ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALY
Offices: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E. mail: emd.support@elitechgroup.com
WEB site: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 20/08/2024

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«Coagulation ELITe MGB® Kit»
Ref. RTSD00ING

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

- *Update for compliance with the Regulation (EU) 2017/746 on in vitro diagnostic medical devices (IVDR) requirements and update of the Intended use, accordingly.*

- ***NOTE:*** *Composition and PERFORMANCE CHARACTERISTICS of the product remain unchanged.*

- ***NOTE:*** *The product lots reported into the table below are still placed on the market as per IVDD (98/79/EC) until expiration dates, according to Article 110 of IVDR. If you're using these product lots, the related IFU revision, NOT available anymore on the website, can be requested by contacting ELITechGroup staff.*

PRODUCT REF	Lot Number	Expiry date
RTSD00ING	U1123-091	31/08/2025
RTSD00ING	U0524-050	31/07/2025

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTA IFU NON È COMPATIBILE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVISION OF THIS IFU IS NOT COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	LA RÉVISION DE CETTE IFU N'EST PAS COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRÉCÉDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU NO ES COMPATIBLE CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU NÃO ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST NICHT KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS

ELITechGroup
EMPOWERING IVD

ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Turín (Italia)
Sede: Tel. +39-011 976 191 - Fax +39-011 936 76 11
Correo electrónico: emd.support@elitechgroup.com
Página web: www.elitechgroup.com

Coagulation ELITe MGB® Kit

Reactivo para la amplificación de ADN en tiempo real

REF RTSD00ING

UDI 08033891486204

CE 0123 IVD

−20 °

ÍNDICE

USO PREVISTO	página 1
PRINCIPIOS DEL ENSAYO	página 2
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	página 2
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
ELITe InGenius	página 5
MUESTRAS Y CONTROLES	página 5
PROCEDIMIENTO	página 6
ELITe BeGenius	página 12
MUESTRAS Y CONTROLES	página 12
PROCEDIMIENTO	página 13
CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL ELITe InGenius y DEL ELITe BeGenius	página 18
BIBLIOGRAFÍA	página 26
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	página 26
PROBLEMAS Y SOLUCIONES	página 27
SÍMBOLOS	página 28
NOTA PARA LOS USUARIOS	página 29
AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA	página 29
ANEXO	página A

USO PREVISTO

El producto **Coagulation ELITe MGB® Kit** es un producto sanitario para diagnóstico *in vitro* destinado al uso por parte de profesionales sanitarios como ensayo cualitativo de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real para la distinción de los alelos de los tres locus siguientes en muestras de ADN genómico humano extraído de muestras clínicas:

- Gen del factor V de la coagulación (Leiden), polimorfismo mononucleotídico (SNP) G1691A
- Gen del factor II de la coagulación, SNP G20210A.
- Gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), SNP C677T.

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

El producto está concebido para su uso como ayuda a la hora de evaluar el riesgo de sufrir una trombosis venosa profunda en pacientes en los que se sospecha la presencia de algún trastorno de la coagulación y de un riesgo elevado de desarrollar una trombosis venosa profunda.

Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta todas las observaciones clínicas y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo consiste en la realización de una PCR cualitativa en tiempo real con el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius**, dos sistemas integrados y automatizados para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, así como para la interpretación de los resultados.

A partir del ADN genómico extraído de las muestras que se están analizando, en el PCR Cassette se realizan tres reacciones de amplificación específicas para los tres genes humanos que codifican las dianas de interés, así como una reacción de amplificación específica para el Internal Control (como comprobación de la idoneidad de la muestra):

- Factor V (Leiden), región del SNP G1691A, detectada mediante una sonda específica marcada con el fluoróforo AP639 en el canal **«FV»** del instrumento.
- Factor II, región del SNP G20210A, detectada mediante una sonda específica marcada con el fluoróforo FAM en el canal **«FII»** del instrumento.
- MTHFR, región del SNP C677T, detectada mediante una sonda específica marcada con el fluoróforo AP593 en el canal **«MTHFR»** del instrumento.
- Internal Control, región del gen de la globina beta humana, que se detecta mediante una sonda marcada con el fluoróforo AP525 en el canal **«IC»** del instrumento.

Las sondas que cuentan con la tecnología ELITe MGB® se activan cuando se hibridan con el producto específico de la reacción de amplificación. El **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** controlan el aumento de fluorescencia y calculan los ciclos umbral (Ct).

Al finalizar el ciclo de amplificación, el análisis de la curva de fusión permite identificar las temperaturas de fusión de las sondas, así como detectar la presencia de alelos sin mutar o mutados.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto **Coagulation ELITe MGB Kit** incluye el componente **52M PCR Mix**, una mezcla completa para la amplificación en tiempo real **lista para el uso** y **distribuida en ocho probetas**. Cada probeta contiene **280 µL** de solución y es suficiente para **12 análisis en el ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** cuando se procesan al menos 2 muestras en cada sesión.

La mezcla **52M PCR Mix** contiene los cebadores y las sondas específicos para:

- El gen del factor V de la coagulación, región del SNP G1691A (Leiden). La sonda se marca con el fluoróforo AP639, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una molécula no fluorescente.
- Gen del factor II de la coagulación, región del SNP G20210A. La sonda se marca con el fluoróforo FAM, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una molécula no fluorescente.
- Gen de la MTHFR, región del SNP C677T. La sonda se marca con el fluoróforo AP593, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante una molécula no fluorescente.
- IC, región del gen humano que codifica la beta globina. La sonda se marca con el fluoróforo AP525, se estabiliza con el grupo MGB® y se inactiva mediante un inhibidor no fluorescente.

La mezcla **52M PCR Mix** también contiene solución tampón, cloruro de magnesio, nucleótidos-trifosfatos y la enzima ADN polimerasa con activación térmica («hot-start»).

El producto es suficiente para realizar **96 análisis** con el **ELITe InGenius** y el **ELITe BeGenius** si se utilizan 20 µL en cada reacción.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligros
52M PCR Mix	Mezcla completa de reacción	**8×280 µL**	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitador vórtex.
- Microcentrifugadora de mesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosol o de dispensación positiva (0,5–10 µL, 2−20 µL, 5–50 µL, 50−200 µL, 200–1000 µL).
- Agua para biología molecular.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Este producto **no** incluye los reactivos para la extracción de ADN de las muestras que van a analizarse, ni tampoco el Positive Control de amplificación ni los consumibles.

Para el análisis automático de las muestras con el **ELITe InGenius** (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030) o el **ELITe BeGenius** (EG SpA, ref. INT040), se necesitan los siguientes productos genéricos:
- cartuchos de extracción **ELITe InGenius® SP 200** (EG SpA, Ref. INT032SP200),
- consumibles para extracción **ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set** (EG SpA, Ref. INT032CS),
- **ELITe InGenius® Waste Box** (EG SpA, ref. F2102-000),
- **ELITe InGenius® PCR Cassette** (EG SpA, Ref. INT035PCR),
- puntas **300 µL Filter Tips Axygen** (Corning Life Science, ref. TF-350-L-R-S) para el **ELITe InGenius**,
- **1000 µL Filter Tips Tecan** (Tecan, ref. 30180118), para el **ELITe BeGenius**.

Para la extracción automática de ácidos nucleicos, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras con el instrumento **ELITe InGenius**, es necesario utilizar los siguientes protocolos de ensayo (Assay Protocols) específicos:
- parámetros para la amplificación del Positive Control **52M ELITe_PC**,
- parámetros para la amplificación del Negative Control **52M ELITe_NC**,
- parámetros para las muestras que van a analizarse **52M ELITe_WB_200_200**.

Para la extracción automática de ácidos nucleicos, la PCR en tiempo real y la interpretación de los resultados de las muestras con el instrumento **ELITe BeGenius**, es necesario utilizar los siguientes protocolos de ensayo (Assay Protocols) específicos:
- parámetros para la amplificación del Positive Control **52M ELITe_Be_PC**,
- parámetros para la amplificación del Negative Control **52M ELITe_Be_NC**,
- parámetros para las muestras que van a analizarse **52M ELITe_Be_WB_200_200**.

Como plantilla para la amplificación del Positive Control, es necesario utilizar el producto específico **«Coagulation - ELITe Positive Control»** (EG SpA, ref. CTRD00ING). Se trata de una solución estabilizada que contiene ADN plasmídicos.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

Advertencias y precauciones generales

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

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.

Los reactivos deben manipularse bajo una campana de flujo laminar. Las pipetas utilizadas para manipular los reactivos deben ser destinadas exclusivamente a dicho propósito. Las pipetas deben ser del tipo de dispensación positiva o ser utilizadas con puntas con filtro para aerosoles. Las puntas utilizadas deben ser estériles y no deben contener desoxirribonucleasas ni ribonucleasas, ni tampoco ADN ni ARN.

Con el fin de evitar el riesgo de contaminación, los productos de 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.

Los cartuchos PCR Cassette deben manipularse evitando en lo posible la dispersión del producto de amplificación al entorno para que las muestras y los reactivos no se contaminen.

Advertencias y precauciones específicas para los componentes:

La mezcla **52M PCR Mix** debe conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior y en un lugar protegido de la luz.
La mezcla **52M PCR Mix** debe utilizarse en el plazo de un mes una vez abierta.
La mezcla **52M PCR Mix** puede congelarse y descongelarse un máximo de **siete veces**: más ciclos de congelación/descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

La mezcla **52M PCR Mix** puede mantenerse en el bloque refrigerado de la «Inventory Area» (área del inventario) del ELITe InGenius o en la unidad de refrigeración del ELITe BeGenius durante un máximo de **siete sesiones independientes de tres horas cada una** (modo de procesamiento «Extract + PCR»), o durante 2 sesiones de 3 horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR») y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión (7 horas en total). 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 muestras de 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 o a −70 °C, o a una temperatura inferior, durante un máximo de 30 días. Si bien se permiten períodos de conservación más largos a −70 °C o a una temperatura inferior, tal como se ha documentado en numerosas publicaciones científicas, el usuario final de este producto debe realizar una evaluación interna específica para su aplicación.

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

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de muestras de sangre se realiza con el **ELITe InGenius** y la versión 1.2 del ELITe InGenius software (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de ensayo (Assay Protocol) **52M ELITe_WB_200_200**, que procesa 200 µL de muestra y eluye los ácidos nucleicos en 200 µL. Cuando se utiliza una probeta primaria (13×7,5 mm), el volumen de la muestra debe ser de al menos 2,2 mL.

Otras muestras

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: saliva

Sustancias interferentes

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias interferentes» del capítulo «Rendimiento diagnóstico».

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 análisis:

- Como Positive Control de amplificación, utilizar el producto **Coagulation - ELITe Positive Control** (no incluido en este kit) junto con el protocolo **52M ELITe_PC**.
- Como Negative Control de amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit) junto con el protocolo **52M ELITe_NC**.

Nota: el ELITe InGenius necesita resultados aprobados y válidos de los controles de amplificación para cada lote de reactivos de amplificación 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 el Positive Control y el Negative Control con el lote de reactivos de amplificación.

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 del análisis de control de calidad (consultar el apartado siguiente) están fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento ELITe InGenius.

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO

El uso del producto **Coagulation ELITe MGB Kit** con el **ELITe InGenius** comprende tres pasos:

- Verificación de la disponibilidad del sistema
- Configuración de la sesión
- Revisión y aprobación 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** y seleccionar el modo de inicio de sesión **«CLOSED»**,

- Verificar que los controles de amplificación (52M Positive Control, 52M Negative Control) se hayan procesado con el lote de reactivos de amplificación que va a utilizarse, así como que se hayan aprobado y sean válidos («Status»). Si no se cuenta con controles de amplificación aprobados o válidos, procesarlos tal como se indica en los siguientes apartados.

- Seleccionar el tipo de sesión siguiendo las instrucciones de la interfaz para configurar la sesión y utilizando los protocolos de ensayo (Assay Protocols) proporcionados por EG SpA. Estos protocolos para diagnóstico *in vitro* (IVD) se han validado específicamente con los productos ELITe MGB Kit, el instrumento **ELITe InGenius** y la matriz mencionada.

En la tabla siguiente se describe el protocolo de ensayo (Assay Protocol) disponible para el análisis de las muestras con el producto **Coagulation ELITe MGB Kit**.

Protocolo de ensayo para el producto Coagulation ELITe MGB Kit			
Nombre	**Matriz**	**Informe**	**Características**
52M ELITe_WB_200_200	Sangre	Sin mutar/ heterocigoto/ homocigoto	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 200 µL Internal Control: NO Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

Si el 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 **Coagulation ELITe MGB Kit** puede utilizarse con el **ELITe InGenius** para realizar las siguientes tareas:

A. Sesión integrada (modo de procesamiento «Extract + PCR»).
B. Sesión de amplificación (modo de procesamiento «PCR Only»).
C. Sesión de 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 «servidor de información de ubicaciones» (LIS, «Location Information Server»), que permite cargar la información de la sesión. Para obtener más información, consultar las instrucciones de uso del instrumento **ELITe InGenius**.

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

A. Sesión integrada

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

1. Descongelar las muestras a temperatura ambiente (+21 °C ± 5 °C) y manipularlas de acuerdo con las directrices para laboratorios y conforme a las indicaciones de la sección «Muestras y controles»
2. Descongelar las probetas de **52M PCR Mix** necesarias para la sesión a temperatura ambiente (+21 °C ±5 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla **52M PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

3. Seleccionar «Perform Run» en la «Home» (pantalla principal).
4. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL, y «Extracted Elute Volume», a 200 µL.
5. Para cada carril deseado, rellenar el ID de la muestra («SampleID» o SID) escribiendo o escaneando el código de barras de la muestra.
6. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo (Assay Protocol) que se desea utilizar (p. ej., «52M ELITe_WB_200_200»).
7. Asegurarse de que el protocolo que se muestra en el área «Protocol» sea «Extract + PCR».
8. Seleccionar la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position».
   - 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.
9. Cargar la mezcla **52M PCR Mix** en el «Inventory Block» (bloque de inventario) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de la mezcla **52M PCR Mix**. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) de la «Inventory Area» (área de inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar los cartuchos **PCR Cassette**, así como los cartuchos de extracción **ELITe InGenius SP 200**, todos los consumibles necesarios y las muestras que deben extraerse, siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. 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 que queda en la «Elution Tube» (probeta de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior durante un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

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

Nota: La mezcla **PCR Mix** puede utilizarse para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o conservarse en el bloque refrigerado durante 2 sesiones de 3 horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR») y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión (7 horas en total). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

B Sesión de amplificación

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

1. Descongelar las probetas de **52M PCR Mix** necesarias para la sesión a temperatura ambiente (+21 °C ±5 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de consumo de reactivos (es decir, realizando al menos 2 análisis en cada sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla **52M PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Seleccionar «Perform Run» en la «Home» (pantalla principal).
3. Aunque no se vaya a realizar ninguna extracción, asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extracted Elute Volume», a 200 µL.
4. Para cada carril deseado, introducir el ID de la muestra («SampleID» o SID), ya sea rellenándolo directamente o escaneando su código de barras.
5. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo (Assay Protocol) que se desea utilizar (p. ej., «52M ELITe_WB_200_200»).
6. En la columna «Protocol», seleccionar «PCR Only».
7. Asegurarse de que la posición de carga de la muestra en la columna «Sample Position» sea «Elution Tube» (fila inferior). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
8. Cargar la mezcla **52M PCR Mix** en el «Inventory Block» (bloque de inventario) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de la mezcla **52M PCR Mix**. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) de la «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» 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 que queda en la «Elution Tube» (probeta de elución) debe extraerse del instrumento, taparse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior durante un máximo de un mes. Evitar derramar la muestra extraída.

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

Nota: la mezcla PCR Mix puede utilizarse para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o conservarse en el bloque refrigerado durante 2 sesiones de 3 horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR») y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión (7 horas en total). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

C. Sesión de amplificación para los controles positivo y negativo

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 **52M PCR Mix** necesarias para la sesión a temperatura ambiente (+21 °C ±5 °C) durante 30 minutos. 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 **52M PCR Mix** en un lugar protegido de la luz, pues este reactivo es fotosensible.
2. Descongelar la probeta **52M 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 la probeta de elución («Elution tube») incluida con el producto «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set».
4. Seleccionar «Perform Run» en la «Home» (pantalla principal).
5. En el carril deseado, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo que va a utilizarse.
6. Para el Positive Control, seleccionar en la columna «Assay» el protocolo de ensayo «52M ELITe_PC» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del Positive Control 52M.
7. Para el Negative Control, en la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo «52M ELITe_NC» y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad del agua para biología molecular.
8. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
9. Cargar la mezcla **52M PCR Mix** en el «Inventory Block» (bloque de inventario) seleccionado siguiendo las instrucciones de la interfaz y rellenar el número de lote y la fecha de caducidad de la mezcla **52M PCR Mix**. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
10. Cargar y revisar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) de la «Inventory Area» (área de inventario) seleccionada siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
11. Cargar los cartuchos **PCR Cassette**, la probeta de **52M Positive Control** y la de Negative Control siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Cerrar la puerta del instrumento.
13. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

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

Nota: al finalizar la sesión, el Positive Control que queda debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar la muestra extraída. El Negative Control que queda debe eliminarse.

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

Nota: la mezcla PCR Mix puede utilizarse para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o conservarse en el bloque refrigerado durante 2 sesiones de 3 horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR») y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión (7 horas en total). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

Revisión y aprobación de los resultados

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

Nota: el ELITe InGenius puede conectarse al servidor de información de ubicaciones (LIS, «Location Information Server»), 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 **ELITe InGenius**.

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

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

El **ELITe InGenius Software** analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los tres genes (canales **«FV»**, **«FII»** y **«MTHFR»**) y para el IC (canal **«IC»**) en las reacciones de amplificación del Positive Control y del Negative Control utilizando los parámetros incluidos en los protocolos de ensayo «52M ELITe_PC» y «52M ELITe_NC».

Los resultados del Positive Control y del Negative Control, 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 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 si estos han caducado, 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 («Control Chart») 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 el procesamiento del Positive Control y del Negative Control.

Nota: si el resultado del Positive Control o del Negative Control no es válido y se han incluido 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.

B. Validación de los resultados de las muestras

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los tres genes (canales **«FV»**, **«FII»**, **«MTHFR»**) y para el IC (canal **«IC»**) en las reacciones de amplificación de la muestra utilizando los parámetros incluidos en el protocolo de ensayo.

El **ELITe InGenius software** interpreta los resultados de la PCR para los tres genes (canales FV, FII y MTHFR) y la sonda del Internal Control (canal **«IC»**) utilizando los parámetros del protocolo de ensayo (Assay Protocol) «52M ELITe_WB_200_200».

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 tabla siguiente.

1) Positive Control	**Estado**
52M Positive Control	APROBADO
2) Negative Control	**Estado**
52M Negative Control	APROBADO

El ELITe InGenius software interpreta automáticamente los resultados de las muestras utilizando los parámetros del protocolo de ensayo (Assay Protocol). 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.

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

Resultado de la sesión de la muestra	**Interpretación**
FV: Wildtype for Factor V	La muestra tiene un genotipo **sin mutar** para el locus del SNP G1691A del factor V.
FV: Heterozygous for Factor V Leiden	La muestra tiene un genotipo **heterocigoto mutado (Leiden)** para el locus del SNP G1691A del factor V.
FV: Homozygous for Factor V Leiden	La muestra tiene un genotipo **homocigoto mutado (Leiden)** para el locus del SNP G1691A del factor V.
FII: Wildtype for Factor II	La muestra tiene un genotipo **sin mutar** para el locus del SNP G20210A del factor II.
FII: Heterozygous for Factor II 20210A	La muestra tiene un genotipo **heterocigoto mutado (20210A)** para el locus del SNP G20210A del factor II.
FII: Homozygous for Factor II 20210A	La muestra tiene un genotipo **homocigoto mutado (20210A)** para el locus del SNP G20210A del factor II.
MTHFR: Wildtype for MTHFR	La muestra tiene un genotipo **sin mutar** para el locus del SNP C677T de la MTHFR.
MTHFR: Heterozygous for MTHFR 677T	La muestra tiene un genotipo **heterocigoto mutado (677T)** para el locus del SNP C677T de la MTHFR.
MTHFR: Homozygous for MTHFR 677T	La muestra tiene un genotipo **homocigoto mutado (677T)** para el locus del SNP C677T de la MTHFR.
IC: Valid Sample	La muestra tiene un valor de Ct del IC inferior a 26,5 y es válida.
Inconclusive - Retest Sample	El resultado del ensayo **no es concluyente** debido a un problema con la muestra.
Invalid - Retest Sample	Resultado del ensayo **no válido** debido a un problema de extracción incorrecta o al arrastre de inhibidores.

Las muestras notificadas como «Inconclusive – Retest Sample» no son aptas para la interpretación de los resultados, pues no ha sido posible detectar la temperatura de fusión (Tm) de los alelos sin mutar y mutados. En este caso, el análisis de la curva de disociación no se ha llevado a cabo correctamente debido a problemas con la muestra (arrastre de inhibidores en el eluido o presencia de otros SNP interferentes), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos.

Las muestras no aptas para la interpretación de los resultados se notifican como «Invalid - Retest Sample» en el **ELITe InGenius Software** . En este caso, el ADN genómico humano de la muestra no ha podido detectarse correctamente debido a problemas en el paso de amplificación o de extracción (degradación del ADN, reducción del título de este durante la extracción, arrastre de inhibidores en el eluido o cantidad insuficiente de ADN en la muestra), 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».

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.

Note: a la hora de aprobar los resultados del ensayo, verificar siempre el resultado del instrumento consultando los gráficos de la curva de fusión que se muestran en el informe de la sesión de trabajo. Las temperaturas de fusión (Tm) de los alelos sin mutar o mutados de cada gen del análisis tienen que coincidir con los picos mostrados en los gráficos de la curva de fusión.

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. Elaboración del informe de 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 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».

ELITe BeGenius

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con muestras de 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 o a −70 °C, o a una temperatura inferior, durante un máximo de 30 días. Si bien se permiten períodos de conservación más largos a −70 °C o a una temperatura inferior, tal como se ha documentado en numerosas publicaciones científicas, el usuario final de este producto debe realizar una evaluación interna específica para su aplicación.

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

Nota: cuando la extracción de ADN a partir de muestras de sangre se realiza con el **ELITe BeGenius** y la versión 2.1.0 del ELITe BeGenius software (o versiones posteriores equivalentes), utilizar el protocolo de ensayo (Assay Protocol) **52M ELITe_Be_WB_200_200**, que procesa 200 µL de muestra y eluye los ácidos nucleicos en 200 µL. Cuando se utiliza una probeta primaria (13×75 mm, 13×100 mm o 16×100 mm), el volumen de la muestra debe ser de al menos 1,5 mL.

Otras muestras

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: saliva

Sustancias interferentes

Los datos disponibles relativos a la inhibición causada por medicamentos y otras sustancias se incluyen en la sección «Sustancias interferentes» del capítulo «Rendimiento diagnóstico».

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 análisis:

- Como Positive Control de amplificación, utilizar el producto **Coagulation - ELITe Positive Control** (no incluido en este kit) junto con el protocolo **52M ELITe_Be_PC**.
- Como Negative Control de amplificación, utilizar agua para biología molecular (no incluida en este kit) junto con el protocolo **52M ELITe_Be_NC**.

Nota: el instrumento ELITe BeGenius 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 el Positive Control y el Negative Control con el lote de reactivos de amplificación.
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 del análisis de control de calidad (consultar el apartado siguiente) están fuera de las especificaciones.
- Se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento ELITe BeGenius.

Controles de calidad

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

PROCEDIMIENTO

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

- Encender el **ELITe BeGenius** y seleccionar el modo de inicio de sesión **«CLOSED»**,
- Verificar que los controles de amplificación (52M Positive Control y 52M Negative Control) estén aprobados y sean válidos («Status») para el lote de mezcla **52M PCR Mix** que va a utilizarse. Si no se dispone de controles de amplificación válidos para el lote de mezcla **52M PCR Mix**, procesar los controles de amplificación 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 los productos «ELITe MGB Kit», el equipo **ELITe BeGenius** y la matriz mencionada.

- El protocolo de ensayo (Assay Protocol) disponible para el análisis de muestras con el producto **Coagulation ELITe MGB Kit** se describe en la tabla siguiente:

Protocolo de ensayo para el producto Coagulation ELITe MGB Kit			
Nombre	**Matriz**	**Informe**	**Características**
52M ELITe_Be_WB_200_200	Sangre	Sin mutar/ heterocigoto/ homocigoto	Volumen inicial de extracción: 200 µL Volumen del eluido de extracción 200 µL Internal Control: NO Ultrasonidos: NO Factor de dilución: 1 Volumen de la PCR Mix: 20 µL Volumen de carga de PCR de la muestra: 20 µL

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

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, llevar a cabo el procedimiento que se indica a continuación siguiendo las instrucciones de la interfaz:

1. Descongelar las muestras a temperatura ambiente (+21 °C ± 5 °C) y manipularlas de acuerdo con las directrices para laboratorios y conforme a las indicaciones de la sección «Muestras y controles»
2. Descongelar las probetas necesarias de mezcla **52M PCR Mix** a temperatura ambiente (+21 °C ± 5 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla **52M PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

3. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla principal («Home»).
4. Extraer las gradillas de la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración) y colocarlas en la mesa de preparación.
5. Seleccionar el modo de procesamiento («Run Mode») «Extract + PCR».
6. Cargar las muestras en las gradillas 5 y 4 (comenzando siempre por la gradilla 5), utilizando adaptadores en caso necesario para garantizar un ajuste apropiado.

7. Insertar la gradilla en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Hacer clic en «Next» para continuar.

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

8. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extraction Elution Volume», a 200 µL.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., 52M ELITe_Be_WB_200_200). Hacer clic en «Next» para continuar.
10. Si se utiliza la gradilla 4, repetir del paso 7 al paso 9.
11. Cargar las probetas de elución en las gradillas 3 y 2 (comenzando siempre por la gradilla 3).

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

12. Insertar la gradilla en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Hacer clic en «Next» para continuar.
13. Si se utiliza la gradilla 2, repetir el paso 12.
14. Cargar la mezcla **52M-PCR Mix** en la gradilla 1.
15. Insertar la gradilla 1 en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Hacer clic en «Next» para continuar.
16. Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) que se encuentran en la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
17. Cargar la cesta con el cartucho **PCR Cassette** en la «Inventory Area» (área del inventario) siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
18. Cargar la cesta con los cartuchos de extracción **ELITe InGenius SP 200** y los consumibles de extracción necesarios siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
19. Cerrar la puerta del instrumento.
20. 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 «Elution Tube» (probeta de elución) debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior.

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

Nota: la mezcla PCR Mix puede utilizarse para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o conservarse en el bloque refrigerado durante 2 sesiones de 3 horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR») y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión (7 horas en total). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

B Sesión de amplificación

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

1. En caso necesario, descongelar las muestras eluidas a temperatura ambiente (+21 °C ± 5 °C). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
1. Descongelar las probetas necesarias de mezcla **52M PCR Mix** a temperatura ambiente (+21 °C ± 5 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 24 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar suavemente y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla **52M PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla «Home».
3. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración) y colocarlas en la mesa de preparación.
4. Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only».
5. Cargar las muestras en las gradillas 3 y 2 (comenzando siempre por la gradilla 3).
6. Insertar la gradilla en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Hacer clic en «Next» para continuar.
7. Asegurarse de que «Extraction Input Volume» esté configurado a 200 µL y «Extraction Elution Volume», a 200 µL, incluso si no se está realizando una extracción.
8. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se desea utilizar (p. ej., «52M ELITe_Be_WB_200_200»). Hacer clic en «Next» para continuar.
9. Si se utiliza la gradilla 2, repetir del paso 7 al paso 9.
10. Cargar la mezcla **52M PCR Mix** en la gradilla 1.
11. Insertar la gradilla en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Hacer clic en «Next» para continuar.
12. Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) que se encuentran en la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
13. Cargar la cesta con el cartucho **PCR Cassette** en la «Inventory Area» (área del inventario) siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
14. Cerrar la puerta del instrumento.
15. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, 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 debe extraerse del instrumento, taparse, identificarse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar la muestra extraída.

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

Nota: la mezcla PCR Mix puede utilizarse para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o conservarse en el bloque refrigerado durante 2 sesiones de 3 horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR») y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión (7 horas en total). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

C. Sesión de amplificación para los controles positivo y negativo

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 necesarias de mezcla **52M PCR Mix** a temperatura ambiente (+21 °C ± 5 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 12 reacciones en condiciones óptimas de uso (es decir, realizando al menos 2 análisis por sesión). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.

Nota: conservar la mezcla **52M PCR Mix** en un lugar protegido de la luz mientras se descongela, pues este reactivo es fotosensible.

2. Descongelar las probetas de **52M Positive Control** a temperatura ambiente (+21 °C ± 5 °C) durante 30 minutos. Cada probeta es suficiente para 4 reacciones. Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos.
3. Verter al menos 50 µL de agua para biología molecular (como Negative Control) en una «Elution Tube» (probeta de elución), incluida en el conjunto de consumibles **ELITe InGenius SP Consumable Set**.
4. Seleccionar «Perform Run» en la pantalla principal («Home»).
5. Extraer las gradillas 1, 2, y 3 de la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración) y colocarlas en la mesa de preparación.
6. Seleccionar el modo de procesamiento «PCR Only».
7. Cargar las probetas de Positive Control y Negative Control en la gradilla 3.
8. Insertar la gradilla en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Hacer clic en «Next» para continuar.
9. En la columna «Assay», seleccionar el protocolo de ensayo que se va a utilizar («52M ELITe_Be_PC» y «52M ELITe_Be_NC»). Hacer clic en «Next» para continuar.
10. Cargar la mezcla **52M PCR Mix** en la gradilla 2.
11. Insertar la gradilla 2 en la «Cooler Unit» (unidad de refrigeración). Hacer clic en «Next» para continuar con la configuración.
12. Verificar las puntas en el área de «Tip Racks» (gradillas de puntas) que se encuentran en la «Inventory Area» (área del inventario) y, en caso necesario, sustituir la gradilla o las gradillas que corresponda. Hacer clic en «Next» para continuar.
13. Cargar la cesta con el cartucho **PCR Cassette** en la «Inventory Area» (área del inventario) siguiendo las instrucciones de la interfaz. Hacer clic en «Next» para continuar.
14. Cerrar la puerta del instrumento.
15. Pulsar «Start» para iniciar la sesión.

Una vez finalizado el proceso, 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 que queda puede extraerse del instrumento, taparse y conservarse a −20 °C o a una temperatura inferior. Evitar derramar el Positive Control.

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

Nota: la mezcla PCR Mix puede utilizarse para 7 sesiones de trabajo independientes de 3 horas cada una, o conservarse en el bloque refrigerado durante 2 sesiones de 3 horas cada una (modo de procesamiento «Extract + PCR») y durante el tiempo necesario para iniciar una tercera sesión (7 horas en total). Mezclar con cuidado y, después, centrifugar el contenido durante 5 segundos antes de iniciar la siguiente sesión.

Revisión y aprobación de los resultados

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

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

A. Validación de los resultados del Positive Control y del Negative Control de amplificación
B. Validación de los resultados de las muestras.
C. Elaboración de los informes de resultados de las muestras

Nota: para obtener más información, consultar los mismos capítulos de las instrucciones de uso del **ELITe InGenius**.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL ELITe InGenius y DEL ELITe BeGenius

Eficacia de detección (inclusividad)

La eficacia de detección de los genes del factor V, del factor II y de la MTHFR se evaluó comparando las secuencias con la base de datos de nucleótidos.

El análisis de las regiones elegidas para la hibridación de los cebadores en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

Las sondas fluorescentes permiten detectar los alelos de los genes del factor V, del factor II y de la MTHFR que se muestran en la tabla siguiente. Los límites de los intervalos de Tm relacionados para el **ELITe InGenius** se calcularon con los datos obtenidos en los estudios de verificación y validación y los intervalos de TM utilizados se muestran en la tabla siguiente. Los intervalos de Tm para el **ELITe BeGenius** se calcularon analizando los datos obtenidos en el estudio de verificación y relativos a la ampliación del uso del producto en el **ELITe BeGenius**.

Gen	Alelo detectado	Intervalo de Tm	
		ELITe InGenius	ELITe BeGenius
Factor V	Alelo 1691G (sin mutar)	53,0 °C–57,0 °C	52,5 °C–56,5 °C
	Alelo 1691A (mutado, Leiden)	61,0 °C–65,0 °C	59,5 °C–63,5 °C
Factor II	Alelo 20210G (sin mutar)	56,0 °C–61,0 °C	55,0 °C–60,0 °C
	Alelo 20210A (mutado)	64,0 °C–69,0 °C	63,0 °C–68,0 °C
MTHFR	Alelo 677C de la MTHFR (sin mutar)	55,0 °C–59,0 °C	54,0 °C–58,0 °C
	Alelo 677T de la MTHFR (mutado)	64,0 °C–68,0 °C	63,0 °C–67,0 °C

Sensibilidad analítica:

La sensibilidad analítica del producto **Coagulation ELITe MGB Kit** se definió en el **ELITe InGenius** (modo de procesamiento «PCR Only») y se verificó en el **ELITe BeGenius** (modo de procesamiento «PCR Only»).

La sensibilidad analítica permite identificar la presencia de aproximadamente 20 000 moléculas del ADN diana (correspondiente a los genomas de aproximadamente 10 000 células o aproximadamente 70 ng de ADN genómico humano) en 20 µL de ADN extraído en la reacción.

La sensibilidad analítica se verificó utilizando paneles de ADN genómico humano certificado para el factor V y el factor II (Reactivo de referencia de la OMS para el factor V Leiden, ADNg humano, Primer panel genético de referencia internacional, NIBSC, Reino Unido, código 04/224, y Reactivo de referencia de la OMS para la mutación G20210A de la protrombina, ADNg humano, Primer panel genético internacional. NIBSC, Reino Unido, código 05/130)

Las tres muestras (genotipos sin mutar, heterocigoto y homocigoto) de cada panel se evaluaron en 4 duplicados a aproximadamente 70 ng por reacción con el fin de realizar el procedimiento de amplificación y detección con el producto y los sistemas **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius**. Todos los duplicados obtuvieron un resultado válido y se determinaron correctamente.

Especificidad analítica

La especificidad analítica de este ensayo, expresada como la capacidad de no identificar como factor II mutado para el SNP G20210A el gen mutado para el SNP C20209T, se verificó utilizando un ADN plasmídico que contenía el amplicón del factor II con el nucleótido sin mutar (G) en la posición 20210 y el nucleótido mutado (T) en la posición 20209.

Se utilizó una muestra simulada que contenía aproximadamente 80 000 copias de ADN plasmídico en 24 duplicados para realizar el procedimiento de amplificación y detección con el producto y el ELITe InGenius. Todos los duplicados se determinaron correctamente: ninguna muestra mutada para el SNP C20209T del factor II obtuvo un resultado heterocigoto ni homocigoto mutado para el SNP G20210A del factor II.

Además, la especificidad analítica se verificó para los siguientes SNP poco frecuentes que se describen en las publicaciones científicas. Se trata de SNPs raros que se encuentran cerca de los SNPs de interés:

Gen	SNP raro analizado
Factor V	G1689A, C1690T, A1692C, A1696G
Factor II	A20207C, A20218G, T20219A, C20221T
MTHFR	C678A, G679A, C684G

La especificidad analítica se verificó utilizando ADN plasmídicos que contenían la región amplificada de los genes del factor V, del factor II y de la MTHFR con el nucleótido sin mutar en los SNP de interés y el nucleótido mutado en los SNP del análisis.

Se utilizaron muestras simuladas que contenían aproximadamente 80 000 copias de ADN plasmídico en 6 duplicados para realizar el procedimiento de amplificación y detección con el producto y el **ELITe InGenius**. Todos los duplicados obtuvieron un resultado «no concluyente» o se determinaron correctamente. Ninguna muestra mutada para los SNP raros del análisis obtuvo un resultado heterocigoto ni homocigoto mutado para los SNP de interés.

Los SNP que se encuentran dentro de la región de hibridación de la muestra pueden interferir en la detección del SNP de interés y dar lugar a un «falso resultado homocigoto mutado» cuando se producen junto con la mutación del SNP de interés en el otro alelo.

Microorganismos potencialmente interferentes: reactividad cruzada

La reactividad cruzada potencial con otros microorganismos que puede encontrarse en muestras clínicas de sangre se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en las bases de datos de nucleótidos.

El análisis de la región amplificada de las secuencias del producto demostró ausencia de homologías reseñables, por lo que no cabe esperar que exista una reactividad cruzada causada por microorganismos potencialmente interferentes.

Microorganismos potencialmente interferentes: inhibición

La ausencia de inhibición causada por otros microorganismos que puede encontrarse en muestras clínicas de sangre se evaluó mediante un análisis informático de las secuencias disponibles en las bases de datos de nucleótidos.

El análisis de la región amplificada de las secuencias del producto demostró ausencia de homologías reseñables, por lo que no cabe esperar que exista una inhibición causada por microorganismos potencialmente interferentes.

Sustancias interferentes

El efecto de las sustancias potencialmente interferentes se evaluó analizando una muestra de sangre recogida en EDTA, con genotipo heterocigoto para los tres genes de interés, y enriquecida con las siguientes sustancias potencialmente interferentes: bilirrubina 300 µg/mL, triglicéridos 4 mg/mL, heparina 8,3 µg/mL, 50 mM EDTA, ibuprofeno 100 µg/mL, ganciclovir 10 µg/mL, ampicilina 18 µg/mL y ciclosporina 0,3 µg/mL.

Las muestras enriquecidas con la sustancia y una muestra de referencia (no enriquecida) se utilizaron para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción y amplificación en 3 duplicados, con el producto y el **ELITe InGenius**. Todos los duplicados obtuvieron un resultado válido y su genotipo se determinó correctamente.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestra	Genotipo FV het/FII het/MTHFR het	IC Ct (corte: 26,5) Duplicados			Resultado
		1	2	3	
«Control»	3/3	22,72	22,42	22,25	Sin interferencia
Ciclosporina A	3/3	22,55	22,17	22,31	Sin interferencia
Ganciclovir	3/3	22,47	22,87	22,35	Sin interferencia
Heparina	3/3	22,31	22,67	22,31	Sin interferencia
EDTA	3/3	23,27	23,46	23,41	Sin interferencia
Ibuprofeno	3/3	24,98	23,77	23,59	Sin interferencia
Triglicéridos	3/3	23,42	24,49	24,51	Sin interferencia
Ampicilina	3/3	22,59	22,69	22,26	Sin interferencia
Bilirrubina	3/3	22,73	22,61	22,35	Sin interferencia

Repetibilidad

La repetibilidad de los resultados obtenidos con el producto **Coagulation 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 que estaba formado por 3 muestras:

- FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto (Leiden); normal para FV y normal para MTHFR;
- FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto; normal para FIIy heterocigoto para MTHFR;
- MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto; normal para FII y normal para FV

La repetibilidad dentro de las sesiones se obtuvo analizando 3 muestras del panel, todas con genotipo heterocigoto para el SNP de interés de un gen, en 8 duplicados, en una serie al día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento y en el mismo día. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorizadas en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

La repetibilidad entre sesiones se obtuvo analizando 3 muestras del panel, todas con genotipo heterocigoto para el SNP de interés de un gen, en 8 duplicados, en una serie al día, con el mismo lote de producto, con el mismo instrumento y en dos días distintos. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorizadas en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Todos los duplicados obtuvieron un resultado válido y se determinaron correctamente. La variabilidad de los resultados obtenidos se calculó como %CV de los valores de Ct del IC y del valor de Tm de los tres genes de interés.

Los resultados se resumen en las tablas siguientes.

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	8	22,07	0,41
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		8	22,91	0,76
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		8	22,02	1,22

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	8	58,19	0,207
	Factor II mutado	8	65,66	0,051
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	8	55,18	0,048
	Factor V mutado	8	62,31	0,120
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	8	56,73	0,183
	MTHFR mutada	8	65,90	0,169

Repetibilidad entre sesiones con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	16	22,12	1,12
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		16	22,91	0,75
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		16	22,10	1,36

Repetibilidad entre sesiones con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	16	58,18	0,182
	Factor II mutado	16	65,78	0,258
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	16	55,18	0,064
	Factor V mutado	16	62,31	0,116
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	16	56,73	0,211
	MTHFR mutada	16	65,96	0,257

La repetibilidad con el **ELITe InGenius** del producto **Coagulation ELITe MGB Kit** mostró valores de Ct del IC con un %CV inferior al 5 % y un valor de Tm de los tres genes de interés inferior al 5 %.

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	8	22,35	1,90
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		8	22,95	2,20
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		8	22,40	1,28

Repetibilidad dentro de las sesiones con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	8	57,64	0,392
	Factor II mutado	8	65,21	0,150
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	8	54,84	0,120
	Factor V mutado	8	61,56	0,242
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	8	56,29	0,174
	MTHFR mutada	8	65,30	0,116

Repetibilidad entre sesiones con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	16	22,26	1,58
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		16	23,10	2,02
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		16	22,45	1,75

Repetibilidad entre sesiones con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	16	57,71	0,494
	Factor II mutado	16	65,24	0,119
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	16	54,82	0,131
	Factor V mutado	16	61,60	0,218
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	16	56,29	0,273
	MTHFR mutada	16	65,28	0,099

La repetibilidad con el **ELITe BeGenius** del producto **Coagulation ELITe MGB Kit** mostró valores de Ct del IC con un %CV inferior al 5 % y un valor de Tm de los tres genes de interés inferior al 5 %.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el producto **Coagulation ELITe MGB Kit** en combinación con los instrumentos **ELITe InGenius** y **ELITe BeGenius** se evaluó analizando un panel de sangre recogida en EDTA que estaba formado por 3 muestras:

- FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto (Leiden); normal para FV y normal para MTHFR;
- FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto; normal para FIIy heterocigoto para MTHFR;
- MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto; normal para FII y normal para FV

La reproducibilidad entre lotes se obtuvo analizando 3 muestras del panel, todas con genotipo heterocigoto para el SNP de interés de un gen, en 8 duplicados al día, con 2 lotes distintos y el mismo instrumento en 2 días distintos. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorizadas en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

La reproducibilidad entre instrumentos se obtuvo analizando 3 muestras del panel, todas con genotipo heterocigoto para el SNP de interés de un gen, en 8 duplicados al día, con 2 instrumentos distintos, con 2 operadores diferentes y en 2 días distintos. Las muestras se procesaron en posiciones aleatorizadas en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Todos los duplicados obtuvieron un resultado válido y se determinaron correctamente. La variabilidad de los resultados obtenidos se calculó como %CV de los valores de Ct del IC y del valor de Tm de los tres genes de interés.

Los resultados se resumen en las tablas siguientes.

Reproducibilidad entre lotes con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	16	22,28	1,28
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		16	22,46	2,58
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		16	23,14	1,47

Reproducibilidad entre lotes con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	16	58,1	0,23
	Factor II mutado	16	65,7	0,12
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	16	55,1	0,10
	Factor V mutado	16	62,3	0,13
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	16	56,6	0,32
	MTHFR mutada	16	65,8	0,22

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	16	22,38	1,53
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		16	22,45	2,34
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		16	23,13	1,27

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe InGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	16	58,1	0,27
	Factor II mutado	16	65,6	0,12
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	16	55,1	0,21
	Factor V mutado	16	62,2	0,16
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	16	56,6	0,35
	MTHFR mutada	16	65,7	0,28

La reproducibilidad con el **ELITe InGenius** del producto **Coagulation ELITe MGB Kit** mostró valores de Ct del IC con un %CV inferior al 5 % y un valor de Tm de los tres genes de interés inferior al 5 %.

Reproducibilidad entre lotes con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	16	22,42	1,72
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		16	22,60	1,99
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		16	22,80	2,20

Reproducibilidad entre lotes con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	16	57,6	0,29
	Factor II mutado	16	65,2	0,11
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	16	54,8	0,11
	Factor V mutado	16	61,5	0,24
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	16	56,2	0,27
	MTHFR mutada	16	65,2	0,28

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Diana**	**N**	**Ct medio**	**%CV de Ct**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	CI	16	22,51	1,60
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto		16	22,63	1,68
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto		16	23,15	1,83

Reproducibilidad entre instrumentos con el ELITe BeGenius				
Muestra del panel	**Alelo**	**N**	**Tm media**	**%CV de Tm**
FII SNP G1691A, genotipo heterocigoto	Factor II sin mutar	16	57,7	0,45
	Factor II mutado	16	65,2	0,13
FV SNP G20210A, genotipo heterocigoto	Factor V sin mutar	16	54,8	0,16
	Factor V mutado	16	61,6	0,23
MTHFR SNP C677T, genotipo heterocigoto	MTHFR sin mutar	16	56,2	0,30
	MTHFR mutada	16	65,3	0,17

La reproducibilidad con el **ELITe BeGenius** del producto **Coagulation ELITe MGB Kit** mostró un %CV del valor de Ct de amplificación del IC inferior al 5 % y un %CV del valor de Tm de los tres genes de interés inferior al 5 %.

Robustez: análisis de contaminación cruzada

La ausencia de contaminación cruzada se verificó analizando muestras de sangre alternadas con agua para biología molecular.

En este análisis, 6 muestras de sangre se alternaron con 6 muestras de agua y se utilizaron para realizar el procedimiento completo de análisis, extracción y amplificación con el producto **Coagulation ELITe MGB Kit** y el **ELITe InGenius** en cinco sesiones diferentes.
Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	**N**	**Genotipo**			**CI**
		FII het	**MTHFR sin mut**	**FV sin mut**	**Ct <26,5**
Sangre recogida en EDTA	30	30/30	30/30	30/30	30/30
Agua para biología molecular	30	N/A	N/A	N/A	0/30

El ensayo calificó como «No válida» cualquier muestra de agua analizada que mostrara ausencia de contaminación cruzada.

Concordancia diagnóstica: confirmación del genotipo de la muestra certificada

La concordancia diagnóstica de este ensayo, expresada como la capacidad para identificar correctamente el genotipo de la muestra certificada, se evaluó en muestras clínicas de sangre procedentes de pacientes con genotipo conocido y, para el genotipo homocigoto mutado del SNP G20210A del factor II y de los locus del SNP C677T de la MTHFR, en muestras simuladas.

Esta concordancia diagnóstica se verificó utilizando 219 muestras de sangre recogida en EDTA de diferentes pacientes cuyo genotipo se determinó en ensayos validados de referencia de PCR en tiempo real y 92 muestras simuladas con genotipo homocigoto mutado, que se prepararon con mezclas de ADN plasmídico en una matriz de plasma.

Las muestras se analizaron mediante un procedimiento de extracción y amplificación utilizando el producto y el **ELITe InGenius**.

Los resultados se resumen en las tablas siguientes.

Genotipo de la muestra: Factor V G1691A	N	Sin mut	Het	Hom	Concordancia diagnóstica	Concordancia diagnóstica global
Sin mutar	108	108	0	0	100 %	100 %
Heterocigoto	57	0	57	0	100 %	
Mutado homocigoto	53	0	0	53	100 %	

En la distinción de los alelos del locus del SNP G1691A del factor V, el ensayo devolvió resultados coincidentes para todas las muestras analizadas. En este análisis, el acuerdo total de diagnóstico para el locus del SNP G1691A del factor V fue del 100 %.

Genotipo de la muestra: Factor II G20210A	N	Sin mut	Het	Hom	Concordancia diagnóstica	Concordancia diagnóstica global
Sin mutar	160	160	0	0	100 %	100 %
Heterocigoto	59	0	59	0	100 %	
Mutado homocigoto (simulado)	56	0	0	56	100 %	

En la discriminación alélica del locus del SNP G20210A del factor II, el ensayo devolvió resultados coincidentes para todas las muestras analizadas. En este análisis, la concordancia diagnóstica global para el locus G20210A del factor II fue del 100 %.

Genotipo de la muestra: MTHFR C677T	N	Sin mut	Het	Hom	Concordancia diagnóstica	Concordancia diagnóstica global
Sin mutar	63	63	0	0	100 %	100 %
Heterocigoto	136	0	136	0	100 %	
Mutado homocigoto	19	0	0	19	100 %	
Mutado homocigoto (simulado)	36	0	0	36		

En la discriminación alélica del locus del SNP C677T de la MTHFR, el ensayo devolvió resultados coincidentes para todas las muestras analizadas. En este análisis, la concordancia diagnóstica global para el locus C677T de la MTHFR fue del 100 %.

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, el rendimiento diagnóstico del ensayo obtenido con el ELITe InGenius también es aplicable al **ELITe BeGenius**.

El valor de corte para el Ct del Internal Control se ha establecido a 26,5 para **el ELITe InGenius y el ELITe BeGenius**.

Nota: los datos y resultados completos de las pruebas realizadas para evaluar las características de rendimiento del producto con las matrices y el equipo se incluyen en la documentación técnica del producto **Coagulation ELITe MGB Kit**, FTP RTSD00ING

BIBLIOGRAFÍA

Voorberg, J. et al. (1994) *The Lancet* 343: 1535 - 1536.
Baker, R. et al. (1994) *The Lancet* 344: 1162.
Poort, S. R. et al. (1996) Blood 88: 3698 - 3703.
Kluijtmans L. A. et al. (1996) Am J Hum Genet 58: 35 - 41.
Cattaneo M. et al. (1997) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17: 1662-1666.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con muestras clínicas sangre recogida en EDTA.

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ADN extraído de las siguientes muestras clínicas: saliva

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 las contaminaciones cruzadas. 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 ropa de trabajo e instrumentos especiales expresamente destinados a la configuración de la sesión de trabajo de que se trate.

Un resultado no válido o no concluyente obtenido con este producto significa que no ha sido posible detectar correctamente el ADN genómico de la muestra ni las temperaturas de disociación de los alelos. En este caso, el análisis de la muestra debe repetirse con un posible retardo en la obtención de los resultados.

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

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

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

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

Reacción no válida del Positive Control	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Revisar la posición de la mezcla de PCR y la del Positive Control. Revisar los volúmenes de la mezcla de PCR y del Positive Control.
Degradación del Positive Control.	Utilizar una nueva alícuota de 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. Comprobar el volumen de la mezcla PCR Mix y el 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» (bloque de inventario).	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 o no concluyente de la muestra	
Posibles causas	**Soluciones**
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la posición de la mezcla PCR Mix y la de la muestra. Comprobar el volumen de la mezcla PCR Mix y el de la muestra.
Degradación de la PCR Mix (mezcla de PCR).	Utilizar una nueva alícuota de la PCR Mix.
Sustancias interferentes en la muestra.	Repetir la amplificación con una dilución de 1:2 en agua para biología molecular de la muestra eluida en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only».
Cantidad insuficiente de ADN en la muestra.	Repetir la extracción y la amplificación con una nueva alícuota de la muestra en el modo de procesamiento «Extract + PCR».
Error del instrumento.	Contactar con el servicio técnico de ELITechGroup.

Error 30103	
Posibles causas	**Soluciones**
Concentración demasiado alta de la diana en la muestra.	Repetir la reacción de amplificación de la muestra con una dilución 1:10 de la muestra eluida en agua para biología molecular en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only».

Error TH, error SDM, error Ct	
Posibles causas	**Soluciones**
Muestra con una forma anómala en el gráfico.	Repetir la reacción de amplificación de la muestra con una dilución 1:10 de la muestra eluida en agua para biología molecular en una sesión en el modo de procesamiento «PCR Only».

SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo.
	Límite superior de temperatura.
LOT	Código de lote.
	Fecha de caducidad (último día del mes).
IVD	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*.
CE 0123	Cumple los requisitos de la Directiva 2017/746/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*. Certificación emitida por la TÜV SÜD Product Service GmbH, Alemania..
UDI	Identificador único del producto
Σ	Contenido suficiente para «N» análisis.
	Atención: consultar las instrucciones de uso.
CONT	Contenido.
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Fabricante.

NOTA PARA LOS USUARIOS

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante y a las autoridades competentes del Estado miembro en el que resida el usuario o el paciente. En el momento de la revisión actual de las instrucciones de uso, no se había producido ningún incidente grave ni ninguna retirada del producto,

No obstante, cuando este sistema informático se encuentre en funcionamiento, se proporcionará un «Resumen de seguridad y rendimiento» a través de la base de datos europea sobre productos sanitarios (Eudamed). Antes de que se publique la declaración de plena funcionalidad de Eudamed, el «Resumen de seguridad y rendimiento» se pondrá a disposición del público que lo solicite sin retrasos indebidos.

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

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

Los reactivos de detección ELITe MGB® están cubiertos por una o varias patentes de EE. UU., 6972339, 7112684, 7319022, 7348146, 7381818, 7541454, 7582739, 7601851, 7671218, 7718374, 7723038, 7759126, 7767834, 7851606, 8008522, 8067177, 8163910, 8389745, 8569516, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, así como por patentes europeas 1430147, 1687609, 1781675, 1789587, 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 y por solicitudes de patentes actualmente pendientes.

Las tecnologías del ELITe InGenius® y del ELITe BeGenius® están cubiertas por patentes o sujetas a solicitudes de patentes.

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 conceden ninguna otra licencia, expresa o implícita, para cualquier otro propósito.

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

ELITe InGenius® y ELITe BeGenius® son una marca comercial de ELITechGroup.

Coagulation ELITe MGB® kit used with ELITe InGenius and ELITe BeGenius

Ref: RTSD00ING

ELITechGroup
EMPOWERING IVD

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 product **Coagulation ELITe MGB® Kit** is an *in vitro* diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals as qualitative nucleic acids Real-Time PCR assay for the allelic discrimination of the following three loci in human genomic DNA samples extracted from clinical specimens:

- coagulation Factor V gene, single nucleotide polymorphism (SNP) G1691A (Leiden),

- coagulation Factor II gene, SNP G20210A,

- 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, SNP C677T.

The assay is validated in association with the **ELITe InGenius®** and **ELITe BeGenius®**, automated and integrated instruments for extraction, Real-Time PCR and results interpretation, using human specimens of whole blood collected in EDTA.

The product is intended for use as an aid in assessing the risk of deep vein thrombosis in patients suspected of having coagulation disorders and at risk of deep vein thrombosis.

The results must be interpreted in combination with all relevant clinical observations and laboratory outcomes.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
SNP G1691A (Leiden)	Factor V	AP639
SNP G20210A	Factor II	FAM
SNP C677T	MTHFR	AP593
Internal Control	Human beta Globin gene	AP525

C. Validated matrix

Whole Blood collected in EDTA.

D. Kit content

52M PCR Mix	
X 8	Ready-to-use PCR Master Mix 8 tubes of 280 µL 96 reactions per kit 7 freeze-thaw cycles per tube

Storage temperature: - 20°C or below

E. Material required not provided in the kit

- **ELITe InGenius** instrument: INT030
- **ELITe BeGenius** instrument: INT040
- **ELITe InGenius SP200** extraction cartridge: INT032SP200
- **ELITe InGenius PCR Cassette** amplification cartridge: INT035PCR
- **ELITe InGenius SP200 Consumable Set** consumable for extraction: INT032CS
- **Coagulation - ELITe Positive Control:** CTRD00ING
- **ELITe InGenius Waste Box:** F2102-000
- **300 µL Filter Tips Axygen:** TF-350-L-R-S with ELITe InGenius only
- **1000 µL Filter Tips Tecan:** 30180118 with ELITe BeGenius only

F. Protocol

Sample volume	200 µL
Total eluate volume	200 µL
PCR eluate input volume	20 µL
Q-PCR Mix volume	20 µL
Unit of quantitative result	Not Applicable
Frequency of controls	15 days
Frequency of calibration	Not Applicable

G. Performance

Target	Limit of Detection	Total Diagnostic Agreement
Factor V SNP G1691A	**70ng DNA/reaction**	**100%**
Factor II SNP G20210A	**70ng DNA/reaction**	**100%**
MTHFR SNP C677T	**70ng DNA/reaction**	**100%**

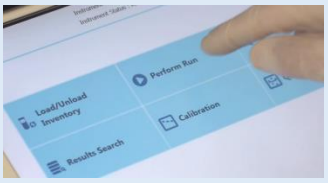
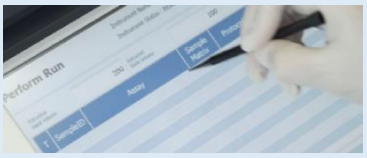
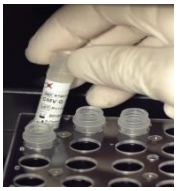
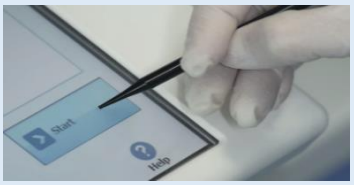
H. Procedures ELITe InGenius

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, PCR only or extraction only.

Before analysis

1. Switch on ELITe InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	**2.** Verify controls: 52M positive and negative controls in the "Control menu" *N.B:* Both have been run, approved and not expired	**3.** Thaw the 52M-PCR-Mix tube 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: "200 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 PCR Mix 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 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: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, extraction tube and primary sample racks
7. Close the door Start the run	**8.** Archive the eluate sample	

I. Procedures ELITe BeGenius

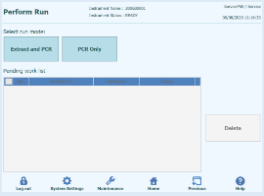
The user is guided step-by-step by the ELITe BeGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, PCR only or extraction only.

Before analysis

1. Switch on ELITe BeGenius. Log in with username and password. Select the mode “Closed”.	**2.** Verify controls: 52M Positive Control and 52M Negative Control in the “Controls” menu. *Note:* Both must have been run, approved and not expired.	**3.** Thaw the 52M PCR Mix tube. Vortex gently. Spin down 5 sec.

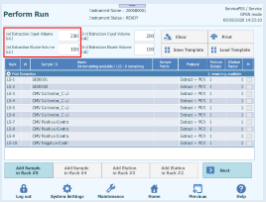
Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select “Perform Run” on the touch screen and then click on the run mode «Extraction and PCR»

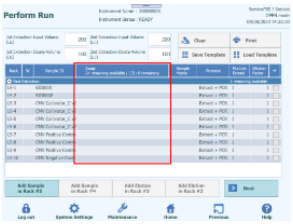


2. Insert the Sample Rack with the barcoded samples in the cooling area. The barcode scan is already active

3. Verify the extraction volumes: Input: “200 µL”, Eluate: “200 µL”

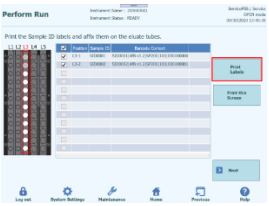


4. Select the “Assay protocol” of interest



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

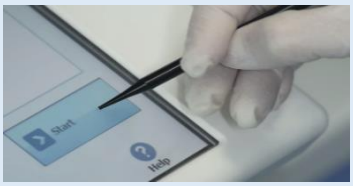
5. Print the labels to barcode the empty elution tubes. Load the tubes in the Elution Rack and insert it in the cooling area



6. Load the Q-PCR-Mix 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

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 : Filter Tips and the Extraction Rack
7. Close the door Start the run	**8.** Archive the eluate sample	