AD** que va a utilizarse en la sesión, asegurándose de llevar guantes sin talco al manipularla y no dañar los pocillos.

1. Sin que se formen burbujas y colocándola con precisión en el fondo, verter **20 µL** de la mezcla de reacción «HSV1 Q - PCR Mix» en los pocillos de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**.

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

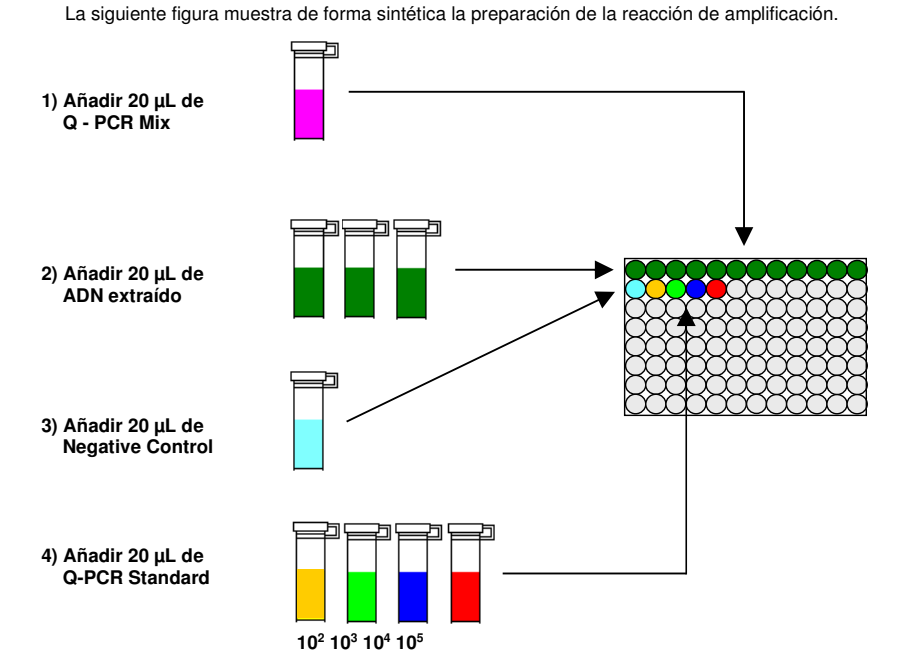
2. Colocándola con precisión en la mezcla de reacción, verter **20 µL** de **ADN extraído** de la primera muestra en el pocillo correspondiente de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ADN extraído** tres veces en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

4. Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:
 - Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de VHS1), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «HSV1 - Positive Control» o, de manera alternativa, el producto «HSV1 - ELITE Positive Control RF» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando el «HSV1 - Positive Control» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

- Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación de ADN de VHS1), pipetear con precisión, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «HSV1 - 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 «HSV1 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 «HSV1 Q - PCR Standard» (10³, 10⁴, 10⁵).

5. Sellar cuidadosamente la **placa AD** con **película selladora**.
6. Transferir la **placa AD** al termociclador en tiempo real en el área de amplificación/detección de los productos de amplificación y comenzar el ciclo térmico de la amplificación guardando la configuración de la sesión con un nombre de archivo único y reconocible (por ejemplo «año-mes-día-VHS1-EGSpA»).

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



Análisis de los resultados cualitativos

Los valores de fluorescencia emitidos registrados por el detector de VHS1 y el detector del Internal Control (IC) durante las reacciones de amplificación deben analizarse con el software del instrumento.

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

Seleccionar el grupo de muestras que se quiere analizar.

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

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

Para muestras de **plasma**:

- Configurar manualmente los campos «Threshold» y «Noiseband» para el detector FAM «HSV1» en **0.55**.
- Configurar manualmente los campos «Threshold» y Noiseband para el detector VIC «IC» en **1.2**.

Para muestras de **sangre**:

- Configurar manualmente los campos «Threshold» y «Noiseband» para el detector FAM «HSV1» en **0.80**.
- Configurar manualmente los campos «Threshold» y Noiseband para el detector VIC «IC» en **1.5**.

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

Los valores de **Ct** para el VHS1 en las reacciones de amplificación de los cuatro calibradores «**Q-PCR Standard**» se utilizan para calcular la **curva de calibración** («Results > Standard Curve») de dicha sesión de amplificación y validar la amplificación y la detección tal como se muestra en la tabla siguiente:

Reacción Q - PCR Standard 10 ⁵ Detector «HSV1»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Positive Control** es **Ct > 25** o **Ct Undetermined** para el VHS1, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. Esto significa que se han producido problemas durante los pasos de amplificación o detección (dosificación incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo, configuración incorrecta del ciclo térmico), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

*** Nota:** cuando este producto se utiliza para la cuantificación de ADN de VHS1, se configuran las reacciones de «**Q - PCR Standard**» en lugar de la reacción del **Positive Control**. En este caso, es necesario validar la amplificación y la detección conforme a la reacción de amplificación del calibrador «**Q - PCR Standard 10⁵**» (**Ct ≤25**).

Durante la reacción de amplificación del **Negative Control**, el valor de **Ct** para el VHS1 (ventana «Analysis») sirve para validar la amplificación y la detección, tal como se muestra en la tabla siguiente:

Reacción del Negative Control Detector «HSV1»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined	NEGATIVO	CORRECTA

Si el resultado de la reacción de amplificación del **Negative Control** es diferente de **Ct Undetermined** para el VHS1, significa que se ha detectado la presencia del ADN diana. Se han producido problemas durante la fase de amplificación (contaminación), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos positivos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir de la fase de amplificación.

Durante las reacciones de amplificación para cada **muestra**, el valor de **Ct** del VHS1 se utiliza para detectar la presencia de ADN diana, mientras que el valor de **Ct** del Internal Control se utiliza para validar la extracción, la amplificación y la detección.

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

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

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ADN de VHS1
Detector «HSV1»	Detector «IC»			
Ct Undetermined	Ct >35 o Ct Undetermined	no apta	no válida	-
	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 la muestra es **Ct Undetermined** para el VHS1 y **Ct > 35** o **Ct Undetermined** para el Internal Control, significa que no ha sido posible detectar correctamente el ADN del Internal Control. En este caso, se han producido problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficaz o nula) o durante el paso de extracción (degradación del ADN de la muestra, muestra con un número insuficiente de células, reducción del título de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el ADN extraído), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra es no idónea, el ensayo es no válido y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VHS1 y **Ct ≤35** para el Internal Control, significa que el ADN de VHS1 no se ha detectado en el ADN extraído de la

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VHS1 presente una concentración inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Características de rendimiento»). En este caso el resultado podría ser un falso negativo.

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

Nota: si se detecta ADN de VHS1 durante la reacción de amplificación de una muestra, la amplificación del Internal Control puede producir un resultado de «Ct > 35» o «Ct Undetermined». De hecho, la reacción de amplificación del Internal Control de baja eficiencia puede eliminarse a partir de la competencia con la reacción de alta eficiencia del VHS1. En este caso, la muestra será de todas maneras idónea y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis de los resultados cuantitativos

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

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

Los valores de **Ct** para el VHS1 en las reacciones de amplificación de cada **muestra** y la **curva de calibración** (botón «Standard Curve») de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ADN diana presente en las reacciones de amplificación relacionadas con las muestras.

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

Resultado de la muestra Detector FAM «HSV1»	Copias de VHS1 por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1,0 × 10 ¹ ≤ cantidad ≤ 1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad >1,0 × 10 ¹	MENOS DE 10

Los resultados (**cantidad**) relacionados con cada **muestra** (ventana «Analysis») sirven para calcular las **copias** de VHS1 presentes en la muestra origen (**Nc**) según la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

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

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

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

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

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

Fórmula simplificada para de sangre y el MagNA Pure 24

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

HSV1 ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección

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

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

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

Sensibilidad analítica: rango de medición lineal

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

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

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

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

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Rango de medición lineal utilizando el MagNA Pure 24		
	Límite inferior	Límite superior
copias/mL	25	25.000.000
copias/reacción	10	10.000.000

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

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

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

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

La exactitud de este ensayo, expresada como la diferencia entre la media de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra y el valor de concentración teórico de la muestra, permitió obtener un porcentaje de inexactitud media de la cantidad logarítmica medida de alrededor del 3 % en el rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

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

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, definida como la reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el producto «HSV1 Molecular 'Q' Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 4 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: la extracción, con el sistema de extracción automático **MagNA Pure 24** y la amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el «MagNA Pure 24»	
Muestra	Positivos/Duplicados
HSV1MQP01-High	2/2
HSV1MQP01-Medium	2/2
HSV1MQP01-Low	2/2
HSV1MQP01-Negative	0/2

Todas las muestras se detectaron correctamente.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV1MQP01-High» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 29 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VHS1, que se enriquecieron con ADN de VHS1 añadiendo la muestra «HSV1MQP01-High» (Qnostics Ltd, Reino Unido).

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

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VHS1	30	30	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VHS1	29	29	0

Todas las muestras fueron válidas en el primer análisis y se confirmaron como positivas para ADN de VHS1.

La sensibilidad diagnóstica total del ensayo fue del 100 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 40 muestras de sangre recogida en EDTA supuestamente negativas para ADN de VHS1, así como 34 muestras de plasma recogido en EDTA supuestamente negativas para ADN de VHS1.

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

Muestras	N	positivas	negativas
Sangre recogida en EDTA supuestamente negativa para ADN de VHS1	40	1	39
Plasma recogido en EDTA supuestamente negativo para ADN de VHS1	34	0	34

Todas las muestras de sangre fueron válidas en el primer análisis y 39 de 40 muestras de sangre se confirmaron como negativas para ADN de VHS1, mientras que dos muestras dieron un resultado positivo, diferente del resto.

La especificidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de sangre fue del 98 %.

Todas las muestras de plasma fueron válidas en el primer análisis y se confirmaron como negativas para ADN de VHS1.

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

Robustez: resultados no válidos utilizando las muestras clínicas

La robustez de este ensayo, expresada como la evaluación de los resultados no válidos utilizando las muestras clínicas en el primer análisis, se verificó analizando muestras clínicas.

El número de muestras no válidas se verificó utilizando los resultados de muestras clínicas negativas y positivas para ADN de VHS1, tras analizarlas utilizando el sistema de extracción automático **«MagNA Pure 24»** y realizando la amplificación con productos ELITechGroup S.p.A. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Muestras	N	No válida	%
Sangre recogida en EDTA	70	0	0
Plasma recogido en EDTA	63	0	0

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 recogen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «HSV1 ELITe MGB® Kit», FTP RTS031PLD.

BIBLIOGRAFÍA

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

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

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

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

Utilizar las diferentes plataformas únicamente con las muestras clínicas asociadas que se indican en la sección «Muestras y controles».

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 para la extracción de ácidos nucleicos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, el método de amplificación en tiempo real utilizado en este producto es susceptible de sufrir contaminación cruzada con las muestras clínicas positivas para VHS1, los controles positivos y los propios productos de amplificación. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar la contaminación cruzada. No obstante, esta solo puede evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo atentamente estas instrucciones de uso.

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

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

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

la detección de ácidos nucleicos.

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

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

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

Un resultado negativo obtenido con este producto significa que no se ha detectado ADN de VHS1 en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VHS1 presente un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

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

Los posibles polimorfismos en la región del genoma vírico cubierto por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección de ADN de VHS1.

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

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

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

ADN diana no detectado en las reacciones del Positive Control o del calibrador «Q - PCR Standard» o coeficiente de correlación no válido para la curva de calibración	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Prestar atención al distribuir los reactivos en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo. Revisar los volúmenes de la mezcla de reacción distribuida. Revisar los volúmenes del control positivo o del calibrador distribuido.
Configuración incorrecta de la sesión en el ELITE InGenius® y el ELITE BeGenius®	Comprobar la posición de la mezcla de reacción, la del control positivo o la de los calibradores. Comprobar el volumen de la mezcla de reacción, el del control positivo y el de los calibradores.
Degradación de la sonda.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de reacción.
Degradación del Positive Control o del calibrador.	Utilizar una nueva porción de control positivo o de calibrador.
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la configuración de la posición del control positivo o las reacciones del calibrador en el instrumento. Comprobar la configuración del ciclo térmico en el instrumento.

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 y los estándares en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.
Configuración incorrecta de la sesión en el ELITE InGenius® y el ELITE BeGenius®	Comprobar la posición de la mezcla de reacción o la del control negativo. Comprobar el volumen de la mezcla de reacción o el del control negativo.
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.	Usar una nueva porción de agua.
Contaminación de la mezcla de reacción.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla de reacción.
Contaminación de la extracción/preparación del área de 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.

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

HSV1 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

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 control positivo.	Verificar que el valor de Ct del detector FAM sea inferior a 30. Una alta cantidad de producto de amplificación al final de la reacción puede interferir con el análisis de la curva de fusión. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia del ADN diana con una posible mutación. El ADN diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación.

Con el ELITe InGenius® y el ELITe BeGenius®: Error 30103

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

HSV1 ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS031PLD

SÍMBOLOS

REF

Número de catálogo



Límite superior de temperatura

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad (último día del mes)

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*Cumple los requisitos de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*.

Contenido suficiente para «N» análisis.



Atención: Consultar las instrucciones de uso.

CONT

Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol



Fabricante

HSV1 ELITe MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real****REF RTS031PLD****AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA**

Este producto contiene reactivos con licencia LTC.

Este producto se vende bajo acuerdos de licencia entre ELITechGroup S.p.A. y sus asociados y LTC. La 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 información sobre la compra de una licencia de este producto para fines distintos de aquellos establecidos anteriormente, contactar con Licensing Department, LTC Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Teléfono: +1 (760) 603-7200. Fax: +1 (760) 602-6500. Correo electrónico: outlicensing@LTC.com.

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

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

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

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

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

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

Ficoll® es una marca registrada de GE Healthcare.

HSV1 ELiTe MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS031PLD



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

A. Intended use

The «**HSV1 ELiTe MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with the instruments **ELiTe InGenius®** and **ELiTe BeGenius®**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV1	Glicoprotein D (gpD)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › **Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF**

D. Kit content

HSV1 Q-PCR Mix

 X 4

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

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

E. Material required not provided in the kit

- › **ELiTe InGenius®** instrument: INT030
- › **ELiTe BeGenius®** instrument: INT040
- › **ELiTe InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- › **ELiTe InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- › **ELiTe InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
- › **HSV1 - ELiTe Standard:** STD031PLD
- › **HSV1 - ELiTe Positive Control:** CTR031PLD
- › **CPE – Internal Control:** CTRCPE
- › **ELiTe InGenius Waste Box:** F2102-000
- › **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S
- › **1000 µL Filter Tips Tecan :** 30180118

F. Protocol

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

G. Performance ELiTe InGenius® and ELiTe BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	211 cp / mL	211 – 25,000,000	98% 49/50*	100% 34/34*
Plasma	250 cp /mL	250 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 38/38*
CSF	250 cp / mL	250 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

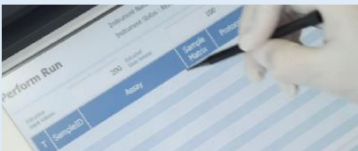
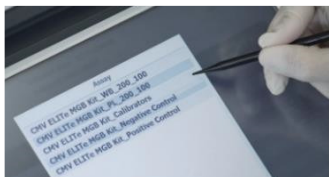
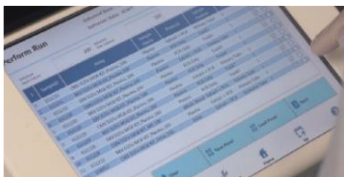
H. Procedures ELITE InGenius®

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

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify calibrators: HSV1 Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: HSV1 positive and negative controls in the "Control menu" <i>N.B:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the Q- PCR-Mix and the Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
---	--	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

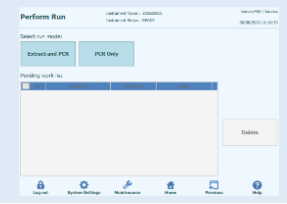
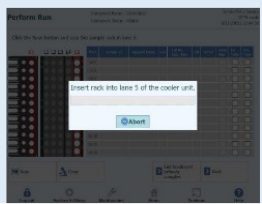
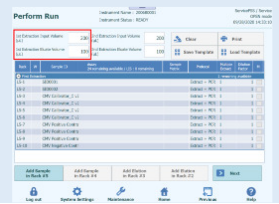
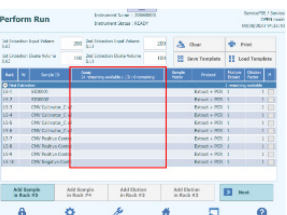
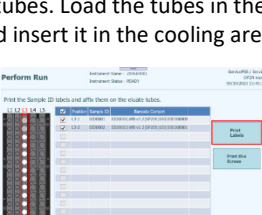
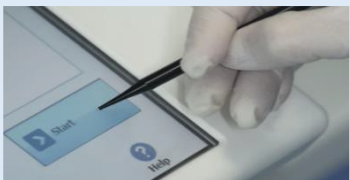
L. Procedures ELITE BeGenius[®]

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

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password Select the mode “Closed”	2. Verify calibrators: HSV1 Q-PCR standard in the “Calibration menu” Verify controls: HSV1 pos. and neg. controls in the “Control menu” <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the HSV1 Q- PCR-Mix and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
--	--	---

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

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

Note: if a second extraction is performed repeat steps from 2 to 4

Procedure 2 - PCR only

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

Procedure 3 - Extraction only

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

HSV1 ELITE MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS031PLD



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

A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **ABI PCR thermal cyclers** (Thermo-Fisher) and the following extraction systems: **ELITE STAR** (ELITechGroup), **ELITE GALAXY** (ELITechGroup), **easyMAG** (BioMérieux) or **QIAasymphony** (Qiagen).

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV1	Glicoprotein D (gpD)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

HSV1 Q-PCR Mix



X 4

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

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

E. Material required not provided in the kit

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

- › **HSV1 ELITE Standard**: STD031PLD
- › **HSV1 - ELITE Positive Control**: CTR031PLD
- › **CPE - Internal Control**: CTCRPE
- › **easyMAG** - Generic protocol 2.0.1
- › **QIAasymphony** - DNA Mini kit or DSP Virus/Pathogen Midi kit
- › **Molecular biology grade water**

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ELITE STAR - ABI	Whole blood	10 gEq/reaction	96% (27/28)*	97% (28/29)*
	Plasma	10 gEq/reaction	100% (30/30)*	100% (30/30)
	CSF	10 gEq/reaction	100% (22/22)*	100% (24/24)*
ELITE GALAXY - ABI	Whole blood	211 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (36/36)*
	Plasma	95 gEq/mL	100% (30/30)*	100% (34/34)*
	CSF	10 gEq/reaction	100% (20/20)*	100% (22/22)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

Extraction	Validated matrix	Sample volume processed	Min. sample volume	Total eluate volume	CPE Internal Control volume
ELITE Star	WB, Plasma, CSF	200 µL	700 µL	100 µL	200 µL
ELITE Galaxy	WB, Plasma	300 µL	400 µL	200 µL	10 µL
EasyMAG	CSF, Plasma	500 µL	-	100 µL	5 µL
QIAasympphony	Plasma	500 µL	100 µL	85 µL	6 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

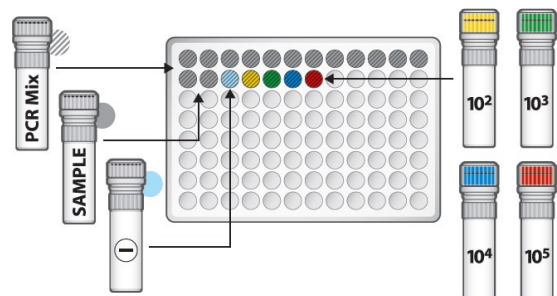
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV1" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C

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

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

Amplification - PCR Set -up

1. Thaw HSV1 Q-PCR Mix and Q-PCR standard tubes
2. Mix gently and spin-down
3. Pipet **20 µL** of Q-PCR-Mix in all microplate wells in use
4. Add, **20 µL** of extracted DNA in sample wells, **20 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **20 µL** of the 4 Q-PCR standards in standard curve wells. Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Amplification – Baseline and Threshold for qualitative analysis

Instrument	Baseline	HSV1 FAM	Internal Control VIC
7500 Fast Dx Real Time PCR	6 - 15	0.2	0.1
7300 Real Time PCR	6 - 15	0.1	0.05

Interpretation - Qualitative results

HSV1 Ct value	Internal Control Ct value	Interpretation
Determined	—	Positive
Undetermined	Ct ≤ 35	Negative
	Ct >35 or Undetermined	Invalid*

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The HSV1 Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction.

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

HSV-1 ELITE MGB® Kit used with Cobas-Z 480 PCR instruments

Ref.: RTS031PLD



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

A. Intended use

The «**HSV1 ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of type 1 Herpes Simplex human virus (HSV1)** in DNA samples extracted from cerebrospinal fluid (CSF), whole blood collected in EDTA, plasma collected in EDTA.

The product is intended for use in the diagnosis and monitoring of HSV1 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes. The assay is CE-IVD validated in combination with **Cobas – Z 480 analyzer (Roche)** and the following extraction systems: **MagNA Pure 24 System**.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
HSV1	Glicoprotein D (gpD)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole blood EDTA
- › Plasma EDTA

D. Kit content

HSV1 Q-PCR Mix
 X 4
Ready-to-use PCR Master Mix 4 tubes of 540 µL 100 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube
› Maximum shelf-life: 24 months › Storage Temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- › Cobas – Z 480 analyzer PCR Instrument
- › MagNA Pure 24 System, software 1.0
- › HSV1 - ELITE Positive Control: CTR031PLD
- › HSV1 ELITE Standard: STD031PLD
- › CPE Internal Control: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (29/29)*	97.5% (39/40)*
	Plasma	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (34/34)*

*confirmed samples/tested samples

G. Procedure

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

Extraction - Validated systems

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

Amplification - Settings of Cobas-Z 480 PCR instruments

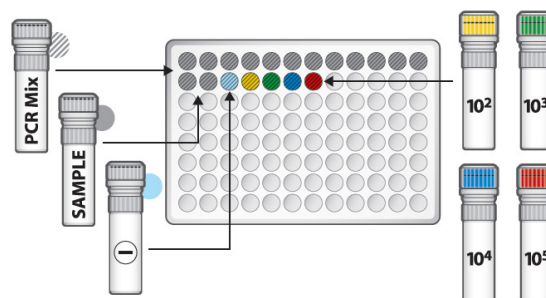
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "HSV1" detector with "FAM" and quencher "465 - 510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "540 -580"

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

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

Amplification - PCR Set-up

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



Amplification – Background and Threshold for qualitative analysis*

Instrument	Matrix	Background	HSV1 FAM	Internal Control VIC
Cobas-Z 480 PCR instruments	Plasma	2 - 6	0.55	1.2
Cobas-Z 480 PCR instruments	WB	2 - 6	0.8	1.5

**manually set the Threshold and Noiseband*

Interpretation - Qualitative results

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

**Repeat the assay starting from the extraction*

Interpretation - Quantitative results

The HSV1 Ct value obtained for each sample and the standard curve generated are used to calculate the quantity of target DNA in the reaction. The sample quantification ranges from approximately 10 to 10⁶ copies/reaction or approximately from 100 to 10⁷ copies/mL.

HOJA DE TRABAJO

[illegible]