



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

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 07/02/2025

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«Bordetella ELITE MGB[®] Kit» Ref. RTS140ING

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

Insertion of interpretative sentence relating to IS481 in paragraphs:

- “Validation of Sample results”
- “Potential interfering markers (cross-reactivity)”
- “Potential interfering markers (inhibition)”
- “Procedure limitations”

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



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING



INDICE

USO PREVISTO	página 1
PRINCIPIOS DEL ENSAYO	página 2
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	página 3
MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 3
MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO	página 3
OTROS PRODUCTOS NECESARIOS	página 3
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	página 4
MUESTRAS Y CONTROLES	página 5
PROCEDIMIENTO	página 6
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	página 13
BIBLIOGRAFÍA	página 19
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	página 19
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	página 20
SÍMBOLOS	página 22
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	página 23

USO PREVISTO

El producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» forma parte de un ensayo cualitativo de amplificación múltiple de ácidos nucleicos para la detección y la identificación del ADN de *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella parapertussis* (BPP) y *Bordetella holmesii* (BH) en muestras clínicas.

El ensayo se ha validado utilizando el sistema ELITE InGenius® y comenzando con aspirados nasofaríngeos.

El producto se utiliza para fines de diagnóstico de infecciones respiratorias por *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella holmesii*, junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo consiste en la realización de una reacción de amplificación múltiple en tiempo real con el ELITE InGenius®, un sistema integrado y automatizado para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, así como para la interpretación de los resultados.

A partir del ADN extraído de cada muestra analizada, la mezcla de PCR de BORD realiza varias reacciones de amplificación en el cartucho de PCR con el fin de amplificar las dianas siguientes:

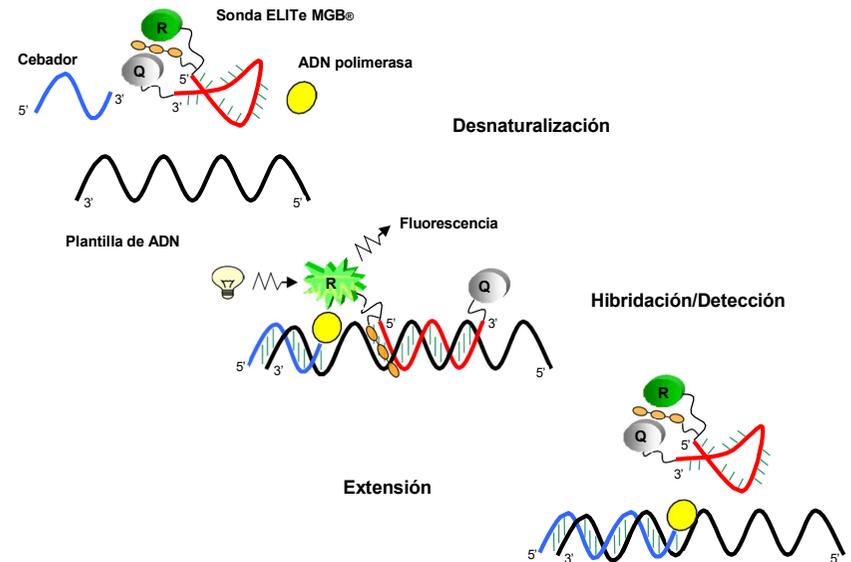
- Secuencia repetida IS481 de *B. pertussis* y *B. holmesii*, detectada por la sonda específica IS481 (canal 1),
- Gen ptxA de *B. pertussis*, detectado por la sonda específica BP (canal 5),
- Gen recA de *B. holmesii*, detectado por la sonda específica BH (canal 6),
- Secuencia repetida IS1001 de *B. parapertussis*, detectada por la sonda específica BPP (canal 4).

La mezcla de PCR de BORD también amplifica el control interno de extracción e inhibición basado en una secuencia artificial (IC2) y detectado por la sonda específica IC (canal 2).

Las sondas que cuentan con la tecnología ELITE MGB® se activan cuando se hibridan con el producto específico de la reacción de amplificación. El instrumento mide y registra la emisión de fluorescencia. Al finalizar el ciclo de amplificación, los gráficos de fluorescencia se analizan para identificar los ciclos umbral (Ct). La interpretación de los resultados permite detectar la presencia de los patógenos de interés en la muestra inicial.

El ensayo se ha validado con el ELITE InGenius, un sistema integrado e automatizado para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, así como para la interpretación de resultados.

En la siguiente ilustración se muestra de manera esquemática el mecanismo de activación y emisión de fluorescencia de la sonda con tecnología ELITE MGB®. Tenga en cuenta que la sonda no se hidroliza durante el ciclo de amplificación.



Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «**Bordetella ELITE MGB® Kit**» incluye una mezcla completa y lista para el uso para la amplificación en tiempo real, la **mezcla de PCR de BORD**, dividida en alcuotas en ocho probetas. Cada probeta contiene **280 µL** de solución, suficiente para **12 análisis** en condiciones óptimas de consumo de reactivos (con al menos 2 análisis por sesión) cuando se usa con el sistema **ELITE InGenius**.

La mezcla de PCR de BORD contiene los cebadores y la sonda específicos para:

- La secuencia repetida **IS481** de *B. pertussis* y *B. holmesii*. La sonda **IS481** (canal 1) se marca con el fluoróforo FAM, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente,
- El gen **ptxA** de *B. pertussis*. La sonda **BP** (canal 5) se marca con el fluoróforo AP639, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- El gen **recA** de *B. holmesii*. La sonda **BH** (canal 6) se marca con el fluoróforo AP690, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- La secuencia repetida **IS1001** de *B. parapertussis*. La sonda **BPP** (canal 4) se marca con el fluoróforo AP593, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.
- La secuencia artificial **IC2** de Internal Control (IC) exógeno. La sonda **IC** (canal 2) se marca con el fluoróforo AP525, se estabiliza mediante el grupo MGB® y se inactiva mediante una porción no fluorescente.

La mezcla de PCR de BORD contiene la solución tampón, el cloruro de magnesio, los nucleótidos-trifosfatos, los estabilizadores y la enzima Taq ADN polimerasa con activación térmica («hot start»).

El producto permite realizar **96 análisis cuando se utiliza el sistema ELITE InGenius**, inclusive los controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
Mezcla de PCR de BORD	Mezcla completa de reacción Tapón blanco	8x280 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.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

El volumen de suministro de este producto **no** incluye los reactivos para la extracción del ADN de las muestras que van a analizarse, ni tampoco el Internal Control de extracción e inhibición, el Positive Control de amplificación ni los consumibles.

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

- parámetros para la amplificación del Positive Control «**BORD ELITE_PC**»,
- parámetros para la amplificación del Negative Control «**BORD ELITE_NC**»,
- parámetros para las muestras de aspirados nasofaríngeos que van a analizarse «**BORD ELITE_NPA_200_100**».

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

Con el instrumento «**ELITE InGenius**» se necesitan los siguientes productos genéricos:

- cartuchos de extracción «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumibles para extracción «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- cartuchos de amplificación «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- puntas «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- cajas **ELITE InGenius® Waste Box** (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Como plantilla de control interno de extracción e inhibición, es necesario utilizar el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE). Se trata de una solución estabilizada que contiene ADN plasmídicos y ARN genómico del bacteriófago.

Como plantilla de control positivo de amplificación, es necesario utilizar el producto específico «**Bordetella - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR140ING). Se trata de una solución estabilizada que contiene ADN plasmídicos.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto está diseñado para uso *in vitro*.

Advertencias y precauciones generales

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

Manipular y eliminar todos los reactivos y materiales utilizados para realizar el ensayo como si fueran 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 eliminarlos.

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

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

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

Leer atentamente todas las instrucciones proporcionadas con el producto antes de realizar el ensayo.

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

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

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

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular

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, para los procedimientos de biología molecular se requiere personal debidamente formado y cualificado.

Es necesario disponer de batas, guantes e instrumentos específicos para las sesiones de trabajo. Es necesario tener disponibles áreas independientes para las pruebas de biología molecular y las pruebas de cultivo microbiológico. No manipular nunca cultivos líquidos o sólidos en el área designada para las reacciones de extracción/amplificación.

Las muestras deben ser aptas y, en la medida de lo posible, estar destinadas exclusivamente a este tipo de análisis. Las muestras deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular las muestras deben destinarse exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de 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.

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

Los cartuchos «PCR Cassette» deben manipularse evitando en lo posible la dispersión del producto de amplificación hacia el entorno para que no se produzca una contaminación de las muestras ni de los reactivos.

Advertencias y precauciones específicas de los componentes

La **mezcla de PCR** se debe conservar a -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La **mezcla de PCR** puede congelarse y descongelarse un máximo de **siete veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden provocar una pérdida del rendimiento del producto.

MUESTRAS Y CONTROLES**Muestras**

Este producto debe utilizarse con las siguientes muestras clínicas:

Aspirados nasofaríngeos

Las muestras de aspirados nasofaríngeos para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse de acuerdo con las directrices para laboratorios, así como transportarse y conservarse a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) durante un máximo de dos días, o de +2 °C a +8 °C durante un máximo de siete días; de lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de un mes 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.

Antes del análisis con este producto, se deben transferir 0,2 mL de la muestra a la probeta ultrasónica proporcionada con el producto «ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set».

Nota: Para llevar a cabo la extracción del ADN a partir de aspirados nasofaríngeos con el sistema ELITE InGenius y la versión 1.3 del ELITE InGenius Software (o una posterior), utilizar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **BORD ELITE_NPA_200_100**. Este protocolo procesa 200 µL de muestra, añade el **CPE** (Internal Control) a 10 µL/extracción y eluye los ácidos nucleicos en 100 µL.

Sustancias interferentes

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias interferentes» del apartado «Características de rendimiento».

Controles de amplificación

Antes de analizar una muestra, es obligatorio preparar y aprobar los controles de amplificación correspondientes para el lote de reactivos de amplificación que va a utilizarse en el ensayo:

- Como Positive Control de la amplificación, utilizar el reactivo **Bordetella – ELITE Positive Control** (no incluido en el kit) junto con el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **BORD ELITE_PC**,
- Para el Negative Control de la amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en el kit) junto con el Assay Protocol (protocolo de ensayo) **BORD ELITE_NC**.

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

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

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

- Se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación.
- Los resultados de los controles de calidad (consultar el apartado siguiente) se encuentran fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento **ELITE InGenius**.

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.

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

PROCEDIMIENTO

El procedimiento para utilizar el producto **Bordetella 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 instrumento **ELITE InGenius** y seleccionar el modo de inicio de sesión «**CLOSED**».
- Comprobar que los controles de amplificación (controles, BORD Positive Control y BORD Negative Control) se hayan procesado junto con el lote de reactivos de amplificación pertinente y que los resultados se hayan aprobado y validado («Status»). Si no se dispone de resultados aprobados o válidos para los controles de amplificación, generarlos tal como se indica en los siguientes apartados.
- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario para configurar la sesión y utilizando los Assay Protocols (protocolos de ensayo) proporcionados por ELITechGroup S.p.A. Estos protocolos de diagnóstico *in vitro* se han validado específicamente con los kits ELITE MGB®, el instrumento **ELITE InGenius** y la matriz mencionada.

En la tabla siguiente, se describe el Assay Protocol (protocolo de ensayo) disponible para el análisis de muestras con el producto **Bordetella ELITE MGB® Kit**.

Protocolo de ensayo para el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit»			
Nombre	Matriz	Informe	Características
BORD ELITE_NPA_200_100	Aspirados nasofaríngeos	Positivo/Negativo	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción: 100 µL Internal Control: 10 µL Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen inicial de PCR de la muestra: 20 µL

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

Configuración de la sesión

El producto **Bordetella ELITE MGB® Kit** puede utilizarse con el sistema **ELITE InGenius** para realizar las siguientes tareas:

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

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

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

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

A. Sesión integrada

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

1. Descongelar las probetas de las mezclas de **BORD PCR Mix** para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar la mezcla de PCR de BORD en un lugar oscuro, pues este reactivo es sensible a la luz.

2. Descongelar las probetas de CPE para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 extracciones. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
4. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 100 µL.
5. Para cada carril deseado, rellenar el ID de la muestra («Sample ID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
6. En la columna «Assay» (Ensayo), seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) que va a utilizarse (p. ej., BORD ELITE_NPA_200_100).
7. Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» sea «Extract + PCR».
8. En la columna «Sample Position» (Posición de la muestra), seleccionar «Extraction Tube» (Tubo de extracción).
9. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar el CPE y la **BORD PCR Mix** en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) del «Inventory Area» (área de inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», los cartuchos de extracción «ELITE InGenius SP 200», todos los consumibles necesarios y las muestras que van a extraerse en las posiciones indicadas en el paso 8 siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» (Inicio) para iniciar la sesión.

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

Nota: Al finalizar la sesión, la muestra extraída que ha quedado en la probeta de elución debe extraerse del instrumento, así como taparse, identificarse y conservarse a -20 °C durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

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

Nota: la **PCR Mix** puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

B. Sesión de amplificación

Para configurar la sesión de amplificación a partir del ADN extraído, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar las probetas de las mezclas de **BORD PCR Mix** para la sesión. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar la mezcla de PCR de BORD en un lugar oscuro, pues este reactivo es sensible a la luz.

2. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
3. 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.
4. Para cada carril deseado, rellenar el SID escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
5. En la columna «Assay» (Ensayo), seleccionar el Assay Protocol (protocolo de ensayo) que va a utilizarse (p. ej., BORD ELITE_NPA_200_100).
6. En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
7. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra de la columna «Sample Position» (Position de la muestra «Elution Tube (bottom row)» (Tubo de elución [fila inferior]) Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla de PCR de BORD en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) del «Inventory Area» (área de inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar los cartuchos «PCR Cassette» y las muestras del ácido nucleico extraído siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cerrar la puerta del instrumento.
12. Pulsar «Start» (Inicio) para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: la **PCR Mix** puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

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

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

1. Descongelar las probetas de las mezclas de **BORD PCR Mix** para la sesión. Una probeta es suficiente para preparar 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos (es decir, realizando al menos 2 ensayos en cada sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: Descongelar la mezcla de PCR de BORD en un lugar oscuro, pues este reactivo es sensible a la luz.

2. Descongelar la probeta de BORD Positive Control para la sesión. Cada probeta es suficiente para 4 sesiones. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua para biología molecular en un «Elution Tube» (Tubo de elución), incluida en el volumen de suministro del producto ELITE InGenius SP 200 Consumable Set.
4. Seleccionar «Perform Run» (Realizar ejecución) en la pantalla «Home» (Inicio).
5. 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.
6. En el carril deseado, seleccionar en la columna «Assay» (Ensayo) el Assay Protocol (protocolo de ensayo) que va a utilizarse.
7. Para el Positive Control, seleccionar BORD ELITE_PC en la columna «Assay» (Ensayo) e introducir el número de lote y la fecha de caducidad del BORD Positive Control.
8. Para el Negative Control, seleccionar BORD ELITE_NC e introducir el número de lote y la fecha de caducidad del agua de calidad para biología molecular.
9. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar la mezcla de PCR de BORD en el «Inventory Block» (administrador de inventarios) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar/revisar las gradillas de puntas en el «Inventory Area» (área del inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cargar los cartuchos «PCR Cassette», la probeta de BORD Positive Control y la probeta de Negative Control siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
13. Cerrar la puerta del instrumento.
14. Pulsar «Start» (Inicio) para iniciar la sesión.

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

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

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

Nota: la **PCR Mix** puede conservarse en el bloque refrigerado durante un máximo de 7 sesiones de trabajo de 3 horas cada una.

Revisión y aprobación de los resultados

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

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

El sistema **ELITE InGenius** genera los resultados con el producto **Bordetella ELITE MGB® Kit** mediante el siguiente procedimiento:

- A. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación
- B. Validación de los resultados de las muestras.
- C. Generación del informe de resultados de la muestra.

A. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación

El instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los genes patógenos (canales **IS481**, **BP**, **BH** y **BPP**) en la reacción de amplificación del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros incluidos en los Assay Protocols (protocolos de ensayo) BORD ELITE_PC y BORD ELITE_NC.

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

El software del instrumento utiliza los resultados de las sesiones de amplificación del Positive Control y del Negative Control para configurar los gráficos de control («Control Charts»), lo que permite controlar el rendimiento del paso de amplificación. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento.

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

Nota: si el Positive Control o el Negative Control se procesan junto con las muestras que van a analizarse y el resultado no es válido, se invalida la sesión entera. En este caso, también es necesario repetir la amplificación de todas las muestras.

B. Validación de los resultados de la muestra

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los genes patógenos (canales **IS481**, **BP**, **BH** y **BPP**) y por la sonda del Internal Control (canal **IC**) en las reacciones de amplificación de la muestra utilizando los parámetros incluidos en el Assay Protocol (protocolo de ensayo) BORD-R ELITE_NPA_200_100.

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

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

1) Positive Control	Estado
BORD Positive Control	APROBADO
2) Negative Control	Estado
BORD Negative Control	APROBADO

Por cada muestra, el sistema interpreta automáticamente el resultado del ensayo según el algoritmo del **ELITE InGenius Software** y los parámetros del Assay Protocol (protocolo de ensayo).

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

En la tabla siguiente se muestran los posibles mensajes de los resultados. Para cada muestra, el sistema muestra una combinación de los siguientes mensajes, donde se especifica si el ADN de los patógenos se ha detectado o no.

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
IS481: DNA detected.	El ADN de <i>B. pertussis</i> o de <i>B. holmesii</i> (IS481) se ha detectado en la muestra. Nota: si se detecta ADN de IS481, también podrían tipificarse <i>B. pertussis</i> (BP) o <i>B. holmesii</i> (BH).
IS481: DNA detected other related species.	Se ha detectado ADN similar a IS481 de un microorganismo imprevisto en la muestra.
IS481: DNA not detected or below LoD.	El ADN de <i>B. pertussis</i> o <i>B. holmesii</i> (IS481) no se ha detectado en la muestra. La muestra es negativa para estos patógenos o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
BP: typing positive.	El ADN de <i>B. pertussis</i> se ha detectado en la muestra. Nota: si se detecta la diana BP, también debe detectarse la diana de IS481.
BP: typing not feasible.	Esta diana específica de <i>B. pertussis</i> no se ha detectado en la muestra. Compruebe también los resultados de la diana de IS481.
BH: typing positive.	El ADN de <i>B. holmesii</i> se ha detectado en la muestra. Nota: si se detecta la diana BH, también debe detectarse la diana de IS481.
BH: typing not feasible.	Esta diana específica de <i>B. holmesii</i> no se ha detectado en la muestra. Compruebe también los resultados de la diana de IS481.
BPP: DNA detected.	El ADN de <i>B. parapertussis</i> se ha detectado en la muestra.
BPP: DNA not detected or below LoD.	El ADN de <i>B. parapertussis</i> no se ha detectado en la muestra. La muestra es negativa para este patógeno o su concentración está por debajo del límite de detección del ensayo.
Invalid - Retest Sample.	Resultado no válido del ensayo debido a un error en el Internal Control, como una extracción incorrecta o un arrastre de inhibidores. Es necesario repetir la prueba.

Las muestras que el **software ELITE InGenius** notifica 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 debido a problemas en el paso de amplificación o de extracción (degradación del ADN, pérdida de este durante la extracción o arrastre de inhibidores en el eluido), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Si el volumen del eluido es suficiente, la muestra extraída puede volver a analizarse 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 alícuota en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Las muestras que se notifican como «IS481: DNA Not Detected or below LoD» o «BPP DNA Not Detected or below LoD» son aptas para el análisis, pero no ha sido posible detectar el ADN de las dianas. En este caso, no puede descartarse que los ADN diana estén presentes en una concentración inferior al límite de detección del ensayo (consultar el apartado «Características de rendimiento»).

Las muestras que se notifican como «IS481: DNA detected other related species» (IS481: ADN detectado de otras especies relacionadas) son aptas para el análisis y se ha detectado ADN similar a IS481 de un microorganismo imprevisto en la muestra. En este caso, la muestra se notifica como positiva para la diana de IS481, pero no se ha detectado en la muestra ADN de la diana específica de *B. holmesii* (BH) ni ADN de la diana específica de *B. pertussis* (BP).

Cuando se detecta ADN del gen multicopia IS481, en las muestras con un resultado positivo bajo, puede que no sea posible detectar el ADN de la diana específica *B. pertussis* (BP) o el ADN de la diana específica *B. holmesii* (BH), lo que puede deberse a la existencia de diferencias en el número de copia de los genes de la diana específica (p. ej., el promotor del gen *ptxA* está presente en una sola copia de BP y el promotor del gen *recA*, en una sola copia de BH). No obstante, la muestra es positiva para *B. pertussis* o

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

para *B. holmesii*, pero la identificación no es posible.

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 que tenga la cualificación de administrador («Administrator») o analista («Analyst») y siga 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».

C. Exportación de los resultados de la muestra

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 una sesión de trabajo ordenados por la muestra seleccionada (SID).

El «Track Report» muestra los detalles de una sesión de trabajo ordenados por el carril seleccionado.

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

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**Límite del blanco**

El límite del blanco (LoB) del producto **Bordetella ELITE MGB® Kit** se determinó analizando muestras de aspirados nasofaríngeos (ANF) en el instrumento ELITE InGenius.

El LoB se verificó analizando un panel de 60 muestras clínicas de ANF que resultaron ser negativas para la diana de IS481 (*B. pertussis* y *B. holmesii*) y para IS1001 (*B. parapertussis*) utilizando el método de cultivo y un ensayo comercial para diagnóstico *in vitro* con marcado CE en el laboratorio externo. Las muestras se procesaron en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR». Dada su alta sensibilidad analítica, el LoB se definió aplicando un valor de corte Ct igual a 40 para la diana de IS481 (*B. pertussis* y *B. holmesii*) y para la diana BPP (IS1001, *B. parapertussis*) con el fin de obtener el 95 % de resultados negativos.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

B. pertussis/B. holmesii (diana de IS481)				
Matriz	N	Positivas	Negativas	% de negatividad
Aspirados nasofaríngeos negativos	60	3	57	95
B. parapertussis (diana BPP)				
Matriz	N	Positivas	Negativas	% de negatividad
Aspirados nasofaríngeos negativos	60	1	59	98

Las muestras que obtuvieron un resultado positivo cuando se utilizó el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» y el sistema ELITE InGenius presentaron valores Ct altos (entre 37 y 40) y, de este modo, se encontraron presentes a concentraciones muy bajas.

Límite de detección (LoD)

El límite de detección (LoD) del producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» se definió en relación con las muestras de aspirados nasofaríngeos (ANF) y el sistema ELITE InGenius.

El LoD se calculó analizando un panel de muestras de ANF negativas enriquecidas con un material de referencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* (DSMZ, Germany) a un título conocido. Se prepararon seis niveles de dilución empezando por una concentración más alta que el valor esperado para el límite de detección. Cada nivel de dilución se procesó en 12 duplicados utilizando el instrumento **ELITE InGenius** en el modo de procesamiento «Extract + PCR» (Extracción + PCR). El límite de detección (LoD) se calculó mediante el análisis de regresión Probit de los datos como la concentración correspondiente al 95 % de probabilidad de un resultado positivo.

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Diana	LoD (ufc/mL)	Límites del intervalo de confianza del 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
<i>B. pertussis</i> (diana de IS481)	12	7	58
<i>B. parapertussis</i> (diana de IS1001)	11	6	19
<i>B. holmesii</i> (diana de IS481)	12	5	34

Eficacia de detección (inclusividad)

La eficacia de detección de diferentes cepas o colonias aisladas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos EBI ENA.

Las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores y las sondas fluorescentes se comprobaron en la alineación de las secuencias relativas a la secuencia repetida IS481 (*B. pertussis* y *B. holmesii*), al gen *ptxA* (*B. pertussis*), al gen *recA* (*B. holmesii*) y a la secuencia repetida IS1001 (*B. parapertussis*). Las regiones de hibridación presentaron conservación de la secuencia y ausencia de mutaciones importantes, por lo que cabe esperar una amplificación eficiente de todos los organismos analizados.

La eficacia de detección de diferentes cepas o colonias aisladas de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* también se verificó evaluando un panel de materiales certificados analizados a bajas

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

concentraciones (aprox. 100 copias/reacción).

Las muestras de ADN genómico certificado de Vircell Microbiologists (España), DSMZ (Alemania) y ATCC (EE. UU.) se diluyeron y analizaron por triplicado utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only».

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Inclusividad		
Microorganismos	Cepa	Resultado
<i>B. pertussis</i>	Vircell, cepa F	IS481 detectada, tipificación BP positiva
<i>B. parapertussis</i>	Vircell, CDC F5101	BPP detectada
<i>B. holmesii</i>	Vircell, colonia clínica aislada	IS481 detectada, tipificación BH positiva
<i>B. pertussis</i>	DSMZ, colonia clínica aislada	IS481 detectada, tipificación BP positiva
<i>B. parapertussis</i>	DSMZ, colonia clínica aislada	BPP detectada
<i>B. holmesii</i>	DSMZ, colonia clínica aislada	IS481 detectada, tipificación BH positiva
<i>B. pertussis</i>	ATCC, Tohama I	IS481 detectada, tipificación BP positiva
<i>B. parapertussis</i>	ATCC, 12822	BPP detectada

Todas las muestras analizadas fueron detectadas como positivas para el patógeno correcto cuando se utilizó el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit».

Marcadores potencialmente interferentes (reactividad cruzada)

La reactividad cruzada potencial con otros microorganismos no deseados encontrados en las muestras respiratorias del producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos EBI ENA.

El análisis no presentó ninguna homología reseñable para las dianas con la mayor parte de los microorganismos imprevistos (virus, bacterias, protozoos y hongos), por lo que no cabe esperar reactividad cruzada. No obstante, se observaron homologías reseñables y posibles interferencias con algunas cepas de *B. hinzii*, *B. bronchialis* y *B. bronchiseptica* para la detección de IS481, con algunas cepas de *B. petrii* para la detección de *recA* y con *Achromobacter denitrificans* para la detección de IS1001.

La reactividad cruzada con otros microorganismos encontrados en las muestras respiratorias también se verificó analizando un panel certificado de ADN genómico y de ARN de ATCC (EE. UU.).

Las muestras de ADN genómico se analizaron por triplicado para cada marcador potencialmente interferente utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only».

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada		
Microorganismos	Cepa	Resultado
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC, RB50	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Chlamydomyxa pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Colonia clínica aislada	Negativo, sin reactividad cruzada
CMV	ATCC, AD-169	Negativo, sin reactividad cruzada
Enterovirus	ATCC, Pesascek	Negativo, sin reactividad cruzada
ADV	ATCC, Adenoid 6	Negativo, sin reactividad cruzada
FluA	ATCC, A/PR/8/34	Negativo, sin reactividad cruzada

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

Marcadores potencialmente interferentes: reactividad cruzada		
Microorganismos	Cepa	Resultado
FluB	ATCC, B/Florida/4/2006	Negativo, sin reactividad cruzada
VRS	ATCC, A2	Negativo, sin reactividad cruzada
<i>Bordetella petrii</i>	DSMZ, DSM 12804	Negativo, sin reactividad cruzada*
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, REF504	Negativo, sin reactividad cruzada**
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, REF505	Negativo, sin reactividad cruzada*
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, BORD1836	Negativo, sin reactividad cruzada**
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, BUR-15-132	Negativo, sin reactividad cruzada**
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, BUR-19-174	Negativo, sin reactividad cruzada**

Ninguno de los principales microorganismos potencialmente interferentes analizados presentó reactividad cruzada para las dianas cuando se utilizó el producto **Bordetella ELITE MGB Kit**.

Según el análisis secuencial, algunas cepas de *Bordetella petrii* (*) fueron positivas para la diana de BH. No obstante, debido a la diferencia en la temperatura de fusión (Tm) entre el gen recA de *B. holmesii* y el gen recA de otras especies de *Bordetella*, el Assay Protocol (protocolo de ensayo) produce el resultado «Typing not feasible» (Tipificación no viable).

Asimismo, algunas cepas de *B. petrii* (**) tienen una secuencia similar a IS481 y obtienen un resultado positivo para la diana de IS481. No obstante, debido a la diferencia en la Tm entre la IS481 de *B. pertussis*, *B. holmesii* y la parte similar a IS481 de otras especies de *Bordetella*, el Assay Protocol (protocolo de ensayo) da lugar al resultado «Other related species» (Otras especies relacionadas).

Marcadores potencialmente interferentes (inhibición)

La ausencia de inhibición debido a otros microorganismos no deseados encontrados en las muestras respiratorias se verificó analizando un panel de ADN y ARN genómico certificado de ATCC.

Las muestras de ADN y ARN genómico a altas concentraciones (aproximadamente 100.000 copias por reacción) se enriquecieron mediante ADN genómico de *B. pertussis* o *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ) a bajas concentraciones (aproximadamente 100 copias por reacción) y se analizaron por triplicado para cada marcador potencialmente interferente utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only».

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Marcadores potencialmente interferentes: inhibición		
Microorganismos	Cepa	Resultado
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Positivo, sin inhibición
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Positivo, sin inhibición
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Positivo, sin inhibición
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Positivo, sin inhibición
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC, RB50	Positivo, sin inhibición
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Positivo, sin inhibición
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Positivo, sin inhibición
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Positivo, sin inhibición
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Positivo, sin inhibición
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Positivo, sin inhibición
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Colonia clínica aislada	Positivo, sin inhibición
CMV	ATCC, AD-169	Positivo, sin inhibición
Enterovirus	ATCC, Pesascek	Positivo, sin inhibición
ADV	ATCC, Adenoid 6	Positivo, sin inhibición
FluA	ATCC, A/PR/8/34	Positivo, sin inhibición
FluB	ATCC, B/Florida/4/2006	Positivo, sin inhibición
VRS	ATCC, A2	Positivo, sin inhibición
<i>Bordetella petrii</i>	DSMZ, DSM 12804	Positivo, sin inhibición
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, REF504	Positivo, sin inhibición
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, REF505	Positivo, sin inhibición
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, BORD1836	Positivo, sin inhibición
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, BUR-15-132	Positivo, sin inhibición
<i>Bordetella petrii</i>	aislado clínico, BUR-19-174	Positivo, sin inhibición

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

Todos los patógenos de interés se detectaron correctamente en presencia de los microorganismos potencialmente interferentes mencionados anteriormente cuando se analizaron con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit».

Interferencia potencial entre dianas

La interferencia potencial entre dianas del producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» se evaluó mediante un análisis de coamplificación de materiales de referencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* (ATCC) y *B. holmesii* (DMSZ).

El panel incluyó muestras con ADN genómicos de *B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* a altas concentraciones (10⁵ copias/reacción) y de los otros patógenos de interés a bajas concentraciones (10³, 10², 10 copias/reacción).

Cada condición se analizó por triplicado utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «PCR Only».

Los resultados finales se muestran en la siguiente tabla.

Interferencia potencial entre dianas			
Diana analizada	Diana interferente (aprox. 10 ⁵ copias/reacción)		
	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
<i>B. pertussis</i> (IS481)	-	10 copias/reacción	-
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	10 copias/reacción	-	100 copias/reacción
<i>B. holmesii</i> (IS481)	-	10 copias/reacción	-

B. pertussis, *B. parapertussis* y *B. holmesii* se detectaron con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» a concentraciones de al menos 10 copias/reacción, incluso en presencia de otros patógenos de interés a altas concentraciones. En el caso de 10⁵ copias/reacción de *B. holmesii*, *B. parapertussis* se detectó a una concentración de al menos 100 copias/reacción.

B. pertussis se tipificó con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» a una concentración de al menos 10 copias/reacción en presencia de *B. parapertussis* a altas concentraciones y a una concentración de al menos 2000 copias/reacción en presencia de *B. holmesii* a altas concentraciones.

B. holmesii se tipificó con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» a una concentración de al menos 10 copias/reacción en presencia de *B. parapertussis* a altas concentraciones y a una concentración de al menos 1000 copias/reacción en presencia de *B. pertussis* a altas concentraciones.

Sustancias interferentes

Un panel de sustancias potencialmente interferentes a las concentraciones pertinentes más altas se analizó con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit». Las sustancias analizadas fueron mucina, sangre humana, el antibiótico azitromicina, el corticoide beclometasona, el antihistamínico ebastina y el mucolítico hidrocloruro de ambroxol.

Las sustancias se añadieron individualmente a muestras de aspirados nasofaríngeos enriquecidas con el material de referencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ) a concentraciones de 3 veces el LoD. Las muestras se procesaron en 3 duplicados utilizando el sistema ELITE InGenius® en el modo de procesamiento «Extraction + PCR».

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Sustancias interferentes				
Sustancia	Concentración	Pos./Dup.		
		<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>
Mucina	1 % m/v (10 mg/mL)	3/3	3/3	3/3
Sangre	10% v/v	3/3	3/3	3/3
Azitromicina	0,2 µg/mL	3/3	3/3	3/3
Beclometasona	64 ng/mL	3/3	3/3	3/3
Ebastina	0,4 µg/mL	3/3	3/3	3/3
Ambroxol	0,6 µg/mL	3/3	3/3	3/3

Ninguna de las sustancias analizadas a las concentraciones analizadas interfirieron con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit».

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» junto con el sistema ELITE InGenius se evaluó analizando un panel de tres muestras de aspirados nasofaríngeos enriquecidas con los materiales de referencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ) a concentraciones de 3 veces el LoD.

Los resultados de repetibilidad se obtuvieron analizando tres duplicados en dos sesiones al día con el mismo lote de producto, en el mismo instrumento y con el mismo operador. Los resultados se analizaron para el mismo lote de producto (repetibilidad dentro de una misma sesión) y para los tres lotes de producto distintos (repetibilidad entre lotes). Las muestras se procesaron utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los valores Ct de cada diana y de la diana del control interno (IC2) se utilizaron para calcular el coeficiente de variabilidad porcentual (%CV), con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión.

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

Repetibilidad dentro de una misma sesión				
Diana	N	Ct medio	Desv. est.	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	6	36,14	0,34	0,95
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	6	34,70	0,37	1,08
<i>B. holmesii</i> (IS481)	6	36,02	0,27	0,75
Internal Control	24	28,77	0,25	0,88

Repetibilidad entre lotes				
Diana	N	Ct medio	Desv. est.	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	18	36,66	0,95	2,60
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	18	34,89	0,64	1,82
<i>B. holmesii</i> (IS481)	18	36,23	0,75	2,08
Internal Control	72	28,58	0,33	1,15

La repetibilidad del producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» para cada diana presentó un %CV inferior al 3 %.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» junto con el sistema ELITE InGenius se evaluó analizando un panel de tres muestras de aspirados nasofaríngeos enriquecidas con el material de referencia de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* (DSMZ) a concentraciones de 3 veces el LoD.

Los resultados de reproducibilidad se analizaron en tres duplicados en dos sesiones al día. Se analizaron tres lotes diferentes de producto en tres días distintos, en tres instrumentos distintos y con tres operadores distintos.

Las muestras se procesaron en el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los valores Ct de cada diana y de la diana del control interno (IC2) se utilizaron para calcular el coeficiente de variabilidad porcentual (%CV), con el fin de evaluar la reproducibilidad como imprecisión.

A continuación se muestra un resumen de los resultados.

Reproducibilidad entre instrumentos				
Diana	N	Ct medio	Desv. est.	%CV
<i>B. pertussis</i> (IS481)	18	36,48	0,86	2,35
<i>B. parapertussis</i> (IS1001)	18	34,80	0,68	1,95
<i>B. holmesii</i> (IS481)	18	36,23	0,85	2,34
Internal Control	72	28,06	0,48	1,72

La reproducibilidad del producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» para cada diana presentó un %CV inferior al 3 %.

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando muestras clínicas de aspirados nasofaríngeos positivas para *B. pertussis* y enriquecidas con material certificado de *B. parapertussis* o *B. holmesii* (DSMZ). Las muestras positivas y las muestras negativas utilizadas para el enriquecimiento se certificaron utilizando el método de cultivo y un ensayo comercial para diagnóstico *in vitro* con marcado CE en el laboratorio externo. Las muestras artificiales de *B.*

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

parapertussis y *B. holmesii* se enriquecieron a concentraciones de 30 veces, 10 veces, y 3 veces el LoD.

Las muestras se recogieron tal como se describe en el apartado «Muestras y controles» y se analizaron con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas	No válida	% de sensibilidad diagnóstica
Aspirados nasofaríngeos positivos para <i>B. pertussis</i>	26	24	0	2	100 %
Aspirados nasofaríngeos enriquecidos con <i>B. parapertussis</i>	30	30	0	0	100 %
Aspirados nasofaríngeos enriquecidos con <i>B. holmesii</i>	30	30	0	0	100 %

En la prueba, 24 de 26 muestras de aspirados nasofaríngeos positivas para *B. pertussis* se confirmaron como positivas. Dos muestras resultaron ser no válidas y se excluyeron del análisis.

En la prueba todas las muestras de aspirados nasofaríngeos enriquecidas con *B. parapertussis* y *B. holmesii* se confirmaron como positivas.

En esta prueba, la sensibilidad diagnóstica del ensayo para *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* fue del 100 % en relación con las muestras de aspirados nasofaríngeos.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, como confirmación de las muestras clínicas negativas, se evaluó analizando muestras clínicas de aspirados nasofaríngeos certificadas negativas para *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* utilizando el método de cultivo y un ensayo comercial para diagnóstico *in vitro* con marcado CE en el laboratorio externo.

Las muestras se recogieron tal como se describe en el apartado «Muestras y controles» y se analizaron con el producto «Bordetella ELITE MGB® Kit» y el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas	No válida	% de especificidad diagnóstica
Aspirados nasofaríngeos negativos para <i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	60	0	59	1	100 %
Aspirados nasofaríngeos negativos para <i>B. parapertussis</i>	86	1	82	3	98,8 %

En la prueba, 59 de 60 muestras de aspirados nasofaríngeos positivas para *B. pertussis*/*B. holmesii* se confirmaron como válidas y negativas. Una muestra resultó ser no válida y se excluyó del análisis.

En la prueba, 82 de 86 muestras de aspirados nasofaríngeos negativas para *B. parapertussis* se confirmaron como válidas y negativas. Tres muestras resultaron ser no válidas y se excluyeron del análisis. Una muestra presentó un resultado positivo diferente del resto.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo para *B. pertussis*/*B. holmesii* fue del 100 % en relación con las muestras de aspirados nasofaríngeos.

En esta prueba, la especificidad diagnóstica del ensayo para *B. parapertussis* fue del 98,8 % en relación con las muestras de aspirados nasofaríngeos.

Nota: Los datos y resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y el instrumento se encuentran registrados en el archivo de documentación técnica del producto «Bordetella ELITE MGB® Kit», FTP 140ING.

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

BIBLIOGRAFÍA

- U. Reischl et al. (2001) J Clin Microbiol. 39: 1963–1966.
 N. K. Fry et al. (2009) J Med Microbiol. 58: 1023-9.
 A. Van der Zee (1993) J Bacteriol. 175: 141-7.
 J. J. Germer et al. (2010) J Clin Microbiol. 48: 1435-7
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**Este producto está diseñado para uso exclusivo in vitro.**

Utilizar este producto solo con muestras clínicas de aspirados nasofaríngeos.

En la actualidad, no se dispone de datos acerca del rendimiento de este producto con las siguientes muestras clínicas: exudados nasofaríngeos, esputo, lavado broncoalveolar (LBA), aspirado bronquial.

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

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

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

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

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de áreas independientes para la prueba de biología molecular y la prueba de cultivo microbiológico.

Con el fin de evitar resultados falsos positivos, este producto requiere el uso de ropa de trabajo específica para laboratorio e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate

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

Un resultado negativo obtenido con este producto indica que el ADN de la diana no se ha detectado en el ADN extraído de la muestra. No obstante, no puede descartarse que el ADN de la diana tenga un título inferior al límite de detección del producto (consultar el apartado «Características de rendimiento»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

En el caso de producirse una infección simultánea, la sensibilidad de una diana puede verse afectada por la amplificación de una segunda diana (consultar la sección «Características de rendimiento»).

En algunos casos, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii* y *B. bronchialis* pueden contener las secuencias repetidas de IS481, por lo que pueden generar resultados positivos para esta diana.

En algunos casos, *B. bronchiseptica* y *Achromobacter denitrificans* pueden contener las secuencias repetidas de IS1001, por lo que pueden generar resultados positivos para la diana de BPP.

En ocasiones, los resultados obtenidos con este producto pueden ser no válidos debido a un error del Internal Control. En este caso, la muestra debe volver a analizarse a partir del paso de extracción, lo que puede provocar retrasos a la hora de obtener los resultados finales.

Asimismo, los posibles polimorfismos existentes en la región del ADN de la diana cubierto por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección del ADN de la diana.

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

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, existe un riesgo residual de obtener con él resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos. Este riesgo residual no puede eliminarse ni

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

reducirse aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Reacción no válida del Positive Control	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Revisar la posición de la mezcla de PCR y del Positive Control Revisar los volúmenes de la mezcla de PCR y del Positive Control.
Degradación del Positive Control.	Utilizar una nueva alícuota del Positive Control.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Reacción no válida del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Error de configuración del instrumento.	Revisar la posición de la mezcla PCR Mix y del Negative Control. Revisar los volúmenes de la mezcla PCR Mix y del Negative Control.
Contaminación del Negative Control	Utilizar una nueva alícuota de agua para biología molecular.
Contaminación de la PCR Mix.	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Contaminación del área de extracción, de las gradillas o del «Inventory Block» (administrador de inventarios).	Limpiar las superficies con detergentes acuosos, lavar las batas y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Reacción no válida de la muestra	
Posibles causas	Soluciones
Error en la configuración de la sesión.	Comprobar la posición de la PCR Mix y la de la muestra. Comprobar el volumen de la PCR Mix y el de la muestra.
Degradación del Internal Control.	Utilizar nuevas alícuotas del Internal Control.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
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 con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

Tasa anormalmente alta de resultados positivos dentro de la misma sesión (reacciones con valores Ct tardíos similares) Posibles causas Soluciones

Posibles causas	Soluciones
Contaminación entre muestras durante los pasos preanalíticos.	Evitar cualquier contacto entre la micropipeta y la pared de la probeta. Limpiar la micropipeta con solución de hipoclorito de sodio al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN después de pipetear cada muestra. No utilizar pipetas de Pasteur. Las pipetas deben ser del tipo de desplazamiento positivo o utilizarse con puntas con filtro para aerosoles. Introducir las muestras en las últimas posiciones de los instrumentos, tal como se indica en la interfaz del ELITE InGenius Software. Seguir la secuencia de carga indicada por el software.
Contaminación medioambiental en el laboratorio	Limpiar todas las superficies que están en contacto con el operador y las muestras (inclusive las pipetas) con solución de hipoclorito de sodio al 3 % reciente o limpiador de ADN/ARN. Realizar un ciclo de descontaminación con radiación UV. Utilizar una nueva probeta de la mezcla de PCR.

Error 30103

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: - Seleccionar el carril relativo a la muestra y aprobar manualmente el resultado. Si se necesita un valor de Ct, 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 primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Error de TH

Posibles causas	Soluciones
Muestra con una forma anómala en el gráfico.	Si se observa una amplificación notable en el punto de referencia negativo del gráfico de PCR: - 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 primaria en una sesión en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

SÍMBOLOS

Número de catálogo.



Límite superior de temperatura



Código de lote.



Fecha de caducidad (último día del mes)

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

Contenido suficiente para «N» análisis.



Atención: consultar las instrucciones de uso.



Contenido.



Manténgase fuera de la luz del sol

Fabricante.

Bordetella ELITE MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTS140ING

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. La compra de este producto incluye derechos limitados, no transferibles para usar únicamente esta cantidad de producto exclusivamente para las actividades del comprador directamente relacionadas con el diagnóstico humano. Para obtener información sobre la compra de una licencia de este producto para fines distintos de los establecidos anteriormente, contactar con Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Teléfono: +1 (760) 603-7200. Fax: +1 (760) 602-6500. Correo electrónico: outlicensing@thermofisher.com.

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

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