

NOTICE of CHANGE dated 15/02/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«VZV ELITe MGB® Kit» Ref. RTS035PLD

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

- *Update for the use of the product in association with «ELITe BeGenius» instrument (REF INT040) and CSF matrix.*
- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section “Diagnostic specificity: confirmation of negative samples”)*
- *“Performance Characteristics ELITe InGenius and ELITe BeGenius” paragraph updated as per:*
 - *confirmed LoD value calculated on CSF matrix*
 - *typos.*

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

VZV ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF

RTS035PLD



IVD



-20 °C

ÍNDICE

USO PREVISTO PRINCIPIOS DEL ENSAYO DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO OTROS PRODUCTOS NECESARIOS ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	página 2 página 2 página 3 página 3 página 3 página 3 página 5
ELITE INGENIUS MUESTRAS Y CONTROLES PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius ELITe BeGenius MUESTRAS Y CONTROLES PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL ELITe InGenius y DEL ELITe BeGenius	página 6 página 6 página 8 página 15 página 15 página 17 página 23
ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ABI 7300 Real-Time System MUESTRAS Y CONTROLES PROCEDIMIENTO CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 33 página 33 página 36 página 44
Roche cobas z 480 analyzer MUESTRAS Y CONTROLES PROCEDIMIENTO CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 50 página 50 página 51 página 56
BIBLIOGRAFÍA LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO PROBLEMAS Y SOLUCIONES SÍMBOLOS AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	página 59 página 59 página 60 página 62 página 63

USO PREVISTO

El producto «**VZV ELITe MGB® Kit**» es parte de un ensayo cualitativo y cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos para la **detección y la cuantificación del virus herpes humano de la varicela-zóster (VZV)** 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 VZV junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

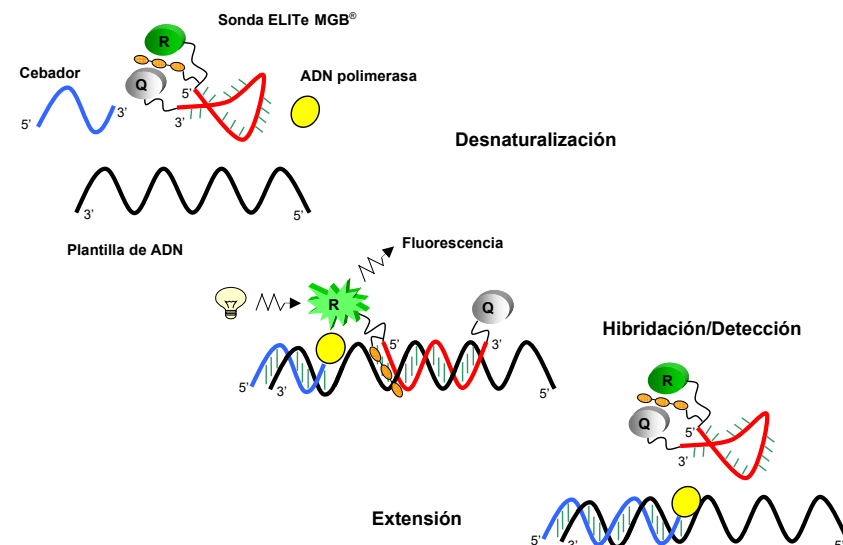
El ensayo consiste en una reacción de amplificación en tiempo real con un termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia (termociclador de amplificación en tiempo real).

En cada pocillo, se realizan dos reacciones de amplificación a partir del ADN extraído de las muestras que se están analizando: una reacción específica para una región del gen de la **proteína principal de unión al ADN de VZV** (ORF 29) y una reacción específica para una región del gen de la **globulina beta humana** (Internal Control de inhibición). La sonda específica del VZV 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 VZV. 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 del Internal Control. A medida que aumenta el producto específico de la reacción de amplificación, la emisión de fluorescencia aumenta y el instrumento la mide y la registra. El procesamiento de los datos permite detectar la presencia y el título del ADN de VZV en la muestra inicial.

Al final de la ejecución de amplificación, es posible realizar el análisis de 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 el mecanismo de activación y la emisión de fluorescencia de la sonda de tecnología ELITe MGB®. Hay que 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.



VZV ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS035PLD

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

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

Los cebadores y la sonda específica del VZV (estabilizada mediante el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo FAM e inactivada mediante una molécula no fluorescente) son específicos para una región del gen de la **proteína principal de unión al ADN de VZV** (ORF 29).

Los cebadores y la sonda para el Internal Control (estabilizada mediante el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo AP525, análogo al VIC, e inactivada mediante una molécula no fluorescente) son específicos para el **promotor y 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
Mezcla «VZV Q-PCR Mix»	Mezcla completa de reacción	4×540 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex.
- Microcentrifugadora de mesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (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 del ADN de las muestras, el control positivo de extracción, el control positivo de amplificación, los calibradores de ADN en cantidad conocida y los consumibles **no están** incluidos en este producto.

Para el análisis automático de las muestras con el instrumento «**ELITe InGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) se necesitan los siguientes productos genéricos: cartuchos de extracción «**ELITe InGenius SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200), consumibles para la extracción y la amplificación de ácidos nucleicos 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 «**Filter tips 300**» (Axygen BioScience Inc., CA, EE. UU., ref. TF-350-L-R-S).

VZV ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real

REF RTS035PLD

Para la extracción automática de ADN, la amplificación en tiempo real y la interpretación de las muestras con el instrumento «**ELITe InGenius**», se necesitan los siguientes protocolos de ensayo específicos (ELITechGroup S.p.A.).

- parámetros para los calibradores **VZV ELITe STD**;
- parámetros para el Positive Control de amplificación **VZV ELITe PC**;
- parámetros para el Negative Control de amplificación **VZV ELITe NC**;
- parámetros para el análisis de las muestras **VZV ELITe_WB_200_100**, **VZV ELITe_PL_200_100** y **VZV ELITe-CSF_200_100**.

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

Para la extracción automática de ADN, la amplificación en tiempo real y la interpretación de las muestras con el instrumento «**ELITe BeGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040), se necesitan los siguientes protocolos de ensayo específicos (ELITechGroup S.p.A.).

- parámetros para los calibradores **VZV ELITe_Be STD**;
- parámetros para el Positive Control de amplificación **VZV ELITe_Be PC**;
- parámetros para el Negative Control de amplificación **VZV ELITe_Be NC**;
- parámetros para el análisis de las muestras **VZV ELITe_Be_WB_200_100**, **VZV ELITe_Be_PL_200_100** and **VZV 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. 37055), que son kits para la extracción de ácido nucleico de muestras biológicas utilizando el instrumento «**QIASymphony SPIAS**» (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 bacteriófago MS2.

VZV ELITe MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real****REF RTS035PLD**

Si se utiliza un «7300 Real-Time PCR System» para la amplificación del ADN, 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 el instrumento «7500 Fast Dx Real-Time PCR» para la amplificación del ADN, es preciso utilizar el producto genérico **MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL** (Life Technologies., ref. 43469062), que contiene microplacas con pocillos de 0,1 mL y placas de sellado adhesivas para la amplificación en tiempo real.

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

Si es preciso detectar el ADN de VZV para el análisis cualitativo, utilizar el producto **«VZV - ELITe Positive Control»** (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR035PLD), o bien el producto **«VZV - ELITe Positive Control RF»** (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR035PLD-R), específico para el uso con el «cobas z 480 analyzer», un control positivo compuesto por ADN plasmídico.

Si la detección y la cuantificación del ADN de VZV se necesitan para un análisis cuantitativo, es preciso utilizar el producto **«VZV ELITe Standard»** (ELITechGroup S.p.A., ref. STD035PLD), que contiene cuatro diluciones de ADN plasmídico en una 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 muestras biológicas deben tratarse durante al menos 30 minutos con hipoclorito de sodio (lejía) al 3 %, o bien procesarse en autoclave durante una hora a 121 °C antes de su eliminación. Evitar que los reactivos de extracción entren en contacto con el hipoclorito de sodio (lejía).

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

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

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavar bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

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

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

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

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

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

No mezclar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

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

Es necesario disponer de batas, guantes y herramientas expresamente destinados a la sesión de trabajo.

VZV ELITe MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real****REF RTS035PLD**

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

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

Las muestras deben 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 extracción deben manipularse de manera que se reduzca al mínimo la dispersión hacia el entorno. Las pipetas utilizadas para manipular los productos de extracción deben destinarse exclusivamente a dicho propósito.

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

La mezcla **«VZV Q-PCR Mix»** debe utilizarse en el plazo de un mes a partir de la primera apertura.

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

La mezcla **«VZV 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. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

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 directrices 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 justo 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 **ELITe InGenius Software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción **«VZV ELITe_WB_200_100»**, que 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 ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse de +2 °C a +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el **ELITe InGenius** y la versión 1.3 del **ELITe InGenius Software** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción «**VZV ELITe_PL_200_100**», que 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 de ácidos nucleicos deben recogerse de acuerdo con las directrices para laboratorios, evitando su contaminación con sangre del paciente, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de cuatro horas; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Con el fin de evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda dividir las muestras en alícuotas antes de congelarlas. Si se utilizan muestras congeladas, descongelarlas inmediatamente antes de la extracción para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Nota: cuando la extracción de ARN de muestras de líquido cefalorraquídeo se realiza con el **ELITe InGenius** y la versión 1.3 del **ELITe InGenius Software** (o versiones posteriores equivalentes), es preciso utilizar el protocolo de extracción «**VZV ELITe-CSF_200_100**», que procesa 200 µL de muestra, añade el producto «**CPE Internal Control**» a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Para el análisis con este producto, verter 0,2 mL de muestra resuspendida en la **probeta de extracción** («Extraction Tube») incluida en el producto «**ELITe InGenius SP 200 Consumable Set**» o en una **probeta de 2 mL** (Sarstedt, ref. 72.694.005).

Nota: el pipeteado de muestras desde la probeta primaria hasta la **probeta de extracción** puede **desarrollar contaminación**. Así pues, utilizar pipetas apropiadas y seguir todas las recomendaciones indicadas en la sección «**Advertencias y precauciones**».

Otras muestras:

No se dispone de datos sobre las prestaciones del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: exudados de las lesiones mucocutáneas 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

La validación de los reactivos debe generarse y aprobarse para cada lote de reactivo de reactivo.

- Para la calibración, utilizar los cuatro niveles del producto «**VZV ELITe Standard**» junto con el protocolo de ensayo «**VZV ELITe STD**».
- Para el Positive Control, utilizar el producto «**VZV - ELITe Positive Control**» junto con el protocolo de ensayo «**VZV ELITe_PC**».
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en el kit), junto con el protocolo de ensayo «**VZV ELITe_NC**».

Nota: el **ELITe InGenius** permite generar y guardar la calibración de la PCR y la validación del control para cada lote de reactivos de PCR.

Los resultados de las curvas de calibración caducan **a los 60 días**, transcurridos los cuales es necesario volver a procesar los calibradores «Q-PCR Standard» con el lote de reactivos de amplificación.

Los resultados del control de la PCR caducan **a los 15 días**, transcurridos los cuales es necesario volver a procesar el Positive Control y el Negative Control junto con el lote de reactivos de amplificación. Además, los calibradores y los controles de amplificación deben volver a procesarse en los siguientes casos:

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

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO CON EL ELITe InGenius

El uso del producto **VZV 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, es necesario realizar las siguientes tareas siguiendo las indicaciones de la documentación del instrumento:

- Encender el **ELITe InGenius** e iniciar sesión en el modo «**CLOSED**».
- Verificar que los calibradores («**VZV Q-PCR Standard**») se hayan aprobado y sean válidos («**Status**») para el lote de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» que va a utilizarse. Si no se dispone de calibradores de amplificación válidos para el lote de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**», procesar los calibradores de amplificación tal como se describe a continuación.
- Verificar que los controles de amplificación («**VZV Positive Control**» y «**VZV Negative Control**») estén aprobados y sean válidos («**Status**») para el lote de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de amplificación válidos para el lote de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**», procesar los controles de amplificación tal como se describe a continuación.
- Elegir el tipo de sesión y configurarla, siguiendo las instrucciones de la interfaz proporcionadas a tal efecto 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 análisis de muestras con el producto «**VZV ELITe MGB Kit**» se describen en la tabla siguiente:

Protocolos de ensayo para el VZV ELITe MGB Kit			
Nombre	Matriz	Informe	Características
VZV 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 Volumen de la mezcla «PCR Mix»: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
VZV 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 Volumen de la mezcla «PCR Mix»: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

VZV 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 Volumen de la mezcla «PCR Mix»: 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.

Existen protocolos para el análisis cualitativo a petición.

Configuración de la sesión

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

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

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

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

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

A. Sesión integrada

Para configurar una sesión integrada con la extracción y amplificación de la muestra, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

- Descongelar las muestras a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y manipular según las directrices para laboratorios y conforme a las indicaciones de la sección «Muestras y controles».
- Descongelar los viales necesarios de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada vial es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (si se realizan 2 o más análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

- Descongelar las probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
- Seleccionar «Perform Run» desde «Home».
- Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
- Para cada carril deseado, introducir el ID de la muestra («SampleID» o SID), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «VZV 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 «**VZV Q-PCR Mix**» en el bloque de inventario («Inventory Block») en función de la lista de carga y, después, introducir el número de lote de los reactivos, la fecha de

- caducidad y el número de reacciones para cada probeta. Hacer clic en «Next» para continuar.
- Verificar las puntas de las gradillas de puntas que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
- Cargar los cartuchos «**PCR Cassette**», los cartuchos de extracción «**ELITe InGenius SP 200**», todos los consumibles necesarios y las muestras que van a extraerse 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 finalizada la sesión, el **ELITe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

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

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

Nota: 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 de las muestras eluidas, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz.

- En caso necesario, descongelar las muestras de ácido nucleico extraído a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C).
- Descongelar los viales necesarios de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada vial es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (si se realizan 2 o más análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

- 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 «Track» deseado, introducir el «SampleID» (SID) tecleando o escaneando el código de barras de la muestra.
- En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «VZV ELITe_PL_200_100»).
- En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
- Asegurarse de que la posición de carga de la muestra del eluido en la columna «Sample Position» sea «ExtraTube» (fila inferior). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
- Cargar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en el bloque de inventario («Inventory Block») en función de la lista de carga y, después, introducir el número de lote de los reactivos, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta. Hacer clic en «Next» para continuar.
- Verificar las puntas de las gradillas de puntas que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
- Cargar los cartuchos «**PCR Cassette**» y las muestras de 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 finalizada la sesión, el **ELITe InGenius** permite mostrar, aprobar y guardar los resultados, así como imprimir y guardar el informe.

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

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

Nota: 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, realizar los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar los viales necesarios de mezcla «VZV Q-PCR Mix» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada vial es suficiente para preparar 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (si se realizan 2 o más análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla «VZV Q-PCR Mix» en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar las probetas de calibrador «VZV Q-PCR Standard» (Cal1: VZV Q-PCR Standard 10², Cal2: VZV Q-PCR Standard 10³, Cal3: VZV Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: VZV 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. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
5. En la columna «Assay», asignar el carril, seleccionar el protocolo de ensayo «VZV ELITe STD» y rellenar el número de lote de reactivos y la fecha de caducidad. Hacer clic en «Next» para continuar.
6. Cargar la mezcla «VZV Q-PCR Mix» en el bloque de inventario («Inventory Block») en función de la lista de carga y, después, introducir el número de lote de los reactivos, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta. Hacer clic en «Next» para continuar.
7. Verificar las puntas de las gradillas de puntas que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
8. Cargar los viales de **calibrador** los cartuchos «PCR Cassette» siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración. Asegurarse de cargar el vial de calibrador «PCR Standard» en los carriles correctos, tal como se indica en la interfaz.
9. Cerrar la puerta del instrumento.
10. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Cuando el sistema está inactivo, la puerta puede abrirse (final del ciclo) y los consumibles pueden retirarse del instrumento.

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

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

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

Nota: 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 los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar los viales necesarios de mezcla «VZV Q-PCR Mix» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada vial es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (si se realizan 2 o más análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla «VZV Q-PCR Mix» en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar el producto «VZV - 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. Preparar el Negative Control de VZV vertiendo al menos 50 µL de agua para biología molecular en la probeta de elución («Elution Tube») que se incluye con el producto «ELITe InGenius SP 200 Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Para el Positive Control, en la columna «Assay», asignar el carril, seleccionar el protocolo de ensayo «VZV PLUS ELITe_PC» y rellenar el número de lote de reactivos y la fecha de caducidad.
6. Para el Negative Control, en la columna «Assay», asignar el carril, seleccionar el protocolo de ensayo «VZV ELITe_NC» y rellenar el número de lote de reactivos y la fecha de caducidad. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
7. Cargar la mezcla «VZV Q-PCR Mix» en el bloque de inventario («Inventory Block») seleccionado en función de la lista de carga y, después, introducir el número de lote de los reactivos, la fecha de caducidad y el número de reacciones para cada probeta. Hacer clic en «Next» para continuar.
8. Verificar las puntas de las gradillas de puntas que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
9. Cargar el cartucho «PCR cassette», el vial de **Positive Control** y el vial de **Negative Control** siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cerrar la puerta del instrumento.
11. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: la mezcla «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

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

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

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

Nota: Para obtener información detallada, consultar las instrucciones de uso del instrumento **ELITe InGenius**.

El instrumento **ELITe InGenius** genera los resultados con el producto «**VZV 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 las muestras
- Elaboración de los informes de resultados de las muestras.

A. Validación de la curva de calibración

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

La curva de calibración, específica para el lote de reactivos de PCR, se registra 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 curva de calibración caducan **a los 60 días**.

Antes de analizar cualquier muestra, es indispensable verificar que la curva de calibración esté aprobada y sea válida para el lote de reactivos de PCR. El estado de los resultados del Positive Control y del Negative Control, específicos para cada lote de reactivos de PCR, se muestra en el módulo «Controls». Si no se dispone de los resultados del Positive Control o del Negative Control o estos están caducados, procesar los controles tal como se ha descrito antes.

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

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

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

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

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

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

Antes de analizar cualquier muestra, es indispensable verificar que los resultados del Positive Control y del Negative Control estén aprobados y sean válidos para el lote de reactivos de PCR. El estado de los resultados del Positive Control y del Negative Control, específicos para cada lote de reactivos de PCR, se muestra en el módulo «Controls». Si no se dispone de los resultados del Positive Control o del Negative Control o estos están caducados, procesar los controles tal como se ha descrito antes.

El **ELITe InGenius Software** procesa los resultados del Positive Control y del Negative Control y genera los gráficos de control («Control Charts»). Para configurar el gráfico de control inicial, se utilizan cuatro resultados aprobados del Positive Control y del Negative Control. Para los controles siguientes, el software analiza los resultados para garantizar que el rendimiento del sistema se encuentre dentro de los

criterios de aceptación que se muestran en los gráficos de control («Control Charts»). Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

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

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

C. Validación de los resultados de las muestras

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

Los resultados se muestran en el módulo «Result Display».

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

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

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

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
VVZ: DNA Detected, quantity equal to XXX copies/mL	Se ha detectado ADN de VVZ dentro del rango de medición del ensayo; la cantidad es la mostrada.
VVZ: DNA Detected, quantity below LLoQ copies/mL	Se ha detectado ADN de VVZ por debajo del límite inferior de cuantificación del ensayo.
VVZ: DNA Detected, quantity beyond ULoQ copies/mL	Se ha detectado ADN de VVZ más allá del límite superior de cuantificación del ensayo.
VVZ: DNA Not Detected or below LoD copies/mL	No se ha detectado ADN de VVZ en la muestra. La muestra es negativa para ADN de VVZ o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
Invalid - Retest Sample	Resultado no válido del ensayo causado por un fallo en el Internal Control (p. ej., debido a una extracción incorrecta o al arrastre de inhibidores). Es necesario repetir el análisis.

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

Las muestras que se notifican como «VZV: DNA Detected, quantity beyond ULoQ» no son aptas para la cuantificación. La concentración de ADN de VVZ detectada en la muestra es superior al nivel en el que puede cuantificarse de forma exacta. Es posible diluir la muestra antes de la extracción o la PCR y volver a analizarla para ofrecer resultados dentro del rango lineal del ensayo.

Las muestras que se notifican como «VZV DNA Not Detected or below LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar ADN de VVZ. En este caso, puede que la muestra sea negativa

para ADN de VZV, o que el ADN de VZV presente una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar la sección «Características de rendimiento»).

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

Las muestras que se notifican como «Invalid - Retest Sample» no son aptas para la interpretación de resultados. En este caso, el ADN del Internal Control no ha podido detectarse correctamente, por ejemplo, debido a problemas en el paso de PCR o de extracción (degradación o pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

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

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

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

D. Generación del informe de los resultados de las muestras

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

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

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

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

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 directrices 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 justo 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 **ELITe BeGenius** y la versión **2.0.0** del **software ELITe BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «VZV ELITe_Be_WB_200_100», que 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 ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse de +2 °C a +8 °C y conservarse de +2 °C a +8 °C durante un máximo de tres días; en caso contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el instrumento **ELITe BeGenius** y la versión **2.0.0** del **software ELITe BeGenius** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «VZV ELITe_Be_PL_200_100», que 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

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

Nota: cuando la extracción de ARN de muestras de líquido cefalorraquídeo se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión **2.0.0** del **ELITe BeGenius Software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «VZV ELITe_Be_CSF_200_100», que procesa 200 µL de muestra, añade el producto «**CPE Internal Control**» a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Otras muestras:

En la actualidad, no se dispone de datos sobre el rendimiento de este producto con otras muestras clínicas, como hisopados de lesiones mucocutáneas o 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

La validación de los reactivos debe generarse y aprobarse para cada lote de reactivo de reactivo.

- Para el conjunto de calibradores, utilizar los cuatro niveles de concentración del producto «**VZV ELITe Standard**» con el protocolo de ensayo «**VZV ELITe_Be_STD**» para el **ELITe BeGenius**.
- Para el Positive Control, utilizar el producto «**VZV - ELITe Positive Control**», junto con el protocolo de ensayo «**VZV ELITe_Be_PC**» para el **ELITe BeGenius**.
- Para el Negative Control, utilizar agua para biología molecular (no incluida en el kit), junto con el protocolo de ensayo «**VZV ELITe_Be_NC**» para el **ELITe BeGenius**.

Nota: el **ELITe BeGenius** permite generar y guardar la calibración de la PCR y la validación del control para cada lote de reactivos de PCR.

Los resultados de las curvas de calibración caducan **a los 60 días**, transcurridos los cuales es necesario volver a procesar los calibradores «Q-PCR Standard» con el lote de reactivos de amplificación.

Los resultados del control de amplificación caducan **a los 15 días**, transcurridos los cuales es necesario volver a procesar los calibradores «Q-PCR Standard» con el lote de reactivos de amplificación.

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

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

REF RTS035PLD

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

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO CON EL ELITe BeGenius

El uso del producto «VZV ELITe MGB Kit» con el ELITe BeGenius 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 BeGenius e iniciar sesión en el modo «CLOSED».
 - Verificar que los calibradores de amplificación («VZV Q-PCR Standard») estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de mezcla «VZV Q-PCR Mix» que va a utilizarse. Si no se dispone de calibradores válidos para el lote de mezcla «VZV Q-PCR Mix», realizar la calibración tal como se describe a continuación.
 - Verificar que los controles de amplificación («VZV Positive Control» y «VZV Negative Control») estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de mezcla «VZV Q-PCR Mix» que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de amplificación válidos para el lote de mezcla «VZV Q-PCR Mix», procesar los controles tal como se describe a continuación.
- Seleccionar el tipo de sesión, seguir las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizar los protocolos de ensayo proporcionados por ELITechGroup S. p. A. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con kits ELITe MGB, el instrumento ELITe BeGenius y las matrices indicadas.

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

Protocolos de ensayo para el producto «VZV ELITe MGB Kit» y el ELITe BeGenius			
Nombre	Matriz	Informe	Características
VZV 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 «PCR Mix»: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
VZV 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 «PCR Mix»: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL
VZV 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 «PCR Mix»: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

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

REF RTS035PLD

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

Existen protocolos para el análisis cualitativo a petición.

Configuración de la sesión

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

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

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

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

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

A. Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»)

Para configurar la sesión integrada con la extracción y amplificación de la muestra, realizar los siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

1. Identificar las muestras necesarias y manipular según las directrices para laboratorios y conforme a las indicaciones de la sección «Muestras y controles».
2. Descongelar las probetas necesarias de mezcla «VZV Q-PCR Mix» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, si se realizan al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Descongelar las probetas necesarias de CPE 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.
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Extraer las gradillas de la unidad de refrigeración y colocarlas en la mesa de preparación.
6. Seleccionar el modo de procesamiento «Extract + PCR».
7. Cargar las muestras en la gradilla de muestras («Sample Rack»).

Nota: cuando se cargan probetas secundarias «2 mL Tube», utilizar los adaptadores azules para la gradilla de muestras «Sample Rack».

8. Insertar la gradilla de muestras «Sample Rack» en la unidad de refrigeración («Cooler Unit») comenzando por el carril 5 (L5) y siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
9. En caso necesario, insertar el ID de la muestra para cada posición utilizada.

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

10. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extraction Elution Volume», a 100 µL.
11. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se va a utilizar (p. ej., «VZV ELITe_Be_WB_200_100»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar las probetas de elución «Elution Tube» en la gradilla de elución «Elution Rack».

Nota: las probetas de elución pueden etiquetarse con un código de barras para mejorar la rastreadibilidad.

13. Insertar la gradilla de elución «Elution Rack» en la unidad de refrigeración («Cooler Unit»), comenzando por el carril 3 (L3) y siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
14. Cargar el CPE y la mezcla «VZV Q-PCR Mix» en la gradilla de reactivos/elución «Reagent/Elution».

Rack».

15. Insertar la gradilla de reactivos/elución «**Reagent/Elution Rack**» en la unidad de refrigeración («Cooler Unit»), en el carril 2 (L2), siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
16. En caso necesario, para cada reactivo de la mezcla «PCR Mix», introducir el número de serie («S/N»), el número de lote («Lot No.»), la fecha de caducidad («Exp. Date») y el número de reacciones («T/R»).
17. Verificar las puntas de las gradillas de puntas «**Tip Racks**» que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
18. Cargar la cesta «**PCR Basket**» con el cartucho «**PCR Cassette**» en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
19. Cargar la cesta de extracción «**Extraction Basket**» 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.
20. Cerrar la puerta del instrumento.
21. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que queda en la probeta de elución («Elution Tube») debe extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C.

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

Nota: la mezcla «**PCR Mix**» puede utilizarse para 5 sesiones independientes de trabajo de 3 horas cada una, o bien conservarse en la unidad de refrigeración durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Antes de iniciar una nueva sesión, mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

B. Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).

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

1. En caso necesario, descongelar las muestras eluidas a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Descongelar las probetas necesarias de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, si se realizan al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
4. Extraer las **gradillas** de los carriles 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la unidad de refrigeración y colocarlas en la tabla de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only».
6. Cargar las muestras en la gradilla de elución «**Elution Rack**».
7. Insertar la gradilla de elución «**Elution Rack**» en la unidad de refrigeración («Cooler Unit»), comenzando por el carril 3 (L3) y siguiendo las instrucciones de la interfaz.
8. En caso necesario, para cada posición, introducir el ID de la muestra («SID»), la matriz de la muestra («Sample matrix»), el kit de extracción («Extraction kit») y el volumen de eluido («Extracted Eluate Volume»).
9. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extraction Elution Volume», a 100 µL, incluso si no se está realizando una extracción.
10. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse (p. ej., «**VZV ELITe Be_WB_200_100**»). Hacer clic en «Next» para continuar.
11. Cargar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en la gradilla de reactivos/elución «**Reagent/Elution Rack**».

12. Insertar la gradilla de reactivos/elución «**Reagent/Elution Rack**» en la unidad de refrigeración («Cooler Unit»), en el carril 2 (L2), siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
13. En caso necesario, para cada reactivo de la mezcla «PCR Mix», introducir el número de serie («S/N»), el número de lote («Lot No.»), la fecha de caducidad («Exp. Date») y el número de reacciones («T/R»).
14. Verificar las puntas de las gradillas de puntas «**Tip Racks**» que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
15. Cargar la cesta «**PCR Basket**» con el cartucho «**PCR Cassette**» en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
16. Cerrar la puerta del instrumento.
17. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, la muestra extraída que ha quedado en la probeta de elución («Elution Tube») debe sacarse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a -20 °C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

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

Nota: la mezcla «**PCR Mix**» puede utilizarse para 5 sesiones independientes de trabajo de 3 horas cada una, o bien conservarse en la unidad de refrigeración durante un máximo de 3 sesiones de trabajo consecutivas de 3 horas cada una. Antes de iniciar una nueva sesión, mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

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

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 las probetas de calibrador «**VZV Q-PCR Standard**» (Cal1: VZV Q-PCR Standard 10², Cal2: VZV Q-PCR Standard 10³, Cal3: VZV Q-PCR Standard 10⁴, Cal4: VZV 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.
2. Descongelar las probetas necesarias de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, si se realizan al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

1. Extraer las **gradillas** de los carriles 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la unidad de refrigeración y colocarlas en la tabla de preparación.
2. Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only».
3. Cargar los calibradores en la gradilla de elución «**Elution Rack**».
4. Insertar la gradilla de elución «**Elution Rack**» en la unidad de refrigeración, comenzando por el carril 3 (L3) y siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
5. En caso necesario, para cada posición («Position»), introducir el nombre del reactivo («Reagent name»), el número de serie («S/N»), el número de lote («Lot No.»), la fecha de caducidad («Exp. Date») y el número de reacciones («T/R»).
6. 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.
7. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que va a utilizarse («**VZV ELITe Be_STD**»). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en la gradilla de reactivos/elución «**Reagent/Elution Rack**».
9. Insertar la gradilla de reactivos/elución «**Reagent/Elution Rack**» en la unidad de refrigeración («Cooler Unit»), en el carril 2 (L2), siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.

10. Verificar las puntas de las gradillas de puntas «**Tip Racks**» que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
11. Cargar la cesta «**PCR Basket**» con el cartucho «**PCR Cassette**» en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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 «**Q-PCR Mix**» puede utilizarse para 5 sesiones independientes de trabajo 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. Antes de iniciar una nueva sesión, mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

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

Para configurar la sesión de amplificación para el Positive Control y el Negative Control, llevar a cabo los pasos siguientes conforme a las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar la probeta de «**VZV - ELITe Positive Control**» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 4 reacciones. Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
2. Verter al menos 50 µL de agua para biología molecular (como Negative Control) para las sesiones en una probeta de elución («Elution Tube»), incluida en el conjunto de consumibles «**ELITe InGenius SP Consumable Set**».
3. Descongelar las probetas necesarias de mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» a temperatura ambiente (aproximadamente +25 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, si se realizan al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
5. Extraer las **gradillas** de los carriles 1, 2 y 3 (L1, L2, L3) de la unidad de refrigeración y colocarlas en la tabla de preparación.
6. Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only».
7. Cargar las probetas de Positive Control y de Negative Control en la gradilla de elución «**Elution Rack**».
8. Insertar la gradilla de elución «**Elution Rack**» en la unidad de refrigeración, comenzando por el carril 3 (L3) y siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
9. En caso necesario, para cada posición («Position»), introducir el nombre del reactivo («Reagent name»), el número de serie («S/N»), el número de lote («Lot No.»), la fecha de caducidad («Exp. Date») y el número de reacciones («T/R»).
10. 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.
11. En la columna «Assay», seleccionar los protocolos de ensayo que van a utilizarse («**VZV ELITe_Be_PC**» y «**VZV ELITe_Be_NC**»). Hacer clic en «Next» para continuar.
12. Cargar la mezcla «**VZV Q-PCR Mix**» en la gradilla de reactivos/elución «**Reagent/Elution Rack**».

13. Insertar la gradilla de reactivos/elución «**Reagent/Elution Rack**» en la unidad de refrigeración («Cooler Unit»), en el carril 2 (L2), siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
14. Verificar las puntas de las gradillas de puntas «**Tip Racks**» que se encuentran en el área del inventario («Inventory Area») y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
15. Cargar la cesta «**PCR Basket**» con el cartucho «**PCR Cassette**» en el área del inventario («Inventory Area») siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
16. Cerrar la puerta del instrumento.
17. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: La mezcla «**Q-PCR Mix**» puede utilizarse para 5 sesiones independientes de trabajo 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. Antes de iniciar una nueva sesión, mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Revisión y aprobación de los resultados

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

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

El sistema **ELITe BeGenius** genera los resultados con el producto «**VZV ELITe MGB Kit**» mediante los siguientes procedimientos:

- A. Validación de la curva de calibración
- B. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control
- C. Validación de los resultados de las muestras
- D. Elaboración de los informes de resultados de las muestras.

Nota: consultar los mismos capítulos del **ELITe InGenius** para obtener más información.

**CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO
ELITe InGenius y ELITe BeGenius**

Sensibilidad analítica: Límite de detección (LoD)

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

El límite de detección de este ensayo se analizó utilizando ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación en una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. El ADN plasmídico se diluyó a un título de aproximadamente 10 copias/20 µL en presencia de ADN plasmídico con contenido de control interno a un título de 150.000 copias/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.

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

El límite de detección (LoD) del producto «VZV ELITe MGB Kit» se verificó con muestras de **plasma** recogido en EDTA, muestras de **sangre** recogida en EDTA y muestras de **LCR** y 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 117 copias/mL en los sistemas **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia certificado de VVZ «Varicella Zoster Virus DNA» de Acrometrix (ref. 954530).

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo.

Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de sangre y el ELITe InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA	100 copias/mL	20	20	20	0

Límite de detección para muestras de sangre y el ELITe BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA	100 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VVZ se confirmó a 100 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 69 copias/mL en los sistemas **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia certificado de VVZ «Varicella Zoster Virus DNA» de Acrometrix (ref. 954530).

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

Límite de detección para muestras de plasma y el ELITe InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Plasma recogido en EDTA	69 copias/mL	20	20	20	0

Límite de detección para muestras de plasma y el ELITe BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
Plasma recogido en EDTA	69 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VVZ se confirmó a 69 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 69 copias/mL en los sistemas **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Las muestras se enriquecieron utilizando el material de referencia certificado de VVZ «Varicella Zoster Virus DNA» de Zeptomatrix (ref. 954530).

El LoD se confirma si al menos 18 de 20 duplicados ofrecen un resultado positivo.

Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Límite de detección para muestras de LCR y el ELITe InGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
LCR	69 copias/mL	20	20	19	1

Límite de detección para muestras de LCR y el ELITe BeGenius					
Muestra	Límite de detección	N	Válido	Positivas	Negativas
LCR	69 copias/mL	20	20	20	0

El valor del LoD para la diana de VVZ se confirmó a 69 copias/mL cuando se utilizó líquido cefalorraquídeo.

Rango de medición lineal y límites de cuantificación

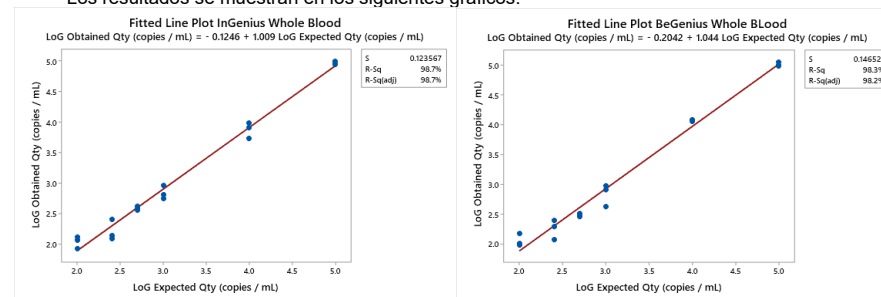
El rango de medición lineal del producto «VZV ELITe MGB Kit» utilizado con muestras de **sangre** recogida en EDTA, muestras de **plasma** recogido en EDTA y muestras de **LCR** y utilizando los sistemas **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** se verificó con un panel de diluciones de VVZ. El panel se preparó con el material de referencia certificado de VVZ «Varicella Zoster Virus DNA» de Acrometrix y Zeptomatrix en matrices negativas para ADN de VVZ.

En las muestras de sangre:

El panel constaba de seis puntos de dilución de 1×10^5 copias/mL a aproximadamente 1×10^2 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados utilizando un panel preparado con el material de referencia «Varicella Zoster Virus DNA» de Acrometrix (ref. 954530).

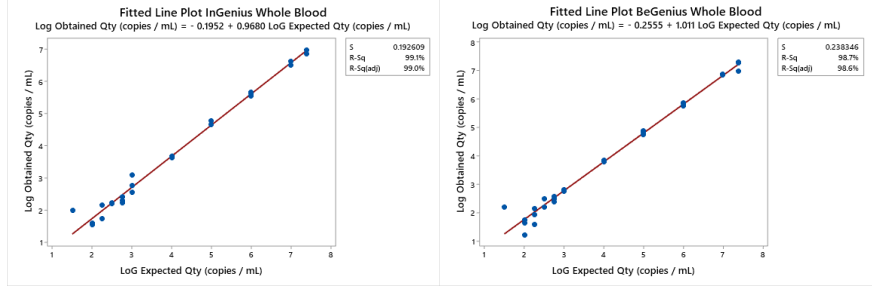
El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de sangre, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R^2) de 0,987 para el instrumento **ELITe InGenius** y de 0,983 para el instrumento **ELITe BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



El rango de medición lineal del producto «VZV ELITe MGB Kit» utilizado con muestras de sangre y en los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** se analizó con un rango más amplio de concentraciones utilizando un panel que se preparó diluyendo un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación del VVZ en una matriz negativa para ADN de VVZ. El panel constaba de diez puntos de dilución (pasos de dilución de 1 log) de 2.5×10^7 a 100 copias/mL de sangre. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de sangre, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,991 para el instrumento **ELITe InGenius** y de 0,987 para el instrumento **ELITe BeGenius**.



El límite inferior de cuantificación (LLoQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2215 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,3219 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,1038 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,2149 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 100 copias/mL.

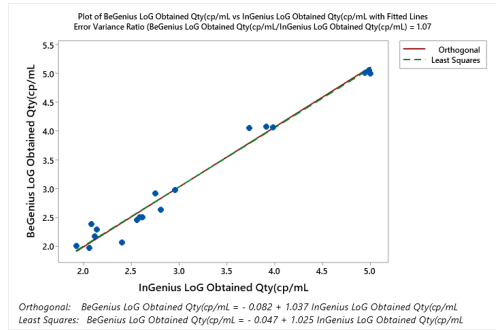
El límite superior de cuantificación (ULoQ) se estableció en la concentración más alta analizada que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,0626 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,1790 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,4509 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,2062 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	100	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 figura siguiente.



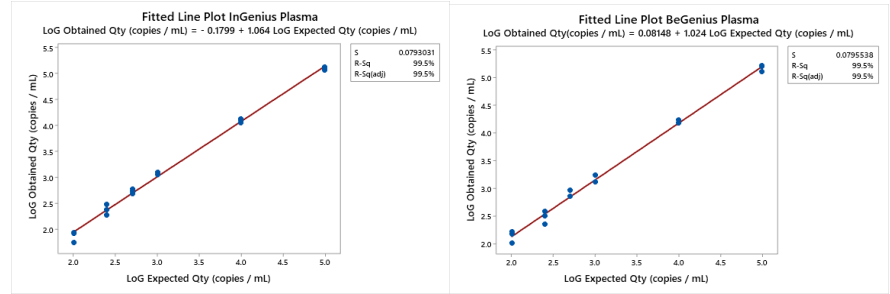
En esta prueba, se realizó un análisis de regresión ortogonal y se generó una intersección de 0,082 (IC del 95 %: - 0,3286; 0,1652) y una pendiente de 1,037 (IC del 95 %: 0,9608; 1,1126). El análisis de regresión lineal generó un R² de 0,978.

En las muestras de plasma:

El panel constaba de seis puntos de dilución de 1×10⁵ copias/mL a aproximadamente 1×10² copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados utilizando un panel preparado con el material de referencia «Varicella Zoster Virus DNA» de Acrometrix (ref. 954530).

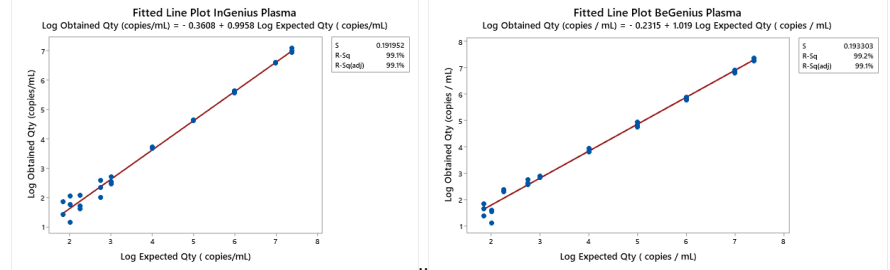
El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de plasma, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,995 para el instrumento **ELITe InGenius** y de 0,995 para el instrumento **ELITe BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



El rango de medición lineal del producto «**VZV ELITe MGB Kit**» utilizado con muestras de plasma y en los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** se analizó con un rango más amplio de concentraciones utilizando un panel que se preparó diluyendo un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación del VZV en una matriz negativa para ADN de VZV. El panel constaba de diez puntos de dilución (pasos de dilución de 1 log) de 2,5×10⁷ a 69 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 3 duplicados.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de plasma, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R²) de 0,991 para el instrumento **ELITe InGenius** y de 0,992 para el instrumento **ELITe BeGenius**.



El límite inferior de cuantificación (LLoQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2005 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,2048 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,1384 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,2513 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 69 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 0,0831 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,0444 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,3828 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,0775 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copias/mL.

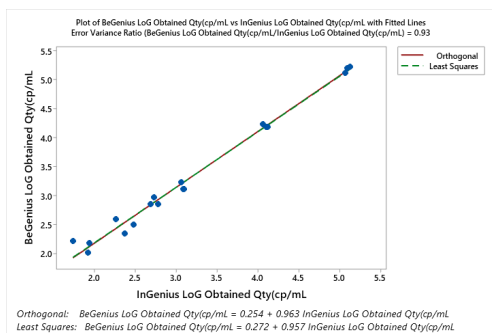
Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

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	69	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 figura siguiente.



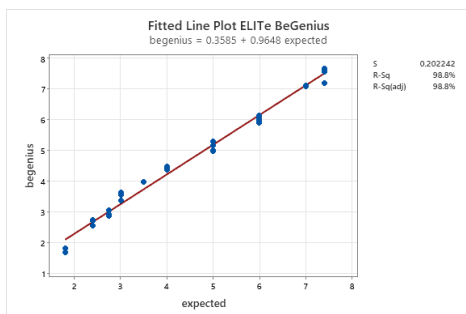
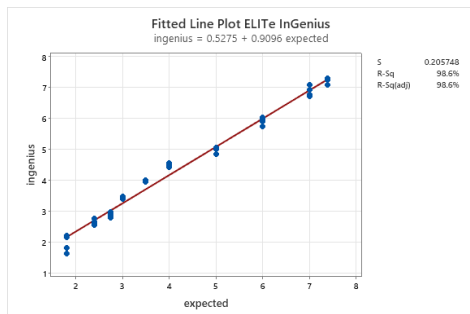
En esta prueba, se realizó un análisis de regresión ortogonal y se generó una intersección de 0,254 (IC del 95 %: 0,082; 0,425) y una pendiente de 0,963 (IC del 95%: 0,912; 1,013). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,989.

En las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR):

El panel constaba de diez puntos de dilución de $2,5 \times 10^7$ a 69 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 4 duplicados utilizando un panel preparado con el material de referencia «Varicella Zoster Virus (VZV)» de Zeptomatrix, que contenía 1 mL de la cepa Ellen en líquido de cultivo (ref. 0810171CF).

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo, en combinación con muestras de LCR, presentaba una respuesta lineal para todas las diluciones con un coeficiente de correlación cuadrática (R2) de 0,986 para el **ELITe InGenius** y de 0,988 para el **ELITe BeGenius**.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos.



El límite inferior de cuantificación (LLoQ) se estableció en la concentración del LoD que mostraba los resultados cuantitativos de forma precisa (desviación estándar de 0,2816 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,0787 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,1127 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,0902 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 69 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 0,1005 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,2102 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**) y exacta (sesgo de 0,1803 log copias/mL para el **ELITe InGenius** y de 0,0936 log copias/mL para el **ELITe BeGenius**): 25.000.000 copias/mL.

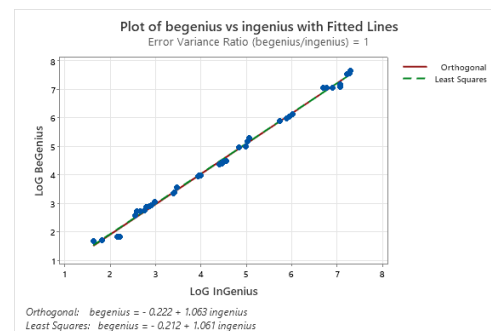
Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente.

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	69	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 figura siguiente.



En esta prueba, se realizó un análisis de regresión ortogonal y se generó una intersección de -0,222 (IC del 95 %: -0,3241, -0,1196) y una pendiente de 1,063 (1,0418, 1,0847). El análisis de regresión lineal generó un R2 de 0,996.

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto «**VZV ELITe MGB Kit**» en combinación con los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** se evaluó analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA. El panel contenía una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con el material de referencia certificado de VZV «Varicella Zoster Virus DNA» de Acrometrix (ref. 954530) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 300 copias/mL) y 10 veces el LoD (aproximadamente 1000 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	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	23,76	0,38	1,58
3×LoD	8/8	36,53	0,21	0,57				
10×LoD	8/8	34,78	0,21	0,61				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITe InGenius								
Muestra	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	48/48	23,85	0,48	2,01
3×LoD	16/16	36,67	0,43	1,17				
10×LoD	16/16	34,77	0,32	0,91				

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

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

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

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

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

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe BeGenius								
Muestra	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	27,33	0,60	2,21
3×LoD	8/8	37,49	0,74	1,97				
10×LoD	8/8	35,38	0,35	0,98				

Repetibilidad entre sesiones con el ELITe BeGenius								
Muestra	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/16	N/A	N/A	N/A	48/48	26,67	0,60	2,25
3×LoD	16/16	37,32	0,69	1,84				
10×LoD	16/16	35,39	0,31	0,87				

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

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto «VZV ELITe MGB Kit» en los sistemas ELITe InGenius y ELITe BeGenius se evaluó analizando un panel de muestras de sangre recogida en EDTA. El panel contenía una muestra negativa y dos muestras enriquecidas con el material de referencia certificado de VVZ «Varicella Zoster Virus DNA» de Acrometrix (ref. 954530) a una concentración de 3 veces el LoD (aproximadamente 300 copias/mL) y 10 veces el LoD (aproximadamente 1000 copias/mL).

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

La reproducibilidad entre lotes con el ELITe InGenius se obtuvo analizando las muestras del panel en ocho duplicados, en dos sesiones al día, utilizando dos lotes diferentes y el mismo instrumento con el mismo operador. 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	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	22,76	0,61	2,69
3×LoD	8/8	36,47	0,32	0,86				
10×LoD	8/8	34,87	0,34	0,99				

Repetibilidad entre lotes con el ELITe InGenius								
Muestra	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	23,07	0,58	2,54
3×LoD	8/8	36,78	0,27	0,75				
10×LoD	8/8	35,06	0,31	0,88				

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

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

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

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

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

Repetibilidad entre instrumentos con el ELITe BeGenius								
Muestra	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	26,22	0,67	2,55
3×LoD	8/8	37,05	0,47	1,26				
10×LoD	8/8	35,18	0,43	1,21				

Repetibilidad entre lotes con el ELITe BeGenius								
Muestra	VVZ				Internal Control			
	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV	Pos./Dup.	Ct medio	DE	%CV
Negativas	0/8	N/A	N/A	N/A	24/24	26,43	0,99	3,73
3×LoD	8/8	37,11	0,45	1,21				
10×LoD	8/8	35,05	0,36	1,03				

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

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, expresada como la reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «VZV Molecular “Q” Panel» (Qnostics Ltd.). 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
VZVMQP01-High	10 ⁵	5,000	2/2	5,138
VZVMQP01-Medium	10 ⁴	4,000	2/2	4,312
VZVMQP01-Low	10 ³	3,000	2/2	3,340
VZVMQP01-Negative	Negativas	-	0/2	-

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

Se realizaron más pruebas utilizando como material de referencia el producto «QCMD 2014 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido), un panel de diluciones del VVZ dentro de la concentración límite. 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	Concentración esperada log ₁₀ copias/mL	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ copias/mL
VZVDNA14-01	3,267	0,438	2/2	3,674
VZVDNA14-02	3,339	0,520	2/2	3,713
VZVDNA14-03	2,465	0,491	2/2	2,768
VZVDNA14-04	Negativa	N/A	0/2	No detectado
VZVDNA14-05	2,716	0,377	2/2	3,317
VZVDNA14-06	1,980	0,411	1/2	1,994
VZVDNA14-07	Negativa	N/A	0/2	No detectado
VZVDNA14-08	3,475	0,678	2/2	3,870
VZVDNA14-09	3,918	0,653	2/2	4,306
VZVDNA14-10	2,071	0,428	2/2	1,949

Todas las muestras negativas se detectaron correctamente como negativas y todas las muestras positivas se detectaron correctamente como positivas de acuerdo con los resultados cuantitativos definidos mediante consenso de un control de calidad externo (EQA). La muestra DNA14-06 de VVZ solo ofreció 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 positivas se cuantificaron dentro del rango definido mediante el consenso del estudio ± 1 desviación estándar (DE) y una muestra se cuantificó dentro del rango definido mediante el consenso del estudio ± 2 DE.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

Sangre y plasma

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA y muestras de plasma recogido en EDTA positivas para ADN de VVZ, utilizando para ello el instrumento **ELITe InGenius**. Como el **ELITe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Por lo tanto, la

sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITe InGenius** también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 28 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra VZV07-04 del producto «QCMD 2007 Varicella-Zoster Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, UK) a un título de 750 copias/mL y 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo «VZV ELITe-IQC High Run Control» (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 VVZ	28	27	1
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VVZ	30	30	0

Todas las muestras de plasma fueron válidas y positivas.

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

Todas las muestras de sangre fueron válidas y 27 de 28 muestras se confirmaron como positivas. Una muestra de sangre dio un resultado negativo, pero esta muestra diferente ya no estaba disponible en el momento de realizar el análisis de las diferencias.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a muestras de sangre fue del 96,4 %.

Líquido cefalorraquídeo

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo positivas para ADN de VVZ utilizando el instrumento **ELITe InGenius**. Como el **ELITe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITe InGenius** también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 20 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo «VZV ELITe-IQC High Run Control» (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
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VVZ	20	20	0

Todas las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron válidas y positivas.

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

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

Sangre y plasma

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA y muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ, utilizando para ello el instrumento **ELITe InGenius**. Como el **ELITe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Por lo tanto, la sensibilidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITe InGenius** también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 34 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VVZ y 30 muestras de plasma recogido en EDTA de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VVZ.

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 EDTA y negativa para ADN de VVZ	34	0	34
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VVZ	30	0	30

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

Líquido cefalorraquídeo

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VVZ utilizando el instrumento **ELITe InGenius**. Como el **ELITe BeGenius** presenta un rendimiento analítico equivalente al del **ELITe InGenius**, el rendimiento diagnóstico del ensayo observado en los dos instrumentos también se considera equivalente. Así pues, la especificidad diagnóstica del ensayo obtenida con el **ELITe InGenius** también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo de donantes sanos supuestamente negativas para ADN de VVZ.

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
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VVZ	22	0	22

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

El valor de corte para el Ct de Internal Control se ha establecido a 35 para cada matriz validada.

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de líquido cefalorraquídeo se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**UUNI_E100S200_EL**», que utiliza 200 µL de muestra y eluye el extracto en 100 µL (la elución tiene lugar realmente en 115 µL, de los que se recuperan 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 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteinasa transportadora tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción.

volumen mínimo de 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteinasa transportadora tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN 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 las instrucciones de uso del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de líquido cefalorraquídeo se realiza con el instrumento «**NucliSENS® easyMAG®**», es necesario utilizar el protocolo de extracción «**Generic 2.0.1**» y seguir estas instrucciones: verter **500 µL** de muestra en la tira de 8 pocillos, cargar la tira en el instrumento y llevar a cabo la extracción. Después de 10 minutos de incubación, añadir **5 µL** de **CPE** como control interno antes de añadir el «**NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**» al contenido de la tira mediante la pipeta multicanal utilizando el programa número 3 y continuar con la extracción. Eluir el ADN en **100 µL** de solución tampón de elución.

Sangre recogida en EDTA

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre (muestra celular) se realiza utilizando el kit «**EXTRAblood**», seguir las indicaciones de las instrucciones de uso: comenzar por **200 µL** de muestra (no más de 2 millones de células) y recuperar el ADN con **100 µL** de tampón de elución.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de sangre se realiza con el «**ELITe STAR**» y la **versión 3.4.13 del software** (o versiones posteriores equivalentes), es necesario utilizar el protocolo de extracción «**UUNI_E100S200_EL**», 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 700 µL. Añadir **200 µL** de **CPE** en la probeta de proteinasa transportadora tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Nota: cuando la extracción de ADN 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 las instrucciones de uso del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

Plasma recogido en EDTA

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

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

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

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de 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

VZV ELITe MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real****REF RTS035PLD**

«UUNI_E100S200_ELI», 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 700 µL. Añadir **200 µL de CPE** en la probeta de proteínas transportadora tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, consultar las instrucciones de uso del kit de extracción.

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

NOTA: cuando la extracción de ADN a partir 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 instrucciones: verter **500 µL** de muestra en la tira de 8 pocillos y, después, añadir **5 µL de CPE** para el control interno antes de añadir el producto «**NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica**». Eluir el ADN en **100 µL** de solución tampón de elución.

Nota: cuando la extracción de ADN de muestras de plasma se realiza con el instrumento «**QIAasymphony® SP/AS**» y el «**QIAasymphony® 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 las prestaciones del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: exudados de las lesiones mucocutáneas 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 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 Negative Control, 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 «**VZV - ELITe Positive Control**» o el producto «**VZV 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, por ejemplo, una muestra que tenga un resultado negativo y una que tenga uno positivo o un material de referencia calibrado.

VZV ELITe MGB® Kit**Reactivo para la amplificación de ADN
en tiempo real****REF RTS035PLD****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 el detector («Detector Manager») para la sonda de VZV con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor = «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «VZV».
- Configurar («Detector Manager») el «detector» para la sonda de Internal Control con el marcador («reporter») = «VIC» (AP525 es análogo a VIC) y el inhibidor («quencher») = «none» (no fluorescente) y denominarlo «IC».
- Para cada pocillo empleado 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	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵							

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

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**».
- Configurar el número de ciclos en **45**.
- Configurar el volumen para la emulación del software de la transferencia térmica a la reacción («Sample volume») en **30 µL**.
- Opcional: añadir la fase de disociación («Add Dissociation Stage») y configurar una temperatura de **40 °C a 80 °C**.

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

REF RTS035PLD

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

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

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

- Encender el termociclador en tiempo real, encender el ordenador, ejecutar el software dedicado y abrir una sesión de cuantificación absoluta («Absolute quantification») y configurar «Run mode: Fast 7500».
- Configurar el detector («Detector Manager») para la sonda de VVZ con el marcador («reporter») = «FAM» y el inhibidor = «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «VVZ».
- 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**.

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

REF RTS035PLD

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

Configuración de la amplificación

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

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

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

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

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

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

- Si se necesita un resultado **cualitativo** del análisis (detección de ADN de VVZ), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** del producto «VZV - 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 «VZV - Positive Control» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

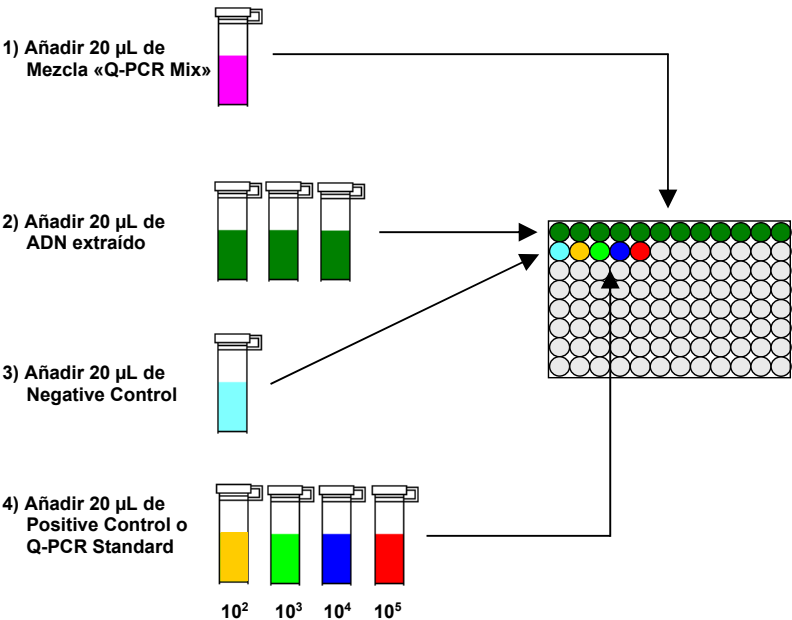
- Si se necesita un resultado **cuantitativo** del análisis (cuantificación de ADN de VVZ), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL** de «VZV Q-PCR Standard 10²» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el calibrador pipeteando el calibrador «VZV Q-PCR Standard 10²» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma manera con los

calibradores «VZV Q-PCR Standard» 10^3 , 10^4 y 10^5 .

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-VZV-EGSpA»).

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

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



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

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

Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica del VZV (detector FAM «VZV») 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 caso de muestra positiva con un alto título de ADN de VZV, la fluorescencia FAM de la sonda específica del VZV puede empezar a aumentar antes del ciclo 15. En este caso, el rango de cálculo para el **punto de referencia** debe adaptarse del ciclo 6 al ciclo en el que la fluorescencia FAM de la muestra empieza a aumentar, según ha detectado el software del instrumento («Results > Component»).

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

- Configurar manualmente el **umbral** para el detector FAM «VZV» a **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 «VZV» a **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 VZV («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 «VZV»	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 VZV, 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 VZV, se configuran las reacciones del producto «Q-PCR Standard» en lugar de la reacción del **Positive Control**. En este caso, es necesario validar la amplificación y la detección conforme a la reacción de amplificación del calibrador «Q-PCR Standard 10^5 » (**Ct ≤25**).

En la reacción de amplificación del **Negative Control**, el valor de **Ct** del VZV («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 «VZV»	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 VZV, 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 VZV 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 proteína principal de unión al ADN de VZV (ORF29) en la reacción de amplificación, que corresponde a los equivalentes genómicos por reacción (límite de detección para el producto, 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 VVZ
detector FAM «VZV»	detector VIC «IC»			
Ct Undetermined	Ct >35 o Ct Undetermined	No idónea	No válido	-
	Ct ≤35	Idónea	Válido, negativo	NO DETECTADO
Ct Determined	Ct >35 o Ct Undetermined	Idónea	Válido, positivo	DETECTADO
	Ct ≤35	Idónea	Válido, positivo	DETECTADO

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

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VVZ y **Ct ≤35** para el Internal Control, significa que el ADN de VVZ no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VVZ 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 se detecta ADN de VVZ en la reacción de amplificación de una muestra, significa que el Internal Control puede tener el resultado **Ct >35** o **Ct Undetermined**. De hecho, la reacción de amplificación de baja eficiencia para el Internal Control puede desplazarse mediante competencia con la reacción de amplificación de alta eficiencia para ADN de VVZ. En este caso, la muestra será de todas maneras idónea y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis cuantitativo de los resultados

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

En las reacciones de amplificación de los cuatro calibradores «Q-PCR Standard», los valores de **Ct** del VVZ 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 «VZV»	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 VVZ en la reacción de amplificación de cada **muestra** y la **curva de calibración** («Results > Standard Curve») 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 proteína principal de unión al ADN de VVZ (ORF29) en la reacción de amplificación, que corresponden a los equivalentes genómicos por reacción (rango de medición lineal del producto, consultar la sección «Características de rendimiento»), tal como se describe en la tabla siguiente:

Resultado de la muestra detector FAM «VZV»	Equivalentes genómicos de VVZ por reacción
Cantidad >1 × 10⁶	MÁS DE 1.000.000
1 × 10¹ ≤ cantidad ≤ 1 × 10⁶	= Cantidad
Cantidad <1 × 10¹	MENOS DE 10

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

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

Donde:

Vc es la cantidad de la muestra usada en la extracción expresada de acuerdo con la unidad necesaria de medición;

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

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

Va es el volumen del producto de extracción 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 «EXTRAblood» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA y el resultado **debe expresarse en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para muestras de sangre y el «EXTRAblood»
Nc (gEq/mL) = 25 × Cantidad

Cuando el sistema de extracción «ELITe STAR» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA, muestras de plasma recogido en EDTA o muestras de líquido cefalorraquídeo y el resultado **debe expresarse en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para muestras de sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo y el «ELITe STAR»
Nc (gEq/mL) = 28 × Cantidad

Cuando el sistema de extracción «ELITe GALAXY» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA, muestras de plasma recogido en EDTA o muestras de líquido cefalorraquídeo y el resultado **debe expresarse en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

Fórmula simplificada para muestras de sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo y el «ELITe GALAXY»
Nc (gEq/mL) = 35 × Cantidad

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

Fórmula simplificada para muestras de líquido cefalorraquídeo o de plasma y el «NucliSENS® easyMAG®»
Nc (gEq/mL) = 10 × Cantidad

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

Fórmula simplificada para muestras de plasma y el «QIAAsymphony® SP/AS»
Nc (gEq/mL) = 12 × Cantidad

Cálculo de los límites del rango de medición lineal

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

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

Cuando el kit de extracción «**EXTRABlood**» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA, la fórmula es la siguiente:

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

Cuando el sistema de extracción «**ELITe STAR**» se utiliza con muestras de sangre recogida en EDTA, muestras de plasma recogido en EDTA o 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 × 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 recogida en EDTA, muestras de plasma recogido en EDTA o 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 × 1.000.000 gEq
de 350 a 35,000,000 gEq/mL

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

Límites del rango de medición (gEq/mL) con el «NucliSENS® easyMAG®»
Límite inferior (gEq/mL) = 10 × 10 gEq
Límite superior (gEq/mL) = 10 × 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 recogido 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 × 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 del ensayo, como límite de detección, se analizó 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	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 evaluó con un panel de diluciones de VVZ dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo la muestra VZV07-12 del panel «QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido) en sangre recogida en EDTA negativa para ADN de VVZ. Las concentraciones virales variaron entre 10 gEq/mL y 562 gEq/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el «**ELITe GALAXY**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

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 %	100 gEq/mL	64 gEq/mL	241 gEq/mL

La sensibilidad analítica de este ensayo utilizado con muestras de plasma y el «**ELITe GALAXY**» se evaluó con un panel de diluciones de VVZ dentro de la concentración límite. El panel se preparó diluyendo la muestra VZV07-12 del producto «QCMD 2007 Varicella Zoster Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido) en muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ. Las concentraciones virales variaron entre 10 gEq/mL y 562 gEq/mL. Cada muestra del panel se analizó en 12 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el «**ELITe GALAXY**» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

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

Límite de detección para muestras de plasma y el «ELITe GALAXY» (gEq/mL)			
		Intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
Positividad del 95 %	69 gEq/mL	46 gEq/mL	164 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 del ensayo, expresada como rango de medición lineal, se determinó utilizando un panel de diluciones (1 log₁₀ entre una dilución y otra) de un ADN plasmídico que contenía el producto de amplificación con una concentración inicial medida con un espectrofotómetro. Las diluciones de 10⁷ moléculas por reacción a 10¹ moléculas por reacción se analizaron en 9 duplicados, realizando la amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo presenta una respuesta lineal para todas las diluciones (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 de la amplificación del calibrador «Q-PCR Standard» con la concentración más alta (10⁵ moléculas/20 µL).

El límite inferior del rango de medición lineal se estableció de 10 moléculas por reacción, correspondientes a los equivalentes genómicos por reacción, dentro de un logaritmo a partir de la amplificación del calibrador «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 como gEq/mL, que conciernen al kit de extracción empleado, se calculan en la página 25.

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión del ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos con varios duplicados de una muestra analizada en la misma sesión de amplificación, permite adquirir un coeficiente de variación porcentual (% CV) medio de aproximadamente un 21,0 % de las cantidades medidas, dentro del rango de 10⁶ moléculas a 10¹ moléculas en los 20 µL de ADN añadidos a la reacción de amplificación.

La exactitud del ensayo, expresada como diferencia entre el promedio de los resultados obtenidos con varios duplicados de una muestra analizada en la misma sesión de amplificación y la concentración teórica de la muestra, permite obtener una inexactitud porcentual media (% inexacto) de un 9,7 % 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 precisión y la exactitud se determinaron utilizando los datos obtenidos para el estudio del rango de medición lineal.

Sensibilidad analítica: reproducibilidad con panel de material de referencia certificado

La sensibilidad analítica del ensayo, expresada como reproducibilidad de los resultados comparados con los resultados obtenidos utilizando otros ensayos en laboratorios diferentes, se evaluó analizando un panel de material de referencia certificado.

Las pruebas se realizaron utilizando como material de referencia certificado y calibrado un panel de diluciones de las cepas 98/4 y Ellen del VZV dentro de la concentración límite («QCMD 2010 Varicella-Zoster Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd., Reino Unido). Cada muestra del panel se volvió a suspender en sangre recogida en EDA y se utilizó en duplicados para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con el «EXTRAblood» y amplificación. con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Pruebas con material de referencia certificado y el «EXTRAblood»				
Muestra	Consenso de ensayos comerciales conc. virus Log ₁₀	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
VZV10-01	2,047	0,593	2/2	1,748
VZV10-02	Negativas	N/A	0/2	No detectado
VZV10-03	1,844	1,140	2/2	1,569
VZV10-04	1,489	0,378	1/2	1,439
VZV10-05	VHS1	N/A	0/2	No detectado
VZV10-06	2,428	0,471	2/2	2,274
VZV10-07	2,149	0,648	2/2	2,070
VZV10-08	3,410	0,454	2/2	3,618
VZV10-09	0,964	0,729	1/2	1,687
VZV10-10	3,174	0,454	2/2	3,136

Todas las muestras se detectaron correctamente. Las muestras VZV10-04 (31 copias/mL) y VZV10-09 (9 copias/mL) solo dieron un resultado positivo en 2 duplicados, pero tienen concentraciones inferiores al límite de detección del producto. Todos los resultados cuantitativos obtenidos están dentro del rango definido mediante el consenso ± 1 desviación estándar.

Las pruebas se realizaron utilizando como material de referencia calibrado un panel de diluciones de las cepas 98/4 y Ellen del VZV dentro de la concentración límite («QCMD 2012 Varicella-Zoster Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd., Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en duplicados 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 material de referencia calibrados y el «ELITe STAR»				
Muestra	Consenso de ensayos comerciales conc. virus Log ₁₀	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
VZV12-01	Negativas	N/A	0/2	No detectado
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,535
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,564
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,267
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,854
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,349
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,129
VZV12-08	1,926	0,418	2/2	1,697
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	2,531
VZV12-10	Negativas	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 cuantitativos definidos mediante consenso de los ensayos comerciales.

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

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Análisis con materiales de referencia calibrados y el ELITe GALAXY				
Muestra	Consenso de ensayos comerciales conc. virus Log ₁₀	Desviación estándar	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
VZV12-01	Negativas	N/A	0/2	No detectado
VZV12-02	3,150	0,439	2/2	3,061
VZV12-03	4,052	0,588	2/2	4,275
VZV12-04	2,280	0,584	2/2	2,435
VZV12-05	2,547	0,450	2/2	2,686
VZV12-06	3,099	0,406	2/2	3,359
VZV12-07	2,794	0,633	2/2	3,027
VZV12-08	1,926	0,418	1/2	1,860
VZV12-09	2,287	0,561	2/2	1,957
VZV12-10	Negativas	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 cuantitativos definidos mediante consenso de los ensayos comerciales. La muestra VZV12-08 solo dio un resultado positivo en 2 duplicados, lo que puede explicarse porque el título de la muestra estaba muy cerca del límite de detección. Todos los resultados cuantitativos obtenidos están dentro del rango definido mediante el consenso ± 1 desviación estándar.

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

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

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y de la sonda fluorescente en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para el gen de la proteína principal de unión al ADN de VVZ (ORF 29) mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la eficacia de detección y cuantificación en distintos genotipos/subtipos, se evaluó comparando un panel de material de referencia.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia certificado y calibrado un panel que contenía muestras positivas para ADN de VVZ de las cepas 98/4 y Ellen («QCMD 2010 Varicella-Zoster Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd., Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

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

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA positivas para ADN de VVZ.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 24 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes supuestamente negativas para ADN de VVZ («Biological Sample Library Europe S.A.S.», Lyon, Francia), que se enriquecieron a un título conocido de ADN de VVZ añadiendo la muestra VZV03-10 del producto «QCMD 2010 Human Varicella-Zoster Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con «EXTRAblood» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VVZ	24	24	0

Todas las muestras enriquecidas se detectaron correctamente como positivas para ADN de VVZ. 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 VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra VZV12-03 del producto «QCMD 2012 Varicella-Zoster Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido), 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VVZ y 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra VZV07-06 del producto «QCMD 2007 Human Varicella-Zoster 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 VVZ	22	22	0
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VVZ	30	30	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VVZ	30	30	0

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

La sensibilidad diagnóstica se evaluó utilizando 20 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra VZV12-03 del producto «QCMD 2012 Varicella-Zoster Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido), 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra VZV07-06 del producto «QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido) y 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra VZV07-06 del producto «QCMD 2007 Human Varicella-Zoster Virus EQA Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el sistema «ELITe GALAXY» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo enriquecido con ADN de VVZ	20	20	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VVZ	30	29	0
Sangre recogida en EDTA enriquecida con ADN de VVZ	30	29	0

Una muestra de plasma y una muestra de sangre dieron un resultado no válido debido a un error en el paso de extracción, por lo que no se utilizaron para calcular la sensibilidad.

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

Especificidad analítica: ausencia de reactividad cruzada con marcadores potencialmente interferentes

La especificidad analítica del ensayo, expresada como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, se evaluó comparando las secuencias con las 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 VVZ, inclusive los genomas completos del VHS1 y del VVZ, los virus del herpes humano que son más similares al VVZ, mostró especificidad y ausencia de homologías reseñables.

La especificidad analítica del ensayo, expresada como ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes, se evaluó analizando un panel de material de referencia certificado.

La especificidad analítica se evaluó utilizando como material certificado y calibrado un panel de diluciones de VHS1 y VVZ dentro de la concentración límite («QCMD 2009 Herpes Simplex Virus DNA EQA Panel», Qnostics Ltd., Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados, realizando el procedimiento entero de análisis: extracción con el «EXTRAblood» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se incluyen en la siguiente tabla.

Pruebas con material de referencia certificado y el «EXTRAblood»				
Muestra	Contenido	Consenso de ensayos comerciales conc. virus Log ₁₀	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ gEq/mL
HSV09-01	VHS1	2,215	0/2	No detectado
HSV09-02	VHS2	2,236	0/2	No detectado
HSV09-03	VHS2	3,293	0/2	No detectado
HSV09-04	VHS2	2,314	0/2	No detectado
HSV09-05	VVZ	-	2/2	4,939
HSV09-06	VHS1	2,402	0/2	No detectado
HSV09-07	VHS1	4,189	0/2	No detectado
HSV09-08	VHS2	2,389	0/2	No detectado
HSV09-09	Negativas	-	0/2	No detectado
HSV09-10	VHS1	3,205	0/2	No detectado

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

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando muestras clínicas de sangre recogida en EDTA de donantes supuestamente negativas para ADN de VVZ.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 24 muestras de sangre recogida en EDTA de donantes supuestamente negativas para ADN de VVZ («Biological Sample Library Europe S.A.S.», Lyon, Francia). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, a saber, extracción con «EXTRAblood» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre recogida en EDTA supuestamente negativa para ADN de VVZ	24	1	23

Una muestra de sangre de un donante dio un resultado positivo para ADN de VVZ a un título muy bajo (aproximadamente 17 qEq/mL) cuando se utilizaron productos de ELITechGroup S.p.A. La misma muestra dio un resultado negativo válido en una segunda sesión de amplificación. Esta diferencia puede explicarse por una posible reactivación del VVZ, un virus muy propagado en la población, a partir de un período de latencia. La especificidad diagnóstica del ensayo resultó ser igual al 95,8 %.

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 24 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VVZ, 30 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VVZ (que se habían analizado con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real) y 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ (que se habían analizado con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la 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 VVZ	24	0	24
Sangre recogida EDTA y negativa para ADN de VVZ	30	0	29
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VVZ	30	0	30

Una muestra de sangre dio un resultado no válido, posiblemente debido a la presencia de un inhibidor, por lo que no se utilizó para calcular la especificidad.

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

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando 22 muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de VVZ, 34 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ y 35 muestras de sangre recogida en EDTA negativas para ADN de VVZ (que se habían analizado con un producto de diagnóstico *in vitro* con marcado CE para la amplificación en tiempo real). Cada muestra se utilizó para

realizar el procedimiento entero de análisis: extracción y configuración de la PCR con el sistema «ELITe GALAXY» y amplificación, con productos de ELITechGroup S.p.A.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Líquido cefalorraquídeo negativo para ADN de VVZ	22	0	22
Plasma recogido en EDTA negativo para ADN de VVZ	34	0	34
Sangre recogida EDTA y negativa para ADN de VVZ	35	0	35

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

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

Roche cobas z 480 analyzer

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

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

Sangre recogida en EDTA

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

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

Plasma recogido en EDTA

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

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

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

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

Otras muestras:

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: Hisopados de líquido cefalorraquídeo (LCR) procedentes de lesiones mucocutáneas, líquido cefalorraquídeo.

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

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

Para el control positivo, utilizar el producto «VZV - ELITe Positive Control» o, de manera alternativa, el producto «VZV - ELITe Positive Control RF» o el producto «VZV 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, por ejemplo, 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 específico y, en la ventana principal, abrir una sesión «New Experiment».
- Configurar el volumen de reacción («Reaction volume») en 40 µL.
- Asignar un identificador para cada muestra («Sample editor»).
- Configurar el ciclo térmico de la reacción conforme a la tabla siguiente:

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

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

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

Rellenar la **Hoja de trabajo** adjunta al final de 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 del ADN en la muestra origen, es preciso realizar serie de reacciones con el calibrador «Q-PCR Standard» (10⁵ gEq, 10⁴ gEq, 10³ gEq, 10² gEq) para 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 a C12: Muestras que van a analizarse; NC: Control negativo de amplificación. 10²: Estándar 10² gEq; 10³: Estándar 10³ gEq; 10⁴: Estándar 10⁴ gEq; 10⁵: Estándar 10⁵ gEq.

Configuración de la amplificación

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

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

- Recuperar y descongelar las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrifugadora durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y, después, conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar las probetas que contienen la mezcla «VZV 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 centrifugadora durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y, después, conservarlas en hielo.
- Recuperar y descongelar la muestra que contiene el producto «VZV - Positive Control» o, de manera alternativa, el producto «VZV - ELITe Positive Control RF» o las probetas que contienen el producto «VZV Q-PCR Standard». Agitar las probetas delicadamente y colocarlas en la centrifugadora durante 5 segundos para enviar el contenido al fondo y, después, conservarlas en hielo.
- Recuperar la **placa AD** que va a utilizarse en la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.

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

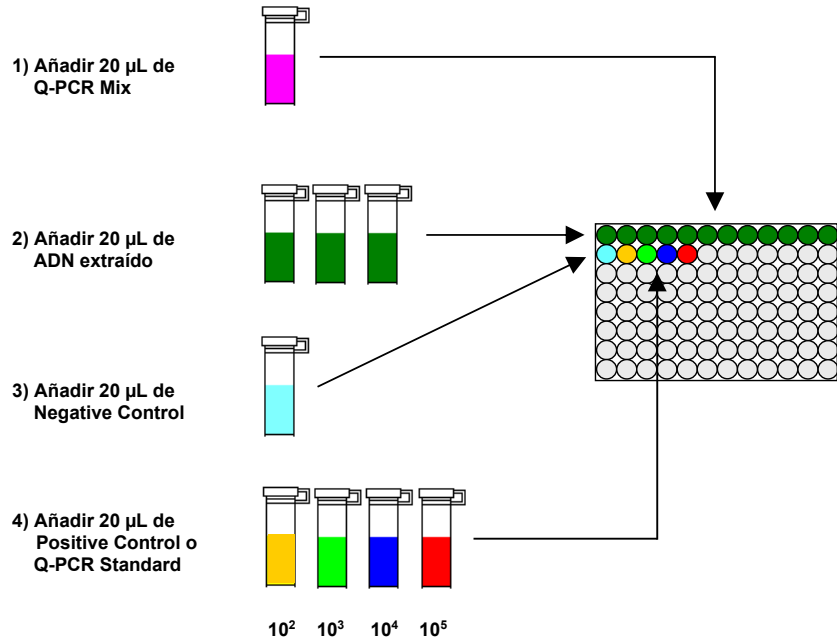
Nota: Si no se utiliza toda la mezcla de reacción, conservar la parte sobrante a -20 °C durante un máximo de un mes. Congelar y descongelar la mezcla de reacción un máximo de **5 veces**.

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

4. Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:
- Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ADN de VEB), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL de «VZV - ELITe Positive Control»** o, de manera alternativa, **«VZV - ELITe Positive Control RF»** en el pocillo correspondiente de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control positivo pipeteando el producto **«VZV - 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 VVZ), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **20 µL de «VZV Q-PCR Standard 10²»** en el pocillo correspondiente de la **placa AD**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el calibrador pipeteando el producto **«VZV - Q-PCR Standard»** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma manera con los demás calibradores **«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-VVZ-EGSpA»).

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

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



Análisis de los resultados cualitativos

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

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

Seleccionar el grupo de muestras que se quiere analizar.

De acuerdo con la documentación del 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 «VZV» 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 «VZV» en **0.80**.
- Configurar manualmente los campos **«Threshold»** y **«Noiseband»** para el detector VIC «IC» en **1.5**.

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

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

Positive Control de reacción detector «VZV»	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**, 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 VVZ, se configuran las reacciones del producto **«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 VVZ (ventana «Analysis») se utiliza para validar la amplificación y la detección, tal como se muestra en la tabla siguiente:

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

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

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

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

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ADN de VVZ
Detector «VZV»	Detector «IC»			
Ct Undetermined	Ct >35 o Ct Undetermined	No idónea	No válido	-
	Ct ≤35	Idónea	Válido, negativo	NO DETECTADO
Ct Determined	Ct >35 o Ct Undetermined	Idónea	Válido, positivo	DETECTADO
	Ct ≤35	Idónea	Válido, positivo	DETECTADO

Si el resultado de la reacción de amplificación de la muestra es **Ct Undetermined** para el VVZ 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 presentado problemas durante la fase de amplificación (amplificación no eficiente o nula) o durante el paso de extracción (degradación del ADN de la muestra, muestra con un número no suficiente de células, pérdida de ADN durante la extracción o presencia de inhibidores en el ADN extraído), lo que puede conllevar resultados incorrectos y falsos negativos. La muestra es no idónea, el ensayo es no válido y deberá repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el VVZ y **Ct ≤35** para el Internal Control, significa que el ADN de VVZ no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VVZ 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 deben interpretarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Nota: Si se detecta ADN de VVZ 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 del VVZ de alta eficiencia. En este caso, la muestra será de todas maneras idónea y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis de los resultados cuantitativos

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

Si el resultado de la reacción de amplificación para el **Q-PCR Standard 10⁵** es **Ct > 25 o Ct Undetermined**, o si los valores de Ct de los cuatro calibradores «Q-PCR Standard» no se ajusta de forma regular 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 VVZ 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 equivalentes genómicos por reacción, de 25.000.000 a 250 equivalentes genómicos por mL de sangre con el sistema de extracción «**MagNA Pure 24**» (consultar la sección «Características de rendimiento»), tal como se muestra en la tabla siguiente:

Resultado de la muestra Detector FAM «VZV»	Equivalentes genómicos del VVZ por reacción
Cantidad >1 × 10 ⁶	MÁS DE 1.000.000
1.0 × 10 ¹ ≤ cantidad ≤ 1 × 10 ⁶	= Cantidad
Cantidad >1,0 × 10 ¹	MENOS DE 10

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

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

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**.

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

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica: límite de detección

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

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

Muestras	N	positivas	negativas
10 copias de ADN plasmídico + 150.000 copias de pBETAGLOBINA	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 (10^2 copias/20 µL).

El límite superior del rango de medición lineal se estableció en 10^6 copias/reacción dentro de un logaritmo a partir de la concentración más alta del calibrador de amplificación «Q-PCR Standard» (10^5 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	1.000.000

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

Sensibilidad analítica: Precisión y exactitud

La precisión de este ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando diferentes duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual (%CV) medio máximo de los valores de Ct inferior al 1 % en el rango de 10^6 moléculas a 10^1 moléculas en 20 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

La precisión de este ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos en la misma sesión de amplificación utilizando distintos duplicados de una muestra, permitió obtener un coeficiente de variación porcentual medio (%VC) de las cantidades medidas de alrededor del 7 % en el rango de 10^6 moléculas a 10^1 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 medida de alrededor del 12 % en el rango de 10^6 moléculas a 10^1 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 de los valores de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «QCMD 2017 Varicella-Zoster Virus DNA EQA Panel» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando 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	Diana	Positivas/Duplicados
VZVDNA17S-01	Oka de VVZ	2/2
VZVDNA17S-02	Negativa	0/2
VZVDNA17S-03	Oka de VVZ	2/2
VZVDNA17S-04	Oka de VVZ	2/2
VZVDNA17S-05	Oka de VVZ	2/2
VZVDNA17S-06	Ellen de VVZ	2/2
VZVDNA17S-07	Ellen de VVZ	2/2
VZVDNA17S-08	Ellen de VVZ	2/2
VZVDNA17S-09	Ellen de VVZ	2/2
VZVDNA17S-10	Ellen de VVZ	2/2

Todas las muestras negativas se detectaron correctamente como negativas y todas las muestras positivas se detectaron correctamente como positivas de acuerdo con los resultados cuantitativos definidos mediante consenso de un control de calidad externo (EQA).

La sensibilidad analítica del ensayo, expresada como la reproducibilidad del valor de un material de referencia calibrado, se evaluó utilizando como material de referencia el panel calibrado «VZV Molecular “Q” Panel» (Qnostics Ltd., Reino Unido). Cada muestra del panel se analizó en 2 duplicados realizando 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	Positivas/Duplicados
VZVMQP01-High	2/2
VZVMQP01-Medium	2/2
VZVMQP01-Low	2/2
VZVMQP01-Negative	0/2

Todas las muestras positivas 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 VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra «VZVMQP01-High» (Qnostics Ltd, Reino Unido) y 30 muestras de plasma recogido en EDTA negativas para ADN de VVZ, que se enriquecieron con ADN de VVZ añadiendo la muestra «VZVMQP01-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 VVZ	30	30	0
Plasma recogido en EDTA enriquecido con ADN de VVZ	30	30	0

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

La sensibilidad diagnóstica del ensayo asociada a las muestras de sangre y plasma fue del 100 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica se evaluó utilizando como material de referencia 36 muestras de sangre recogida en EDTA supuestamente negativas para ADN de VVZ, así como 34 muestras de plasma recogido en EDTA supuestamente negativas para ADN de VVZ.

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 VVZ	36	0	36
Plasma recogido en EDTA supuestamente negativo para ADN de VVZ	34	1	34

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

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

Nota: Los datos y resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y los instrumentos se incluyen en la documentación técnica del producto «VZV ELITe MGB® Kit», FTP RTS035PLD.

BIBLIOGRAFÍA

A. J. Wakefield et al. (1992) *J Med Virology* **38**: 183 - 190
 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 ADN extraído que esté contaminado con hemoglobina, dextrano, Ficoll®, etanol o 2-propanol, pues estas sustancias inhiben la reacción de amplificación de ácidos nucleicos y pueden dar lugar a resultados no válidos.

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

No se dispone de datos sobre las prestaciones del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: exudados de las lesiones mucocutáneas y líquido amniótico.

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

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

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, realizar estos pasos con el debido cuidado y seguir estrictamente las instrucciones proporcionadas 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 el VZV, 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 el ADN de VZV no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra, si bien no puede descartarse que el ADN de VZV 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 viral cubierto por los cebadores y las sondas del

producto pueden afectar negativamente a la detección de ADN de VZV.

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

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, este producto presenta un riesgo residual de obtener 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

No se ha detectado ADN diana en las reacciones del Positive Control o del calibrador «Q-PCR Standard» o el coeficiente de correlación de la curva de calibración no es válido	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	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.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

ADN de la diana detectado en la reacción del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra. Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra. Prestar atención al distribuir las muestras, los controles negativos, los controles positivos y los calibradores 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, 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.
Error al configurar el instrumento.	Comprobar la configuración de la posición de las muestras, de los controles negativos, de los controles positivos o de los calibradores en el instrumento.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Proceder con cuidado al sellar la microplaca.
Contaminación del agua para biología molecular.	Utilizar una nueva 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.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

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 «PCR Only». Repetir la extracción y la amplificación de la muestra.
Almacenamiento incorrecto de los reactivos.	Asegurarse de que la mezcla de reacción no haya estado expuesta 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.

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».

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

SÍMBOLOS

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

**AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA
LIMITADA**

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

Los reactivos de detección ELITe MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU. 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 «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.

QIASymphony® es una marca comercial registrada de QIAGEN GmbH.

Ficoll® es una marca registrada de GE Healthcare.

VZV ELITe MGB® kit used with Genius series platforms

Ref: RTS035PLD



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 «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpetic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

- › Whole Blood EDTA, Plasma EDTA, CSF

D. Kit content

VZV 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

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> › 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 | <ul style="list-style-type: none"> › VZV - ELITe Standard: STD035PLD › VZV - ELITe Positive Control: CTR035PLD › 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

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

G. Performance ELITe InGenius® and ELITe BeGenius®

Matrix	Limit of Detection	Linearity Range	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Whole Blood	100 cp / mL	100 – 25,000,000	96% 27/28*	100% 34/34*
Plasma	69 cp / mL	69 – 25,000,000	100% 30/30*	100% 30/30*
CSF	69 cp / reaction	69 – 25,000,000	100% 20/20*	100% 22/22*

*confirmed samples/ tested samples

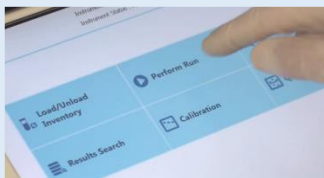
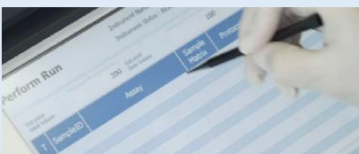
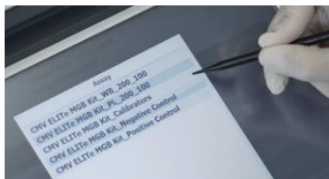
H. Procedures ELITE InGenius®

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: VZV Q-PCR Standard in the "Calibration menu" Verify controls: VZV 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®

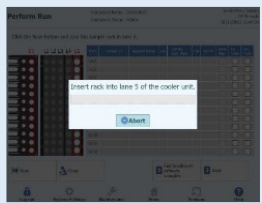
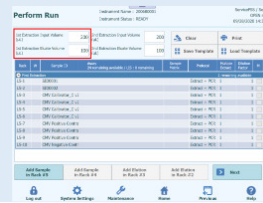
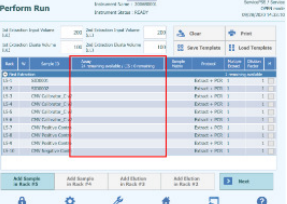
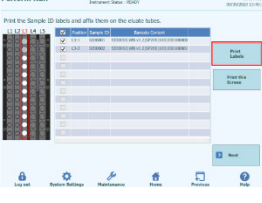
The user is guided step-by-step by the ELITE BeGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE BeGenius Identification with username and password
Select the mode "Closed"
2. Verify calibrators: VZV Q-PCR standard in the "Calibration menu"
Verify controls: VZV pos. and neg. controls in the "Control menu"
NB: Both have been run, approved and not expired
3. Thaw the VZV 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

VZV ELITe MGB® Kit used with ABI PCR instrument

Ref: RTS035PLD



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 «VZV ELITe MGB® Kit» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for the **detection and quantification of the DNA of human herpesic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	Human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

› Whole blood EDTA

› Plasma EDTA

› Cerebrospinal fluid

D. Kit content

VZV 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
- ›

- › VZV ELITe Standard: STD035PLD
- › VZV - ELITe Positive Control: CTR035PLD
- › 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	100% (30/30)*	100% (29/29)*
	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	100 gEq/mL	100% (29/29)*	100% (35/35)*
	Plasma	69 gEq/mL	100% (29/29)*	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	700 µL	85 µL	10 µL

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx and 7300 PCR instruments

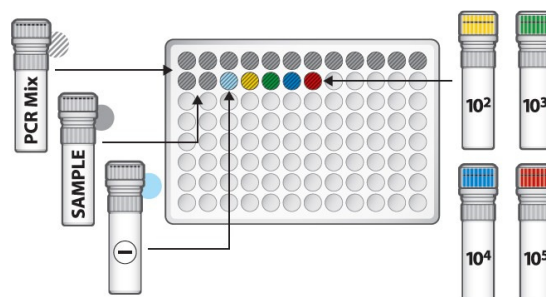
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
4. Set passive fluorescence as "Cy5" with 7500 Fast Dx and as "ROX" with 7300 instrument
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition 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 VZV 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	VZV 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

VZV 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 VZV 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.

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

Ref.: RTS035PLD



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 «**VZV ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative and quantitative nucleic acids amplification assay for **the detection and quantification of the DNA of human herpesic Varicella - Zoster virus (VZV)** 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 VZV 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
VZV	Major DNA binding protein (ORF 29)	FAM
Internal Control	human beta globin gene	AP525

C. Validated matrix

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

D. Kit content

VZV 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
- › **VZV - ELITE Positive Control**: CTR035PLD
- › **VZV ELITE Standard**: STD035PLD
- › **CPE Internal Control**: CTRCPE

F. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
MagNA Pure 24	Whole blood	10 cp/reaction	100% (30/30)*	100% (36/36)*
	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

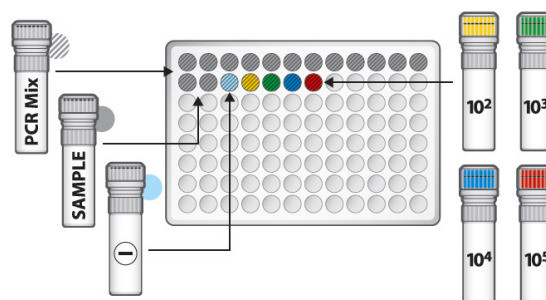
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "VZV" detector with "FAM channel 465 -510"
3. Set "Internal Control" detector with "VIC channel 540 - 580"

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 VZV 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	VZV 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

VZV 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 VZV 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.