

NOTICE of CHANGE dated 13/10/2020

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«WNV ELITE MGB Kit» Ref. RTS100PLD

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

- *Minor changes in the Intended Use description. The Intended Use of the product remains unchanged.*

Composition, use and performance of the product remain unchanged.

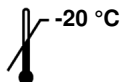
PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS

WNV ELITE MGB® Kit

reactivos para la retrotranscriptasa de ARN
y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS100PLD



INDICE

USO PREVISTO

PRINCIPIO DEL ENSAYO

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

MUESTRAS Y CONTROLES

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PROCEDIMIENTO

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

BIBLIOGRAFÍA

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

SÍMBOLOS

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

página 1
página 2
página 3
página 3
página 3
página 4
página 4
página 5
página 7
página 14
página 15
página 21
página 22
página 24
página 24

USO PREVISTO

El producto «WNV ELITE MGB® Kit» es un ensayo cuantitativo de retrotranscriptasa y amplificación de ácidos nucleicos para la **detección y la cuantificación del ARN del Flavivirus West Nile Virus (WNV, tanto de linaje 1, inclusive las cepas mediterráneas, como de linaje 2)** en muestras de ARN total extraído de muestras de sangre recogida en EDTA, así como de líquido cefalorraquídeo (LCR) o de orina recogida sin conservantes.

El producto se utiliza, junto con los datos clínicos y otras pruebas analíticas, para el diagnóstico y el control de las infecciones por el WNV. No se dispone de datos de validación para el uso del producto con matrices biológicas ni para otros usos diferentes de los mencionados en estas instrucciones de uso.

WNV ELITE MGB® Kit

reactivos para la retrotranscriptasa de ARN
y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS100PLD

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

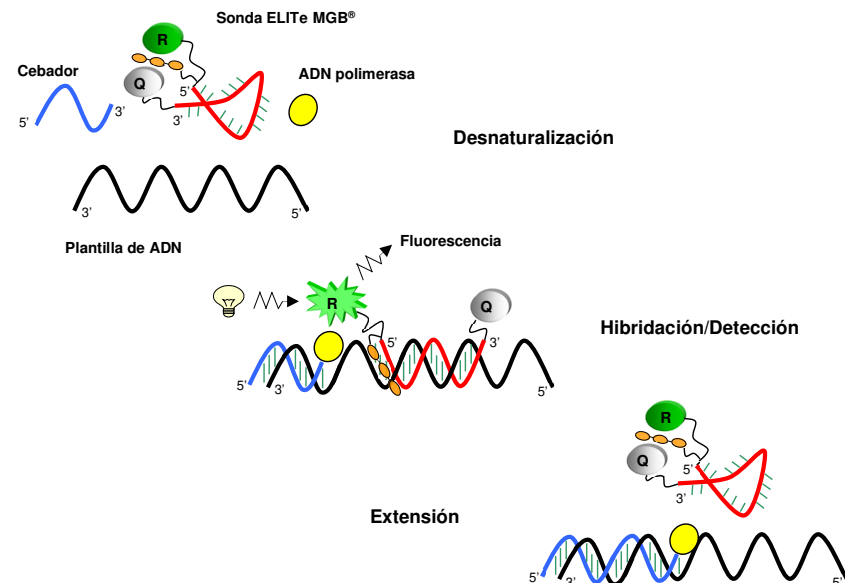
El ensayo consiste en una reacción de retrotranscriptasa y de amplificación en tiempo real (método de un paso) en una microplaca con un termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia (termociclador de amplificación en tiempo real).

En cada pocillo se realiza una reacción de retrotranscriptasa y de amplificación. La reacción es específica de una región del gen **NS5** del **WNV**, que codifica una proteína no estructural, así como de una región del ARN genómico del **bacteriófago MS2** (Internal Control de inhibición). La reacción comienza directamente a partir del ARN extraído de las muestras que se están analizando. La sonda específica del WNV con la tecnología ELITE MGB®, marcada con el fluoróforo FAM, se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del WNV. La sonda específica del Internal Control con la tecnología ELITE MGB®, marcada con el fluoróforo AP525 (similar al VIC), se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del Internal Control. A medida que aumenta el producto específico de la reacción de amplificación, la emisión de fluorescencia también aumenta y el instrumento la mide y la registra. El procesamiento de los datos permite detectar la presencia y el título de ARN de WNV en la muestra inicial.

Al finalizar la sesión, es posible realizar un análisis de la curva de fusión y determinar la temperatura de fusión para confirmar la identidad de la diana o detectar la diana mutada.

La validación del ensayo se llevó a cabo con el «7300 Real Time PCR System» y un «7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument».

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



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El producto «WNV ELITe MGB® Kit» incluye los siguientes componentes:

- WNV PreMix**

Mezcla de oligonucleótidos de los cebadores para la retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real, en una solución estabilizadora, **dividida en alícuotas en dos probetas** (tapón neutro). Cada probeta contiene **270 µL** de solución, suficiente para **50 reacciones**.

Los cebadores y la sonda del WNV (estabilizada mediante el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo FAM e inactivada con una molécula no fluorescente) son específicos de una región del **gen NS5 del WNV**.

Los cebadores y la sonda del Internal Control (estabilizada mediante el grupo MGB®, marcada con el fluoróforo AP525, similar al VIC, e inactivada con una molécula no fluorescente) son específicos de una región del ARN genómico del **bacteriófago MS2**.

La mezcla de reacción también contiene el fluoróforo AP593, que se utiliza en lugar de ROX o CY5 como referencia pasiva para la normalización de la fluorescencia.

- PCR MasterMix**

Mezcla optimizada y estabilizada de reactivos para la retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real **dividida en alícuotas en dos probetas** (tapón neutro). Cada probeta contiene **820 µL** de solución, suficiente para **50 reacciones**.

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

- RT EnzymeMix**

Mezcla optimizada y estabilizada de enzimas para la retrotranscriptasa, **dividida previamente en alícuotas en dos probetas** (tapón negro). Cada probeta contiene **20 µL** de solución, suficiente para **50 reacciones**.

La mezcla de reacción contiene enzimas para la retrotranscriptasa.

El producto permite realizar **100 determinaciones**, inclusive calibradores y controles.

MATERIAL PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

Componente	Descripción	Cantidad	Clasificación de peligro
WNV PreMix	Mezcla de oligonucleótidos del cebador/de la sonda Tapón neutro	2 x 270 µL	-
PCR MasterMix	Mezcla de reactivos para la retrotranscriptasa y la amplificación en tiempo real Tapón neutro	2 x 820 µL	-
RT EnzymeMix	Retrotranscriptasa Tapón negro	2 x 20 µL	-

MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO CON EL PRODUCTO

- Campana de flujo laminar.
- Guantes sin talco desechables de nitrilo o de otro material similar.
- Agitadora vortical.
- Microcentrifugadora de sobremesa (12.000–14.000 rpm).
- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o desplazamiento positivo (2–20 µL, 5–50 µL, 50–200 µL, 200–1000 µL).
- Microprobeta de polipropileno para biología molecular, 1,5 mL.
- Agua de calidad para biología molecular.
- Termostato programable con sistema óptico de detección de fluorescencia, 7300 Real Time PCR System o 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, calibrados conforme a las instrucciones del fabricante.

OTROS PRODUCTOS NECESARIOS

Los reactivos para la extracción de ARN de las muestras, el Internal Control de extracción e inhibición, las microplacas de inhibición, el Positive Control de amplificación y los calibradores de ADN en cantidad conocida, **no están** incluidos en el volumen de suministro de este kit.

Para la extracción automática ARN de las muestras, es necesario utilizar el producto genérico «**ELITe STAR 200 Extraction Kit**» (ELITechGroup S.p.A., código INT011EX), que es un kit para la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas con el instrumento «**ELITe STAR**» (ELITechGroup S.p.A., código INT010).

Para el control de extracción y el control de inhibición, es necesario utilizar el producto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., código CTRCPE), que contiene ADN plasmídico y la plantilla de ARN del bacteriófago de las reacciones del Internal Control.

Si se utiliza un «7300 Real Time PCR System», se recomienda utilizar el producto genérico «**Q-PCR Microplates**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC01), que incluye microplacas con pocillos de 0,2 mL y placas de sellado adhesivas para la amplificación en tiempo real.

Si se utiliza un «7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument», se recomienda utilizar el producto genérico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., ref. RTSACC02), que contiene microplacas con pocillos de 0,1 mL y placas selladoras adhesivas para la amplificación en tiempo real.

Si se necesita un resultado cualitativo en el análisis, es necesario utilizar el producto específico «**WNV - Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR100PLD).

Si se necesita un resultado cuantitativo en el análisis, se recomienda utilizar el producto específico «**WNV ELITe Standard**» (ELITechGroup S.p.A., ref. STD100PLD), que contiene cuatro diluciones de ADN plasmídico en cantidad conocida para calcular la curva de calibración.

MUESTRAS Y CONTROLES

Muestras

Este producto debe utilizarse con **ARN** extraído de las siguientes muestras clínicas: Sangre recogida en EDTA, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina recogida sin conservantes.

Este producto debe utilizarse añadiendo directamente el **ARN extraído** (hasta 300 ng) para la reacción de retrotranscriptasa y de amplificación en tiempo real (procedimiento de un paso).

Sangre recogida en EDTA

Las muestras de sangre que se utilizan para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse en EDTA conforme a las directrices para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de cuatro horas. De lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de dos días, o a -70 °C durante períodos más largos.

Recomendamos dividir las muestras en alícuotas para no congelarlas y descongelarlas repetidas veces.

Líquido cefalorraquídeo

Las muestras de líquido cefalorraquídeo que se utilizan para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse conforme a las directrices para laboratorios, así como transportarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C y conservarse a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de cuatro horas. De lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de dos días, o a -70 °C durante períodos más largos.

Recomendamos dividir las muestras en alícuotas para no congelarlas y descongelarlas repetidas veces.

Orina

Las muestras de orina que se utilizan para la extracción de ácidos nucleicos deben recogerse sin conservantes conforme a las directrices para laboratorios, así como transportarse a temperatura ambiente (entre +18 °C y +25 °C) y conservarse a una temperatura ambiente (entre +18 °C y +25 °C) durante un máximo de cuatro horas. De lo contrario, deben congelarse y conservarse a -20 °C durante un máximo de dos días, o a -70 °C durante períodos más largos. Recomendamos dividir las muestras en alícuotas para no congelarlas y descongelarlas repetidas veces.

WNV ELITe MGB® Kit**reactivos para la retrotranscriptasa de ARN
y la amplificación en tiempo real de ADNc****REF RTS100PLD**

La congelación de muestras de orina provoca con frecuencia la formación de precipitados que pueden interferir en los pasos siguientes del método. Extraer solo el sobrenadante.

Nota: cuando la extracción de ARN se realiza a partir de sangre, líquido cefalorraquídeo y orina con el producto «**ELITe STAR 200 Extraction Kit**» y el instrumento «**ELITe STAR**» con la **versión 3.4.13 del software** (o una posterior), utilizar el protocolo de extracción **UUNI_E100S200_ELI**, que procesa 200 µL de muestra y eluye el ARN extraído en 100 µL. Las muestras de las probetas primarias pueden cargarse directamente en el instrumento «**ELITe STAR**». Siempre se solicita un volumen mínimo de muestra de 600 µL. Añada **200 µL** de Internal Control **CPE** a la probeta de solución portadora de proteínas, tal como se indica en las instrucciones de uso del kit de extracción. Para el procedimiento de extracción, seguir las indicaciones de las instrucciones de uso del kit de extracción.

Sustancias interferentes

Con el fin de evitar problemas de inhibición y el riesgo de obtener resultados no válidos con frecuencia, el ARN extraído de las muestras no debe contener heparina, hemoglobina, etanol ni 2-propanol.

Una cantidad de ARN extraído superior a 300 ng por reacción puede inhibir la reacción de retrotranscriptasa y de amplificación en tiempo real.

Unas grandes cantidades de ADN genómico humano en el ARN extraído de la muestra pueden inhibir la reacción de retrotranscriptasa y de amplificación en tiempo real.

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

Controles de amplificación

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

Como control negativo, usar agua de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro del producto), añadida a la reacción en lugar del ARN obtenido de la muestra.

Como control positivo, utilizar el producto «**WNV ELITe Standard**» o el producto «**WNT - ELITe Positive Control**».

Controles de calidad

Se recomienda validar el procedimiento entero de análisis de cada sesión de extracción, retrotranscriptasa y amplificación procesando una muestra negativa y una muestra positiva que ya se hayan analizado o un material de referencia calibrado.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

Advertencias y precauciones generales

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

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

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

No pipetear ninguna solución con la boca.

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

Lavarse bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

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

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

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

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

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

No utilizar reactivos procedentes de lotes diferentes.

No utilizar reactivos de otros fabricantes.

WNV ELITe MGB® Kit**reactivos para la retrotranscriptasa de ARN
y la amplificación en tiempo real de ADNc****REF RTS100PLD****Advertencias y precauciones para los procedimientos de biología molecular**

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

Es necesario disponer de áreas independientes para la extracción/preparación de las reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de los productos de amplificación. No introducir nunca un producto de amplificación en el área asignada a la extracción/preparación de las reacciones de amplificación.

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

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

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

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

Advertencias y precauciones específicas de los componentes**WNV PreMix**

La mezcla «**WNV PreMix**» debe conservarse a -20 °C en un lugar protegido de la luz.

La mezcla «**WNV PreMix**» puede congelarse y descongelarse un máximo de **cinco veces**: más ciclos de congelación y descongelación pueden reducir el rendimiento del producto.

PCR MasterMix

La mezcla «**PCR MasterMix**» debe conservarse a -20 °C.

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

RT EnzymeMix

La mezcla «**RT EnzymeMix**» debe conservarse a -20 °C.

La mezcla «**RT EnzymeMix**» no debe exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos.

PROCEDIMIENTO

Configuración de la sesión de amplificación en tiempo real

Debe realizarse en el área de amplificación/detección.

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

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

- Encender el termociclador en tiempo real, encender el ordenador de control, ejecutar el software y abrir una sesión de cuantificación absoluta («Absolute quantification»).
- Configurar el «detector» para la sonda de WNV con el «reporter» = «FAM» y el «quencher» = «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «WNV».
- Configurar el detector para la sonda de Internal Control con el marcador «VIC» y el inhibidor «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «IC».
- Para cada pocillo empleado en la microplaca, configurar (en «Well Inspector») el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir, la referencia pasiva («passive reference») o «ROX» (AP593 se usa en lugar de ROX, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación o calibrador en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse atentamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

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

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

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

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

- Modificar el tiempo tal como se indica en la tabla «Ciclo térmico».
- Establecer el número de ciclos a **45**.
- Establecer el volumen de reacción a **30 µL**.
- Opcional: añadir el análisis de la curva de fusión («Add Dissociation Stage») y establecer la temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperatura	Tiempo
Retrotranscriptasa	50 °C	20 min
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Amplificación y detección (45 ciclos)	94 °C	10 s
	60 °C (adquisición de fluorescencia)	30 s
	72 °C	20 s
Disociación (opcional)	95 °C	15 s
	40 °C	30 s
	80 °C	15 s

Si se utiliza el **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, tener en cuenta lo siguiente:

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

- Encender el termociclador en tiempo real, encender el ordenador de control, ejecutar el software y abrir una sesión de cuantificación absoluta («Absolute quantification»).
- Configurar el «detector» para la sonda de WNV con el «reporter» = «FAM» y el «quencher» = «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «WNV».
- Configurar el detector para la sonda de Internal Control con el marcador «VIC» y el inhibidor «none» (no fluorescente) y asignarle el nombre «IC».
- Para cada pocillo empleado en la microplaca, configurar (en «Well Inspector») el «detector» (tipo de fluorescencia que se debe medir, la referencia pasiva («passive reference») o «CY5» (AP593 se usa en lugar de CY5, normalización de la fluorescencia medida) y el tipo de reacción (muestra, control negativo de amplificación, control positivo de amplificación o calibrador en una cantidad conocida). Añadir esta información a la **hoja de trabajo** que se adjunta al final de estas instrucciones de uso o imprimir la configuración de la microplaca. La **hoja de trabajo** debe seguirse estrictamente al verter la mezcla de reacción y las muestras en los pocillos.

Nota: con el fin de determinar el título de ARN en la muestra inicial, configurar diversas reacciones con el calibrador «**WNV Q - PCR Standard**» (10⁵ copias, 10⁴ copias, 10³ copias, 10² copias) para obtener la **curva de calibración**.

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

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

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

- Modificar el tiempo tal como se indica en la tabla «Ciclo térmico».
- Establecer el número de ciclos a **45**.
- Configurar el volumen para la emulación del software de la transferencia térmica a la reacción («Sample volume») a **30 µL**.
- Opcional: añadir el análisis de la curva de fusión («Add Dissociation Stage») y establecer la temperatura de **40 °C a 80 °C**.

Ciclo térmico		
Fase	Temperatura	Tiempo
Retrotranscriptasa	50 °C	20 min
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Amplificación y detección (45 ciclos)	94 °C	10 s
	60 °C (adquisición de fluorescencia)	30 s
	72 °C	20 s
Disociación (opcional)	95 °C	15 s
	40 °C	1 min
	80 °C	15 s
	60 °C	15 s

Configuración de la amplificación

Para realizar en el área de extracción/preparación.

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

- Retirar y descongelar a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) las probetas que contienen las muestras que van a analizarse. Mezclar en la agitadora vortical durante 10 segundos, centrifugar las probetas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.
- Retirar y descongelar durante 30 minutos a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) las probetas de mezcla **WNV PreMix** (tapón neutro) que se necesitan para la sesión, teniendo en cuenta que el contenido de cada una de ellas es suficiente para **50 reacciones**. Mezclar en una agitadora vortical durante 10 segundos tres veces, centrifugar las probetas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.

WNV ELITe MGB® Kit

reactivos para la retrotranscriptasa de ARN
y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS100PLD

- Retirar y descongelar durante 30 minutos a temperatura ambiente (de +18 °C a 25 °C) las probetas de «PCR MasterMix» (tapón neutro) que se necesitan para la sesión, teniendo en cuenta que el contenido de cada probeta es suficiente para configurar **50 reacciones**. Mezclar en una agitadora vortical durante 10 segundos tres veces, centrifugar las probetas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.

- En caso necesario, retirar las probetas de mezcla «RT EnzymeMix» (tapón negro) que se necesitan para la sesión teniendo en cuenta que el contenido de cada probeta es suficiente para configurar **50 reacciones**. Agitar suavemente las probetas, centrifugar durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.

Nota: la mezcla «RT EnzymeMix» no debe exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 10 minutos.

- Retirar y descongelar durante 30 minutos a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) las probetas de «WNV Q - PCR Standard» o la probeta de «WNV - Positive Control». Mezclar en la agitadora vortical durante 10 segundos, centrifugar las probetas durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.

- Tomar la **microplaca de amplificación** que se utilizará durante la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañar los pocillos.

- Tomar la **placa de sellado de amplificación** que se usará durante la sesión, manipulándola con guantes sin talco y teniendo cuidado de no dañarla.

- Preparar una probeta de 1,5 mL de polipropileno de calidad para biología molecular (no incluida en el volumen de suministro de este producto) para la reacción completa de reacción «WNV Q - PCR Mix» y, después, marcarla de forma identificable con un rotulador permanente.

- Calcular los volúmenes de los tres componentes incluidos con el kit que se necesitan para preparar la mezcla de reacción completa «WNV Q - PCR Mix» basándose en el número de muestras que van a analizarse, tal como se describe en la tabla siguiente.

Nota: con el fin de calcular los volúmenes de los tres componentes, es necesario definir el número de reacciones (N) de la sesión contando el número de muestras que van a analizarse, un control negativo, cuatro calibradores «Q - PCR Standard» y una reacción como margen de seguridad.

Número de reacciones	WNV PreMix	PCR MasterMix	RT EnzymeMix
1	5 µL	15 µL	0,3 µL
N	N x 5 µL	N x 15 µL	N x 0,3 µL

- Preparar la mezcla completa de reacción «WNV Q - PCR Mix» añadiendo a la probeta dedicada los volúmenes calculados de los tres componentes. Mezclar en una agitadora vortical a baja velocidad tres veces durante 10 segundos, centrifugar la probeta durante 5 segundos para llevar el contenido al fondo y conservar en hielo.

Nota: la mezcla completa de reacción debe utilizarse en el transcurso de 30 minutos. La mezcla completa de reacción **no puede** conservarse.

Configurar las reacciones tal como se describe a continuación:

- Pipetear de forma exacta **20 µL** de mezcla completa de reacción «WNV Q - PCR Mix» en el fondo de los pocillos de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Evitar la formación de burbujas.
- Pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **10 µL** del **ARN extraído** de la primera muestra en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien la muestra pipeteando el **ARN extraído** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma forma con el resto del **ARN extraído**.
- Pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción, **10 µL** de **agua de grado molecular para biología** (no incluida con este producto) en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar bien el control negativo pipeteando el **agua de calidad para biología molecular** tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

WNV ELITe MGB® Kit

reactivos para la retrotranscriptasa de ARN
y la amplificación en tiempo real de ADNc

REF RTS100PLD

- Según el resultado necesario (cualitativo o cuantitativo), es preciso seguir una de estas dos opciones:

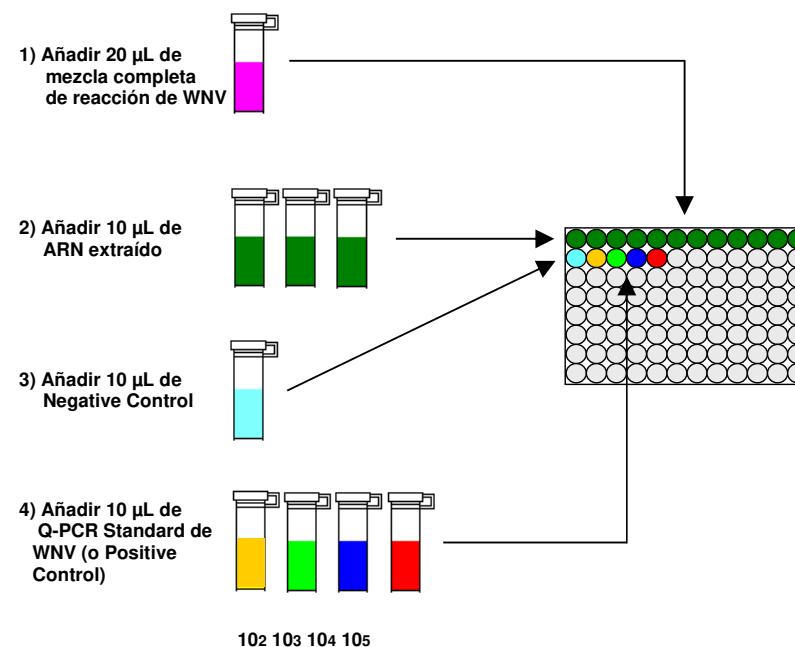
- Si se necesita un resultado **cualitativo** (detección de ARN de WNV), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **10 µL** de «WNV - Positive Control» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar por completo el control positivo pipeteando el «WNV - Positive Control» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas.

- Si se necesita un resultado **cuantitativo** (cuantificación del ARN de WNV), pipetear de forma exacta, vertiendo en la mezcla de reacción **10 µL** de «WNV Q - PCR Standard 10²» en el pocillo correspondiente de la **microplaca de amplificación**, tal como se ha establecido anteriormente en la **hoja de trabajo**. Mezclar el calibrador pipeteando el «WNV Q - PCR Standard» tres veces en la mezcla de reacción. Evitar la formación de burbujas. Proceder de la misma manera con los demás **calibradores «Q-PCR Standard»** de WNV (10³, 10⁴, 10⁵).

- Sellar de forma exacta la **microplaca de amplificación** con la **placa de sellado de amplificación**.
- Transferir la **microplaca de amplificación** al termociclador en tiempo real en el área de amplificación/detección y comenzar el ciclo térmico para la amplificación guardando la configuración de la sesión con un nombre de archivo único e identificable (p. ej., «año-mes-día-WNV-EGSpA»).

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

La siguiente figura muestra un ejemplo de la preparación de las reacciones de amplificación para el análisis cuantitativo de 12 muestras.



Análisis cualitativo de los resultados

Los valores registrados de la fluorescencia emitida por la sonda específica del WNV (detector FAM «WNV») y por la sonda específica del Internal Control (detector VIC «IC») en las reacciones de amplificación deben analizarse con el software del instrumento.

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

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

Nota: en caso de muestra positiva con un alto título de ARN de WNV, la fluorescencia FAM de la sonda específica del WNV puede empezar a aumentar antes del ciclo 15. En este caso, el rango de cálculo para el **punto de referencia** debe adaptarse del ciclo 6 al ciclo en el que la fluorescencia FAM de la muestra empieza a aumentar, según detecte el software del instrumento («Results > Component»).

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

- Configurar manualmente el **umbral** para el detector FAM «WNV» a **0,1**.
- Configurar manualmente el **umbral** para el «IC» del detector VIC a **0,05**.

Si se utiliza un **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**, tener en cuenta lo siguiente:

- Configurar manualmente el **umbral** para el detector FAM «WNV» a **0,1**.
- Configurar manualmente el **umbral** para el «IC» del detector VIC a **0,1**.

Los valores de fluorescencia emitidos por las sondas específicas en la reacción de amplificación y el valor **umbral** de fluorescencia permiten determinar el **ciclo umbral (Ct)**, es decir, el ciclo en el que la fluorescencia ha alcanzado el valor **umbral**.

Positive Control o Q-PCR Standard

En la reacción de amplificación del **Positive Control** o del **Q - PCR Standard 10s**, el valor de **Ct** del WNV («Results > Report») se utiliza para validar la amplificación y la detección tal como se describe en la tabla siguiente:

Reacción del Positive Control (o Q-PCR Standard 10s) Detector FAM «WNV»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct ≤25	POSITIVO	CORRECTA

Si el resultado del **Positive Control** o de la reacción de amplificación del **Q - PCR Standard 10s** es **Ct > 25** o **Ct Undetermined** para el WNV, significa que el ADN diana no se ha detectado correctamente. En este caso, se han producido problemas durante los pasos de amplificación o detección (distribución incorrecta de la mezcla de reacción o del control positivo, degradación de la mezcla de reacción o del control positivo, configuración incorrecta de la posición del control positivo o configuración incorrecta del ciclo térmico; consultar la sección «Problemas y soluciones»), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

Negative Control

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

Reacción del Negative Control detector FAM «WNV»	Resultado del ensayo	Amplificación/Detección
Ct Undetermined	NEGATIVO	CORRECTA

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

Muestras

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

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

Este producto puede detectar una cantidad mínima de aproximadamente 450 a 200 copias de ARN de WNV por mL, lo que corresponde a los equivalentes genómicos por mL (límite de detección del producto; consultar la sección «Características de rendimiento»).

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

Reacción de la muestra		Idoneidad de la muestra	Resultado del ensayo	ARN de WNV
detector FAM «WNV»	detector VIC «IC»			
Ct Undetermined	Ct >35 o Ct Undetermined	No idónea	No válido	-
	Ct ≤35	Idónea	Válido, negativo	NO DETECTADO
Ct Determined	Ct >35 o Ct Undetermined	Idónea	Válido, positivo	DETECTADO
	Ct ≤35	Idónea	Válido, positivo	DETECTADO

Si el resultado de la reacción de amplificación de una muestra es **Ct Undetermined** para el WNV y **Ct > 35** o **Ct Undetermined** para el Internal Control, significa que ha sido imposible detectar correctamente el ADN para el Internal Control. En este caso, se han producido problemas durante la retrotranscriptasa y el paso de amplificación o durante el paso de extracción (degradación del ARN del Internal Control, reducción del título de ARN durante la extracción o presencia de inhibidores en el ARN extraído), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos y falsos negativos (consultar la sección «Problemas y soluciones»). La muestra no es idónea, el ensayo no es válido y debe repetirse a partir de la extracción de una nueva muestra.

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

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

Nota: si en la reacción de amplificación de una muestra se detecta ARN de WNV, significa que el Internal Control puede tener el resultado **Ct >35** o **Ct Undetermined**. De hecho, la reacción de amplificación de baja eficiencia para el Internal Control puede desplazarse mediante competencia con la reacción de amplificación de alta eficiencia para ARN de WNV. En este caso, la muestra será de todas maneras idónea y el resultado positivo del ensayo es válido.

Análisis cuantitativo de los resultados

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

Curva de calibración

En las reacciones de amplificación de los cuatro calibradores «**Q - PCR Standard**», los valores de **Ct** se utilizan para calcular la **curva de calibración** («Results > Standard Curve») para la sesión de amplificación, tal como se describe en la tabla siguiente:

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

Si el valor del **coeficiente de correlación (R2)** no se encuentra dentro de los límites, significa que ha sido imposible detectar correctamente el ADN diana. En este caso, se han producido problemas durante el paso de amplificación o de detección (preparación incorrecta de la mezcla de reacción, distribución incorrecta de la mezcla de reacción o de los calibradores, degradación de la mezcla de reacción o de los calibradores, configuración incorrecta de la posición de los calibradores o configuración incorrecta del ciclo térmico; consultar la sección «Problemas y soluciones»), lo que puede dar lugar a resultados incorrectos. La sesión no es válida y debe repetirse a partir del paso de amplificación.

Muestras

Los valores de **Ct** del WNV en la reacción de amplificación de cada **muestra** y la **curva de calibración** («Results > Standard Curve») de la sesión de amplificación se utilizan para calcular la **cantidad** de ARN diana presente en las reacciones de amplificación de las muestras.

Esto se evaluó con muestras que tenían un rango de concentración de 1.000.000 a 316 copias de ARN de WNV por mL, lo que corresponde a los equivalentes genómicos por mL (rango de medición lineal; consultar la sección «Características de rendimiento»).

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

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

Donde:

Va es el cantidad de muestra utiliza en la extracción, **expresada en µL**.

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

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

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

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

Cuando el sistema de extracción «**ELITe STAR**» se utiliza con muestras de sangre y se necesita un resultado **expresado en gEq/mL**, la fórmula es la siguiente:

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 66,7 \times Cantidad$$

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

$$Nc \text{ (gEq/mL)} = 50 \times Cantidad$$

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Utilizar este producto únicamente con ARN extraído de las muestras clínicas siguientes: Sangre recogida en EDTA, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina.

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

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

Una cantidad de ARN extraído superior a 300 ng por reacción puede inhibir la reacción de retrotranscriptasa y la amplificación de ácidos nucleicos.

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

No se dispone de datos sobre el rendimiento del producto con ARN extraído de las siguientes muestras clínicas: Plasma recogido en EDTA.

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

Los resultados obtenidos con este producto dependen de que las muestras se identifiquen, recojan, transporten, conserven y procesen de forma apropiada. Por lo tanto, con el fin de evitar resultados incorrectos, realizar estos pasos con el debido cuidado y seguir estrictamente las instrucciones proporcionadas con los productos para la extracción de ácidos nucleicos.

Debido a su alta sensibilidad analítica, la metodología de amplificación en tiempo real utilizada en este producto está sujeta a contaminación cruzada con las muestras clínicas positivas para el WNV, los controles positivos y los productos mismos de la amplificación. Una contaminación cruzada puede dar lugar a resultados falsos positivos. El formato del producto puede limitar la contaminación cruzada. Sin embargo, las contaminaciones cruzadas solo pueden evitarse procediendo conforme a las prácticas correctas de laboratorio y siguiendo estas instrucciones de uso.

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

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

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

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

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

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

Un resultado negativo obtenido con este producto significa que el ARN de WNV no se ha detectado en el ARN extraído de la muestra; si bien no puede descartarse que el ARN de WNV esté presente a un título inferior al límite de detección del producto (consultar la sección «Eficacia diagnóstica»). En este caso, el resultado puede ser un falso negativo.

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

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

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

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Límite de detección

El límite de detección de este ensayo cuando se utilizó con muestras de sangre se verificó con un panel de diluciones de WNV. El panel se preparó utilizando muestras de sangre negativas para ADN de WNV y enriquecidas con material de referencia calibrado y certificado «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) de WNV de linaje 1 (cepa NY99). El panel osciló de 562 copias/mL a 10 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 24 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las tablas siguientes.

Límite de detección para el WNV de linaje 1 con muestras de sangre y el «ELITe STAR»			
Intervalo de confianza del 95 %			
		Límite inferior	Límite superior
LoD (95 % de positividad)	447 copias/mL	310 copias/mL	798 copias/mL

El límite de detección de este ensayo cuando se utilizó con muestras de orina recogida sin conservantes se verificó con dos paneles de diluciones de WNV. Los paneles se prepararon utilizando muestras de orina negativas para ADN de WNV y enriquecidas con material de referencia calibrado y certificado «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) de WNV de linaje 1 (cepa NY99) y de linaje 2 (cepa Heja). El panel osciló de 316 copias/mL a 10 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 24 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las tablas siguientes.

Límite de detección para el WNV de linaje 1 con muestras de orina y el «ELITe STAR»			
Intervalo de confianza del 95 %			
		Límite inferior	Límite superior
LoD (95 % de positividad)	318 copias/mL	228 copias/mL	554 copias/mL

Límite de detección para el WNV de linaje 2 con muestras de orina y el «ELITe STAR»			
Intervalo de confianza del 95 %			
		Límite inferior	Límite superior
LoD (95 % de positividad)	282 copias/mL	188 copias/mL	545 copias/mL

El límite de detección de este ensayo cuando se utilizó con líquido cefalorraquídeo (LCR) se verificó con un panel de diluciones de WNV. El panel se preparó utilizando muestras de líquido cefalorraquídeo negativas para ADN de WNV y enriquecidas con material de referencia calibrado y certificado «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) de WNV de linaje 1 (cepa NY99). El panel osciló de 316 copias/mL a 10 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 24 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión Probit. El límite de detección se calculó para las concentraciones en las que la probabilidad de un resultado positivo es del 95 %.

Los resultados finales se indican en las tablas siguientes.

Límite de detección para el WNV de linaje 1 con muestras de líquido cefalorraquídeo y el «ELITe STAR»			
Intervalo de confianza del 95 %			
		Límite inferior	Límite superior
LoD (95 % de positividad)	201 copias/mL	145 copias/mL	345 copias/mL

Rango de medición lineal

El rango de medición lineal de este ensayo se determinó utilizando tres paneles de diluciones de WNV en muestras de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo. Los paneles se prepararon con matrices negativas para ARN de WNV y enriquecidas con material de referencia calibrado y certificado «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) de WNV de linaje 1 (cepa NY99) y de linaje 2 (cepa Heja). Los paneles oscilaron de 1.000.000 copias/mL a 316 copias/mL. Cada muestra del panel se analizó en 9 duplicados realizando el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. El análisis de los datos obtenidos, realizado mediante regresión lineal, demostró que el ensayo presenta una respuesta lineal para todas las diluciones (coeficiente de correlación cuadrática superior a 0,99).

Los resultados finales se indican en las tablas siguientes.

Rango de medición lineal para el WNV de linaje 1 con muestras de sangre y el «ELITe STAR»	
Límite inferior	Límite superior (probado)
447 copias/mL	1.000.000 copias/mL

Límite de detección para el WNV de linaje 1 en muestras de orina y «ELITe STAR»	
Límite inferior	Límite superior (probado)
318 copias/mL	1.000.000 copias/mL

Rango de medición lineal para el WNV de linaje 2 con muestras de orina y el «ELITe STAR»	
Límite inferior	Límite superior (probado)
316 copias/mL	1.000.000 copias/mL

Rango de medición lineal para el WNV de linaje 1 con muestras de líquido cefalorraquídeo y el «ELITe STAR»	
Límite inferior	Límite superior (probado)
316 copias/mL	1.000.000 copias/mL

Nota: En el caso de las muestras de sangre recogida en EDTA y de las muestras de orina, ambas enriquecidas con WNV de linaje 1, el valor del límite de detección se ha impuesto como límite inferior del rango de medición lineal.

Precisión y exactitud

La precisión del ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos con 9 duplicados de una muestra analizada dentro de la misma sesión, se evaluó como un coeficiente de variación porcentual (%CV), como valores de Ct y como la desviación estándar (DE) de los resultados expresados en log copias/mL para las concentraciones de WNV dentro del rango de medición lineal de 1.000.000 copias/mL a 316 copias/mL. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Precisión: %CV de Ct				
Muestras	WNV de linaje 1 en sangre	WNV de linaje 1 en orina	WNV de linaje 2 en orina	WNV de linaje 1 en LCR
6,0 log copias/mL	0,43	1,16	0,81	0,98
5,0 log copias/mL	0,30	1,25	0,73	0,50
4,0 log copias/mL	0,68	1,09	1,02	0,71
3,0 log copias/mL	0,76	2,18	1,23	0,56
2,5 log copias/mL	0,97	2,82	2,71	1,01

Precisión: DE log copias/mL				
Muestras	WNV de linaje 1 en sangre	WNV de linaje 1 en orina	WNV de linaje 2 en orina	WNV de linaje 1 en LCR
6,0 log copias/mL	0,15	0,09	0,06	0,07
5,0 log copias/mL	0,10	0,11	0,06	0,04
4,0 log copias/mL	0,23	0,11	0,10	0,07
3,0 log copias/mL	0,26	0,24	0,13	0,06
2,5 log copias/mL	0,33	0,32	0,31	0,11

La exactitud del ensayo, expresada como la variabilidad de los resultados obtenidos con 9 duplicados de una muestra analizada dentro de la misma sesión, se evaluó como una desviación del valor teórico del valor medio medido, expresado en log copias/mL para las concentraciones de WNV dentro del rango de medición lineal de 1.000.000 copias/mL a 316 copias/mL. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

Exactitud: desviación de la cuantificación (log copias/mL) del valor técnico				
Muestras	WNV de linaje 1 en sangre	WNV de linaje 1 en orina	WNV de linaje 2 en orina	WNV de linaje 1 en LCR
6,0 log copias/mL	0,30	0,43	0,08	0,50
5,0 log copias/mL	0,47	0,41	0,04	0,42
4,0 log copias/mL	0,28	0,36	0,02	0,37
3,0 log copias/mL	0,48	0,32	0,06	0,49
2,5 log copias/mL	0,29	0,08	0,03	0,58

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

Reproducibilidad con un panel para la prueba de eficacia

La reproducibilidad de los resultados del ensayo comparados con los resultados obtenidos utilizando otros métodos en laboratorios diferentes se verificó analizando el panel de la prueba eficacia «QCMD 2013 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido). Cada muestra del panel se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Panel para la prueba de eficacia y el « ELITe STAR »				
Muestras	Contenido	Estado de la muestra	Positivas/Duplicados	Media de resultados Log ₁₀ copias/mL
WNV13-01	NY99 de WNV, linaje 1	Detectado con frecuencia	2/2	8,28
WNV13-02	NY99 de WNV, linaje 1	Detectado con frecuencia	2/2	7,17
WNV13-03	NY99 de WNV, linaje 1	Detectado con frecuencia	2/2	5,92
WNV13-04	NY99 de WNV, linaje 1	Detectado con frecuencia	2/2	5,99
WNV13-05	NY99 de WNV, linaje 1	Detectado	2/2	4,97
WNV13-06	NY99 de WNV, linaje 1	Detectado	2/2	3,95
WNV13-07	Heja de WNV, linaje 2	Detectado con frecuencia	2/2	8,12
WNV13-08	Heja de WNV, linaje 2	Detectado con frecuencia	2/2	7,10
WNV13-09	Ug37 de WNV, linaje 2	Detectado con frecuencia	2/2	7,60
WNV13-10	Flavivirus no WNV	Negativas	0/2	-
WNV13-11	Flavivirus no WNV	Negativas	0/2	-
WNV13-12	Negativo en VTM	Negativas	0/2	-

Todas las muestras se detectaron correctamente. La muestra WNV13-10, que contenía virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue 1, virus del dengue 2 y virus del dengue 4, así como la muestra WNV13-11, que contenía la cepa 17D del virus de la fiebre amarilla, virus del dengue 3, virus del dengue 4 y virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, presentaron un resultado negativo.

Eficacia de detección y cuantificación con distintos genotipos

La eficacia de detección y cuantificación de los diferentes genotipos se evaluó comparando las secuencias con las bases de datos de nucleótidos. El análisis de las regiones elegidas para la hibridación del cebador y de la sonda fluorescente en la alineación de las secuencias disponibles en la base de datos para el gen NS5 del WNV, tanto de linaje 1 como de linaje 2, mostró conservación y ausencia de mutaciones reseñables.

La eficacia de detección y cuantificación de los diferentes genotipos se evaluó utilizando una estructura plasmídica que contenía la región amplificada del WNV de la cepa mediterránea Ita09 del linaje 1.

Una estructura plasmídica que contenía la región amplificada de la primera cepa Ita09 del linaje 1 del WNV (número de acceso ENA GU011992) se cuantificó mediante una lectura en el espectrofotómetro y se diluyó a concentraciones de 100.000, 10.000, 1.000 y 100 copias por reacción. Cada muestra se analizó por triplicado con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Eficacia de detección y cuantificación en las secuencias de la cepa Ita09 del linaje 1 del WNV		
Concentración teórica copias/reacción	Positivos/réplicas	Media de resultados copias/reacción
5,00	3/3	5,11
4,00	3/3	3,98
3,00	3/3	2,94
2,00	3/3	2,06

La eficacia de detección y cuantificación de diferentes genotipos se evaluó analizando material de referencia certificado positivo para WNV de linaje 1 y de linaje 2 del Instituto Superior de Salud Italiano (ISS). Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Eficacia de detección y cuantificación en las secuencias de la cepa Ita09 del linaje 1 del WNV			
Muestras	Cantidad teórica log copias/mL	Positividad	Cantidad medida log copias/mL
ARN de WNV ISS0213 (linaje 1)	3,176	Sí	3,371
ARN de WNV ISS0411 (linaje 2)	3,000 - 3,698	Sí	3,764

Marcadores potencialmente interferentes

La ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes se evaluó comparando las secuencias con bases de datos de nucleótidos.

El análisis de la alineación de las secuencias del cebador de nucleótidos y de la sonda fluorescente con las secuencias disponibles en la base de datos de diferentes microorganismos del WNV, inclusive otro flavivirus del complejo antigénico de la encefalitis japonesa y el virus Usutu, demostró especificidad y ausencia de homologías reseñables.

La ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes se verificó analizando el panel de la prueba de eficacia para el material de referencia «QCMD 2013 West Nile Virus (RNA) EQA Programme».

Los resultados obtenidos con el panel se presentan en la sección «Reproducibilidad con el panel de la prueba de eficacia». En concreto, la muestra WNV13-10, que contenía virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue 1, virus del dengue 2 y virus del dengue 4, así como la muestra WNV13-11, que contenía la cepa 17D del virus de la fiebre amarilla, virus del dengue 3, virus del dengue 4 y virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, presentaron un resultado negativo.

La ausencia de reactividad cruzada con otros marcadores potencialmente interferentes se verificó utilizando materiales de referencia del panel de eficacia (Qnostics Ltd, Reino Unido) para el CMV («QCMD 2012 Human Cytomegalovirus (DNA) EQA Programme»), así como para el VEB («Epstein 2008 QCMD Barr virus (DNA) EQA Programme»), el VHS1 y VHS2 («Herpes Simplex virus 2008 QCMD (DNA) EQA Programme») y el VVZ («Varicella Zoster virus QCMD 2012 (DNA) EQA Programme»).

Cada muestra del panel se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Todas las muestras se confirmaron como negativas.

Sustancias interferentes

El posible efecto en la tasa de sustancias interferentes se evaluó analizando el panel «AcroMatrix® Inhibition Panel» (Life Technologies Inc.) con muestras que contenían sustancias endógenas potencialmente interferentes, procedentes de hemólisis, ictericia y lipemia, así como sustancias exógenas y los anticoagulantes EDTA y heparina. Las muestras del panel se enriquecieron con el material de referencia «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) a una concentración de 3 veces el LoD. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A.

Todas las muestras fueron positivas, pero la muestra que contenía heparina estaba inhibida (Ct del WNV y del Internal Control retrasados de forma considerable).

Ausencia de reactividad cruzada

La ausencia de contaminación cruzada se verificó analizando los resultados de tres sesiones en las que se alternaron muestras positivas para ARN de WNV con muestras negativas para ARN de WNV. Ninguna muestra negativa para ARN de WNV dio un resultado positivo.

Una muestra de sangre negativa para ARN de WNV se utilizó como muestra negativa y, después de añadir el material de referencia «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) a un título de 10.000 copias/mL, se utilizó como muestra positiva. Tres series de 6 muestras positivas, alternadas con 6 muestras negativas, se utilizaron para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre positiva para ARN de WNV	18	18	0
Sangre negativa para ARN de WNV	18	0	18

Tasa total de fallos del sistema

La tasa total de fallos del sistema que producía resultados falsos negativos se verificó analizando un panel de muestras enriquecidas con ARN de WNV a un título bajo. Ninguna muestra enriquecida con ARN de WNV dio un resultado negativo.

Una muestra de sangre negativa para ARN de WNV se enriqueció con el material de referencia «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) a un título de 1500 copias/mL. La muestra se utilizó en 60 duplicados para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre enriquecida con ARN de WNV	60	60	0

Reproducibilidad entre lotes

El ensayo de reproducibilidad entre lotes se verificó analizando la correlación y la variabilidad de los resultados obtenidos con el material de referencia y tres lotes de producto diferentes. El ensayo presentó un %CV de los valores de Ct inferior al 4 %.

Una muestra de sangre recogida en EDTA y negativa para ARN de WNV y el material de referencia «QCMD 2012 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) se utilizaron para preparar el siguiente panel de 12 muestras:

- 3 muestras enriquecidas a 1350 copias/mL (3 veces el LoD);
- 3 muestras enriquecidas a 450 copias/mL (1 vez el LoD);
- 3 muestras enriquecidas a 225 copias/mL (0,5 veces el LoD);
- 3 muestras negativas para WNV.

El panel fue utilizado por tres operadores diferentes junto con el sistema de extracción «ELITe STAR». Las muestras extraídas se sometieron a retrotranscriptasa y se amplificaron utilizando 3 lotes de productos de ELITechGroup S.p.A., en días diferentes y utilizandodiferentes instrumentos de amplificación en tiempo real. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Muestras	Positivas/ duplicados	Ct medio del WNV	DE	%CV	Ct medio del CI	DE	%CV
3xLoD	9/9	35,25	0,81	2,29	31,28	0,87	2,78
1xLoD	9/9	36,22	1,43	3,95	31,13	0,55	1,78
0,5xLoD	9/7	37,79	1,15	3,04	30,91	0,27	0,88
Negativas	0/9	-	-	-	30,88	0,39	1,27

Sensibilidad diagnóstica: confirmación de las muestras positivas

La sensibilidad diagnóstica del ensayo, definida como confirmación de las muestras clínicas positivas, se evaluó analizando algunas muestras clínicas de sangre, LCR y orina enriquecidas con ARN de WNV, dada la dificultad de encontrar un número pertinente de muestras clínicas positivas. La sensibilidad diagnóstica total fue del 96,5 %.

La prueba con sangre recogida en EDTA se realizó en 30 muestras de diferentes pacientes. Las muestras se enriquecieron en una primera serie con ARN de WNV de linaje 1 y, en una segunda serie, con el de linaje 2 del material de referencia «QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) a un título de 500 copias/mL. A la prueba con WNV de linaje 2 se le añadieron a continuación otras 10 muestras de sangre recogida en EDTA enriquecidas a un título de 500 copias/ mL. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre enriquecida con ARN de WNV de linaje 1	30	30	0
Sangre enriquecida con ARN de WNV de linaje 2	39	34	5
Total	69	64	5

Cinco muestras presentaron un resultado negativo con productos de ELITechGroup S.p.A., probablemente debido a la concentración cercana al LoD (447 copias/mL).

El resultado de una muestra fue «no válido» debido a la presencia de un inhibidor no identificado, por lo que esta no se incluyó en el cálculo de la sensibilidad diagnóstica.

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo cuando se utilizó sangre fue del 92,7 %.

La prueba con orina recogida sin conservantes se realizó en 30 muestras de diferentes pacientes. Las muestras se enriquecieron en una primera serie con ARN de WNV de linaje 1 y, en una segunda serie, con el de linaje 2 del material de referencia «QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) a un título/total de 500 copias/mL. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Orina enriquecida con ARN de WNV de linaje 1	30	29	1
Orina enriquecida con ARN de WNV de linaje 2	30	30	0
Total	60	59	1

Una muestra fue negativa con productos de ELITechGroup S.p.A., probablemente debido a la concentración cercana al LoD (318 copias/ mL).

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo cuando se utilizó orina fue del 98,3 %.

La prueba con LCR se realizó en 20 muestras de diferentes pacientes. Las muestras se enriquecieron en una primera serie con ARN de WNV de linaje 1 y, en una segunda serie, con el de linaje 2 del material de referencia «QCMD 2010 West Nile Virus (RNA) EQA Programme» (Qnostics Ltd, Reino Unido) a un título/total de 500 copias/mL. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
LCR enriquecido con ARN de WNV de linaje 1	20	20	0
LCR enriquecido con ARN de WNV de linaje 2	20	20	0
Total	40	40	0

En este análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo cuando se utilizó LCR fue del 100 %.

Especificidad diagnóstica: confirmación de las muestras negativas

La especificidad diagnóstica del ensayo, definida como la confirmación de las muestras negativas, se evaluó analizando muestras clínicas de sangre, LCR y orina que habían presentado un resultado negativo para ARN de WNV. La especificidad diagnóstica total fue del 100 %.

La prueba con sangre recogida en EDTA se realizó en 30 muestras de diferentes pacientes. Las muestras presentaron un resultado negativo para ARN de WNV utilizando un producto «casero» de amplificación en tiempo real. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Sangre negativa para ARN de WNV	24	0	24

Seis muestras presentaron un resultado «no válido» debido a la presencia de un inhibidor no identificado, por lo que estas no se incluyeron en el cálculo de la especificidad diagnóstica.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo cuando se utilizó sangre fue del 100 %.

La prueba con orina recogida sin conservantes se realizó en 30 muestras de diferentes pacientes. Las muestras presentaron un resultado negativo para ARN de WNV utilizando un producto «casero» de amplificación en tiempo real. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
Orina negativa para ARN de WNV	27	0	27

Tres muestras presentaron un resultado «no válido» debido a la presencia de un inhibidor no identificado, por lo que estas no se incluyeron en el cálculo de la especificidad diagnóstica.

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo cuando se utilizó orina fue del 100 %.

La prueba con LCR se realizó en 20 muestras de diferentes pacientes. Las muestras presentaron un resultado negativo para ARN de WNV utilizando un producto «casero» de amplificación en tiempo real. Cada muestra se utilizó para realizar el procedimiento entero de análisis, extracción, retrotranscriptasa y amplificación con productos de ELITechGroup S.p.A. Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Muestras	N	Positivas	Negativas
LCR negativo para ARN de WNV	20	0	20

En este análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo cuando se utilizó LCR fue del 100 %.

Nota: los datos y resultados completos de los análisis realizados para evaluar las características de rendimiento del producto se incluyen en la sección 7 de la documentación técnica del producto «WNV ELITe MGB® Kit», FTP RTS100PLD.

BIBLIOGRAFÍA

- F. J. May et al. (2011) *J. Virol.* Marzo vol. 85: 2964-2974
 E. M. Botha (2008) *Emerging Infectious Disease* vol. 14: 222-230
 T. Bakonyi (2006) *Emerging Infectious Disease* vol. 12: 618-623
 J. H. Scherret (2001) *Emerging Infectious Disease* vol. 7: 697-705
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

PROBLEMAS Y SOLUCIONES

No se ha detectado el ADN diana en las reacciones del calibrador «Q-PCR Standard» o el coeficiente de correlación de la curva de calibración no es válido	
Posibles causas	Soluciones
Error en la preparación de la mezcla completa de reacción.	Comprobar los volúmenes de los reactivos distribuidos durante la preparación de la mezcla completa de reacción.
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Distribuir con cuidado las reacciones en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo. Comprobar los volúmenes de la mezcla de reacción distribuida. Revisar los volúmenes del calibrador distribuido.
Degradación de la sonda.	Utilizar una nueva alícuota de PreMix.
Degradación de la mezcla «PCR MasterMix».	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla «PCR MasterMix».
Degradación del calibrador.	Usar una nueva alícuota de calibrador.
Error de configuración del instrumento.	Comprobar la configuración de las posiciones para las reacciones del calibrador en el instrumento. Comprobar la configuración del ciclo térmico en el instrumento.

Se ha detectado el ADN/ARN diana en la reacción del Negative Control	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta en los pocillos de la microplaca.	Evitar derramar el contenido de la probeta de la muestra. Cambiar siempre las puntas entre una muestra y otra. Distribuir con cuidado las muestras, los controles negativos y los calibradores en los pocillos de la microplaca y seguir las instrucciones de la hoja de trabajo.
Error al configurar el instrumento.	Comprobar la configuración de las posiciones de las muestras, de los controles negativos y de los calibradores en el instrumento.
Sellado incorrecto de la microplaca.	Proceder con cuidado al sellar la microplaca.
Contaminación del agua de calidad para biología molecular.	Utilizar una nueva alícuota de agua de calidad para biología molecular.
Contaminación de la mezcla completa de reacción.	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla completa de reacción.
Contaminación del área de extracción/preparación para las reacciones de amplificación.	Limpiar las superficies y los instrumentos con detergentes acuosos, lavar las batas de laboratorio y sustituir las probetas y las puntas utilizadas.

El ARN diana y del Internal Control no se ha detectado en las reacciones de la muestra	
Posibles causas	Soluciones
Preparación incorrecta de la mezcla completa de reacción.	Revisar los volúmenes de reactivos distribuidos durante la preparación de la mezcla completa de reacción. Verificar que se haya añadido «RT EnzymeMix» a la mezcla completa de reacción.
Degradación de la mezcla «RT EnzymeMix».	Utilizar una nueva alícuota de la mezcla «RT EnzymeMix».
Almacenamiento incorrecto de los reactivos.	Asegurarse de que la mezcla «RT EnzymeMix» no se haya expuesto a temperaturas superiores a -20°C durante más de 10 minutos. Asegurarse de que la mezcla completa de reacción no se haya expuesto a temperatura ambiente durante más de 30 minutos.
Problemas durante la extracción.	Verificar la calidad y la concentración del ARN extraído.

Fluorescencia de fondo irregular o alto en las reacciones	
Posibles causas	Soluciones
Distribución incorrecta de la muestra.	Mezclar con cuidado las muestras, los controles negativos y los calibradores en la mezcla de reacción, pipeteando minuciosamente tres veces. Evitar la formación de burbujas.
Error de configuración del punto de referencia.	Configurar el rango de cálculo de referencia entre los ciclos en los que la fluorescencia de fondo ya se ha estabilizado (comprobar los datos de «Results» o «Component») y la fluorescencia de la señal no ha empezado aún a aumentar, p. ej., del ciclo 6 al ciclo 15. Utilizar el cálculo automático del punto de referencia configurando la opción «Auto Baseline».

Curva de disociación anómala	
Posibles causas	Soluciones
Ausencia de un pico definido. Pico definido, pero diferente del de otras muestras y del de los calibradores o del control positivo.	Verificar que el Ct del detector FAM esté por debajo de 30. Una alta cantidad de producto de amplificación al final de la reacción puede interferir con el análisis de la curva de fusión. Repetir la amplificación de la muestra para confirmar la presencia del ARN diana con una posible mutación. El ARN diana de la muestra debe secuenciarse para confirmar la mutación.

SÍMBOLOS

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

AVISO PARA EL COMPRADOR: LICENCIA LIMITADA

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

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

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

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