

# GUÍA DEL USUARIO

CE 0197

Innovation • Value • Discovery

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> CMV de PCR Cuantitativa



**REF**

**CMV-1111**

**IVD**

Kit de prueba  
cuantitativa

**EC REP**

MT Promedt Consulting GmbH Altenhofstr. 80  
D-66386 St. Ingbert. Alemania. Tel +49 6894-58 10 20

# Kit *AccuPower*<sup>®</sup> CMV de PCR Cuantitativa

## Guía del Usuario



Versión No.: 4.4 (26-05-2021)

Lea Todo el contenido de esta Guía del Usuario antes de utilizar este kit



**BIONEER Corporation**  
8-11, , Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon,  
34302, República de Corea

Tel: +82-42-930-8777

Fax: +82-42-930-8688

Email: [sales@bioneer.co.kr](mailto:sales@bioneer.co.kr)

[www.bioneer.com](http://www.bioneer.com)

## Uso Previsto

El Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa es un kit de diagnóstico *in vitro* diseñado para la cuantificación de ADN de CMV (Citomegalovirus) en plasma humana, suero, orina o sangre completa mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) usando el Sistema Universal MDX *ExiStation*™ (semi-automático). El Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa está destinado para usarse en conjunto con la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio para el seguimiento del pronóstico o el tratamiento del paciente mediante la medición de la carga viral de CMV. Este kit se utiliza para monitorear a los pacientes infectados por CMV. Este kit es un ensayo cuantitativo únicamente para uso profesional. No está destinado para diagnósticos clínicos iniciales de infección por CMV, como un examen de CMV

## Advertencias y Precauciones de Seguridad

Para las Fichas Técnicas de Seguridad de Materiales (MSDS), por favor contacte a Atención al Cliente de BIONEER.

Verifique la integridad de todos los componentes del kit y otros materiales antes de su uso.

Todos los materiales potencialmente peligrosos (por ej. materiales que puedan entrar en contacto con ejemplares clínicos) deben ser procesados y desechados de acuerdo con las regulaciones locales y federales adecuadas y correspondientes en las cuales este producto está siendo utilizado. Cumpla con los procedimientos generales de seguridad clínica en el laboratorio durante el experimento.

## Garantía y Responsabilidad

Todos los productos BIONEER son fabricados y probados bajo protocolos estrictos de control de calidad. BIONEER garantiza la calidad de todos los productos fabricados directamente hasta la fecha de vencimiento en la etiqueta. Si se descubre algún problema relacionado que comprometa la calidad del producto, contacte al Centro de Atención al Cliente de BIONEER ([order@bioneer.com](mailto:order@bioneer.com)).

BIONEER no asume la responsabilidad por el uso indebido del producto, es decir el uso del producto que no sea para el fin previsto, como se describe en la *Guía del Usuario* correspondiente y aplicable. BIONEER garantiza la responsabilidad bajo la condición de que el usuario divulgue toda la información relacionada con el problema a BIONEER por escrito dentro de los 30 días posteriores a la ocurrencia.

## Aviso Legal

Algunas aplicaciones que pueden realizarse con este kit pueden infringir patentes existentes en ciertos países. La compra de este kit no incluye ni brinda una licencia para realizar dichas aplicaciones patentadas. Es posible que los usuarios deban obtener una licencia en función del país y de la aplicación. BIONEER no aprueba ni recomienda el uso sin licencia de ninguna aplicación patentada.

El uso de este kit es solo para usuarios calificados y bien capacitados en el manejo de los ejemplares clínicos y de experimentos biológicos moleculares. Después de la prueba, todos los desperdicios deberán ser procesados con el cumplimiento del reglamento del país.

## **Marcas Registradas**

*AccuPower*® es una marca comercial registrada de BIONEER Corporation, República de Corea.

*ExiStation*™, *Exicycler*™ 96, *ExiSpin*™ y *ExiPrep*™ son marcas comerciales de BIONEER Corporation, República de Corea.

FAM y TAMRA son marcas comerciales de Applera Corporation.

Excel™ es una marca comercial registrada de Microsoft Corporation.

## **Derechos reservados**

Derechos reservados 2021. Bioneer Corporation. Todos los derechos reservados

## **Aviso**

BIONEER Co., Ltd. se reserva el derecho de hacer correcciones, modificaciones, mejoras y otros cambios en sus productos, servicios, especificaciones o descripciones de productos en cualquier momento sin previo aviso. Toda la información suministrada aquí está sujeta a cambios sin previo aviso.

## Contenido

1. USO PREVISTO .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	1
3. CARACTERÍSTICAS Y PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	1
4. COMPONENTES DEL KIT E INSTRUMENTOS COMPATIBLES .....	2
5. ALMACENAMIENTO Y FECHA DE VENCIMIENTO .....	3
6. MATERIALES Y EQUIPOS REQUERIDOS (NO PROPORCIONADOS EN EL KIT) 3	
7. PRECAUCIONES GENERALES .....	4
8. PROTOCOLO .....	6
8.1. Preparación .....	6
8.2. Ejemplares .....	7
8.3. Flujo de Trabajo .....	8
8.4. Procedimiento experimental ( <i>ExiStation</i> <sup>™</sup> ) .....	9
8.5. Procedimiento Experimental ( <i>ExiStation</i> <sup>™</sup> 48, <i>ExiStation</i> <sup>™</sup> 48A).....	29
8.6. Proceso de manejo de desperdicios experimentales .....	41
9. ANÁLISIS DE DATOS .....	43
10. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS .....	45
11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO .....	47
12. REFERENCIAS .....	60
13. SÍMBOLOS .....	61

## 1. USO PREVISTO

El Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa es un kit de diagnóstico in vitro diseñado para la cuantificación de ADN de CMV (Citomegalovirus) en plasma humano, suero, orina o sangre completa mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) usando el Sistema Universal MDx de *ExiStation*™ (semiautomático). El Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa está destinado para usarse en conjunto con la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio para el seguimiento del pronóstico o el tratamiento del paciente mediante la medición de la carga viral de CMV. Este kit se utiliza para monitorear a los pacientes infectados por CMV. Este kit es un ensayo cuantitativo únicamente para uso profesional. No está destinado para diagnósticos clínicos iniciales de infección por CMV, como un examen de CMV.

## 2. INTRODUCCIÓN

El Citomegalovirus (CMV) es un tipo de virus del herpes que posee una doble hélice de ADN y una cápsula icoseádrica. También es llamada HHV-5; el período de copia del virus es lento y genera citomegalia. El virus se esconderá dentro de varios órganos, incluyendo las estructuras linfoides y riñones, y las infecciones por CMV a temprana edad no afectan significativamente la salud. La infección es de por vida, con aproximadamente el 10% de la población mundial esparciendo el virus a través del plasma, saliva, y leche materna. Las infecciones adultas ocurren principalmente a través de la transfusión de sangre, semen afectado, o por trasplante de órganos. Este tipo de infección trae síntomas severos incluyendo fiebre, esplenomegalia, y disfunción hepática.

El método tradicional de diagnóstico por infección por CMV es mediante el cultivo. El virus toma aproximadamente 6 semanas en crecer y es extremadamente sensible a la temperatura. El ensayo de antigenemia es más sensible y semi-cuantitativo por otros métodos, pero es laborioso y requiere varios pasos.

## 3. CARACTERÍSTICAS Y PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La PCR en tiempo real implica la amplificación selectiva de una secuencia de objetivos mientras se monitorea el progreso de la amplificación en tiempo real a través de un agente de visualización como un tinte fluorescente. La especificidad es proporcionada por un par de cebadores específicos, junto con una sonda de hidrólisis la cual también es una secuencia específica. El monitoreo del producto amplificado se lleva a cabo mediante el etiquetado de la sonda de hidrólisis con un par apareado de tintes fluorescentes (5' – Informante fluorescente; 3' – Inhibidor). Debido a la transferencia de energía de la resonancia fluorescente (FRET), una sonda intacta no emitirá luz. Sin embargo, al momento de la segmentación mediante la actividad exonucleasa de 5' – 3' de la polimerasa de ADN durante el PCR, la molécula informante fluorescente emitirá una longitud de onda específica de luz dentro del espectro visible cuando se haya segmentado después de aglomerarse al amplicon.

Los reactivos en este kit, incluyendo cebadores, ADN polimerasa, dNTPS y sales, todos son secados al vacío usando nuestra tecnología de estabilización patentada. Esto preserva toda la actividad de la mezcla de los reactivos, maximiza la amplificación de eficiencia de los reactivos para coincida con el programa del termociclador utilizado con los Kits de diagnóstico *AccuPower*®, y permite que el kit se ejecute sin esfuerzo con otros Kits de diagnóstico *AccuPower*® para una mayor facilidad de uso.


#### 4. COMPONENTES DEL KIT E INSTRUMENTOS COMPATIBLES

##### 4.1. Componentes del kit



Fig. 1 Kit AccuPower® CMV de PCR Cuantitativa

Table1. Componentes del Kit AccuPower® CMV de PCR Cuantitativa

No.	Reactivo	Unidad	Cantidad	Función	Comentario
①	Tubos qPCR premezclados de CMV	tira de 8 pozos 12 c/u (96 pruebas) (en bolsas de papel aluminio)	1 paquete	Amplificación del AN	 Advertencia de peligro e irritación
②	CMV SPC <sup>a</sup> (S1) (2.500 copias/mL)	1300 µl / tubo (Tubo de rosca transparente de 2 mL)	1 tubo	Calibración	
	CMV SPC (S2) (25.000 copias/mL)		1 tubo		
	CMV SPC (S3) (250.000 copias/mL)		1 tubo		
	CMV SPC (S4) (2.500.000 copias/mL)		1 tubo		
	CMV SPC (S5) (25.000.000 copias/mL)		1 tubo		
③	CMV LPC <sup>b</sup> (2.500 copias/mL)	1300 µl / tubo (Tubo de rosca azul de 2 mL)	3 tubos	Control Positivo	
	CMV HPC <sup>c</sup> (250.000 copias/mL)	1300 µl / tubo (Tubo de rosca rojo de 2 mL)	3 tubos	Control Positivo	
④	CMV NTC <sup>d</sup>	1300 µl / tubo (Tubo atornillable transparente de 2 mL)	3 tubos	Control sin plantilla	
⑤	Neutralizador SL	1300 µl / tubo	2 tubos	Dilución de la	

		(Tubo de rosca transparente de 2 ml)		muestra
⑥	Película óptica selladora	-	1 c/u	Sellado del pozo de premezcla
⑦	Manual Rápido	-	1 c/u	
⑧	Gufa del Usuario	-	1 c/u	Proporcione por e-mail o directamente
a : Control Positivo estándar    b : Control Positivo bajo    c : Control Positivo alto    d : Control sin plantilla				

#### 4.2. Instrumentos Compatibles

El Kit *AccuPower®* CMV de PCR Cuantitativa está optimizado para su uso con el sistema *ExiStation™*. Para las instrucciones detalladas de funcionamiento para cada dispositivo, consulte la sección PROTOCOLO de la Guía del Usuario específica del instrumento.

### 5. ALMACENAMIENTO Y FECHA DE VENCIMIENTO



El Kit *AccuPower®* CMV de PCR Cuantitativa en tiempo real debería almacenarse desde -25 a -15°C, lejos de los rayos UV/ luz solar. Se garantiza que el kit sea estable hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta. Debe evitarse el descongelado y congelado repetido (más de una vez) de los componentes, ya que esto puede reducir el rendimiento del ensayo. Si se espera un uso intermitente del kit y del componente (tubos qPCR de premezcla para CMV, los SPCs, y PCs), los tubos de qPCR de premezcla para CMV sean estables por hasta 4 ciclos de congelado/descongelado, y los SPCs (CMV SPC (S1)-(S5))/ PCs (HPC/LPC) sean estables por hasta 4 congelado/descongelado.

### 6. MATERIALES Y EQUIPOS REQUERIDOS (NO PROPORCIONADOS EN EL KIT)

- Tubo de carga de muestra de ADN IPC
- Guantes desechables, sin talco
- Juego de pipetas de volumen apropiado
- Puntas de pipetas esterilizadas con filtros
- Micro tubos de 1.5 ml o tubos cónicos de 15 ml
- Protocolo equivalente y materiales necesarios para extraer el ácido nucleico
- Tubo de carga de muestra



**Tabla 2. Reactivo y equipo de extracción necesarios**

Sistema	Instrumento	Reactivo (Extracción)
<b>ExiStation™ (A-2200)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>ExiPrep™</i> 16 Dx (Cat. No. A-5050)</li> <li>-Bloque térmico cuantitativo en tiempo real <i>Exicycler™</i> 96 (Cat. No. A-2060)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ADN Viral (K-4472)</li> <li>- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ADN/ARN Viral (K-4471)</li> <li>- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de sangre ADN Viral (K-4474)</li> <li>- Tubo de carga de muestra_ADN IPC (Cat. No. KA-3010)</li> </ul>
<b>ExiStation™ (A-2200-N)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>ExiPrep™</i> 16 Dx (Cat. No. A-5050)</li> <li>-Bloque térmico cuantitativo en tiempo real <i>Exicycler™</i> 96 (Cat. No. A-2060-1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ADN/ARN Viral (K-4471)</li> <li>- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ADN Viral (K-4472)</li> <li>- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de sangre ADN Viral (K-4474)</li> <li>-Tubo de Carga de Muestra_ADN IPC (Cat. No. KA-3010)</li> </ul>
<b>ExiStation™ 48 (A-2400) ExiStation™ 48A (A-2410)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>ExiPrep™</i> 48 Dx (Cat. No. A-5150)</li> <li>- Bloque térmico cuantitativo en tiempo real <i>Exicycler™</i> 96 (Cat. No. A-2060-1)</li> <li>-<i>ExiLT</i> (Cat.No. A-7100)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ADN/ARN Viral (K-4571)</li> <li>- Tubo de carga de muestra_IPC <i>Exiprep™</i> (KA-4501)</li> </ul>
<b>Otros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>ExiSpin™</i> (Cat. No. A-7040)</li> </ul>	N/A

## 7. PRECAUCIONES GENERALES

- Este kit es compatible únicamente con el Bloque Térmico Cuantitativo en tiempo real *Exicycler™* 96.
- Todos los ejemplares de pacientes deberían manipularse como material infeccioso.
- Utilice equipo de protección personal (máscaras, guantes, etc.) cuando maneje los reactivos y los ejemplares clínicos biológicamente peligrosos.
- Cambie los guantes después del contacto con contaminaciones potenciales, por ej. ejemplares, eluyentes, etc.
- Lávese las manos a fondo después de la manipulación de ejemplares y reactivos y quítese los guantes.
- No pipetee oralmente.
- No coma, beba o fume en áreas especializadas de trabajo.
- La premezcla en este kit no es reutilizable. No reutilice los reactivos de distintos lotes de producción.
- No omita los pasos experimentales o haga cambios al procedimiento validado provisto.
- Siempre use puntas de pipeta filtradas y esterilizadas.
- Almacene las muestras clínicas y sus derivados en una ubicación/congelador separado de los reactivos y controles.
- No congele la sangre completa o cualquier muestra almacenada en un tubo primario.
- Los componentes congelados del kit deberían descongelarse lentamente al menos por 10 minutos y agitarse y centrifugarse brevemente después de descongelarlos para garantizar resultados óptimos.

- Gire rápidamente y centrifugue todos los componentes del kit por poco tiempo después de descongelarlos para garantizar resultados óptimos.
- Maneje los Controles Positivos (CP) en una ubicación físicamente separada de donde sea reconstituida la mezcla del reactivo.
- Tener cuidado cuando se use una tijera o cúter.
- Limpie y desinfecte los ejemplares derramados y/o en el área de trabajo dedicada con 0.5% de hipoclorito de sodio en agua destilada o desionizada (1:10 dilución de lejía de uso doméstico) y debería enjuagarse a fondo con etanol de 70% o agua destilada.
- **Todos los materiales potencialmente peligrosos (por ej. materiales que puedan entrar en contacto con los ejemplares clínicos) deben ser procesados y desechados de acuerdo con las regulaciones locales y federales adecuadas y correspondientes en las cuales este producto está siendo utilizado.**

## 8. PROTOCOLO

### 8.1. Preparación

Recomendamos que sean tomadas muchas medidas de precaución para la seguridad del usuario y del laboratorio, y además para la prevención de la contaminación ambiental del laboratorio.

#### 8.1.1. Equipamiento y ambiente de laboratorio

Las banquetas presurizadas están divididas en banquetas de presión positiva y banquetas de presión negativa. Las banquetas de presión positiva (por ej. banquetas de limpieza) empujan aire hacia el exterior en el laboratorio manteniendo el espacio de trabajo limpio. Las banquetas de presión negativa (por ej. cabinas de bioseguridad, campanas extractoras, etc.) extraen aire del laboratorio hacia el entorno externo. Los contenedores esterilizados tales como los Cartuchos neutralizadores (por ej., la serie de kits de preparación *ExiPrep™* Dx) deben tomarse para mantener la esterilidad de los componentes del kit después de moverlos dentro de un ambiente de presión positiva.

Las muestras clínicas, especialmente aquellas con alta patogenicidad, deben manejarse en una cabina de bioseguridad de presión negativa (Clase II o III). Esto es crítico para la seguridad del operador y otro personal.



Fig. 2 Cabina de Bioseguridad (BSC) y Banqueta de limpieza

## 8.2. Ejemplares



Todas las muestras deben tratarse como potenciales peligros biológicos. Para mejores resultados, recomendamos ADN extraído a partir de las muestras plasma EDTA humanas, suero humano, sangre completa humana u orina humana.

### 8.2.1. Recopilación de Ejemplares

El Kit *AccuPower*® CMV de PCR cuantitativa está optimizado para el ADN extraído a partir del plasma EDTA humano, suero, sangre completa u orina. Para la sangre completa, la sangre tiene que ser recolectada comercialmente con sistemas estándares de recolección de sangre. Los tubos deberían ser mezclados directamente después de la recolección de muestra. Para el plasma-EDTA, pueden utilizarse tubos de ejemplares de recolección estándar conteniendo EDTA como anticongelante. Para el suero, la sangre debería ser recolectada en los Tubos de preparación de suero SST™. Todas las muestras deberían guardarse en contenedores sin preservantes.

### 8.2.2. Transporte de Ejemplares

Todos los ejemplares deberían ser transportados en un contenedor de transporte a prueba de choques para evitar una posible infección a causa de una fuga de la muestra. Las muestras deberían ser transportadas de acuerdo con las directrices locales o nacionales respecto al transporte de peligros biológicos.

### 8.2.3. Almacenamiento de los ejemplares

Tipo de Ejemplar	Temperatura de almacenamiento	Duración
Sangre (EDTA-Plasma/Suero)	2-8°C	72 horas
	25-30°C	24 horas
EDTA-Plasma Suero Orina	25-30°C	24 horas
	2-8°C	6 días
	-15 a -25°C	6 meses
	Descongelación	4 ciclos
Sangre completa	25-30°C	24 horas
	2-8°C	6 días

### 8.2.4. Sustancias Interferentes

Las muestras clínicas pueden contener una variedad de inhibidores de PCR. Para un PCR eficiente, dichos inhibidores deben ser removidos durante el proceso de extracción y purificación del ADN.

### 8.3. Flujo de Trabajo

El Kit *AccuPower®* CMV de PCR cuantitativa es compatible únicamente con el sistema *ExiStation™*.

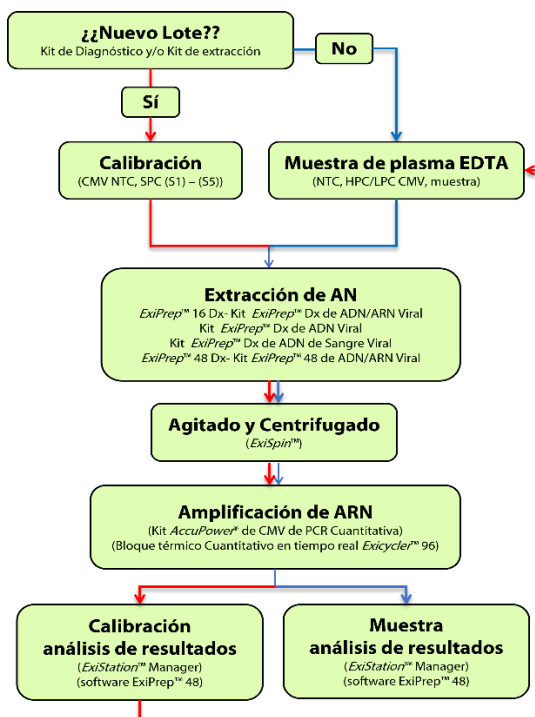


Fig. 3 Flujo de trabajo

Cuando utilice el kit con el sistema '*ExiStation™*', tanto la extracción del ácido nucleico como la PCR debe ser llevada a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en la Guía del Usuario de *ExiStation™*. La PCR puede realizarse sin pasos adicionales para la preparación de la mezcla de PCR cuando se utiliza con el sistema *ExiStation™*. Después que la PCR esté completa, los datos pueden analizarse automáticamente mediante el software *ExiStation™*. Para instrucciones más detalladas del funcionamiento, por favor consulte a la Guía de Usuario de *ExiStation™*.

## 8.4. Procedimiento experimental (*ExiStation™*)

### 8.4.1. Extracción del Ácido nucleico– *ExiPrep™* 16 Dx

\* Por favor, consulte al Kit *ExiPrep™* Dx de ADN/ARN Viral, Kit *ExiPrep™* Dx de ADN Viral, Kit *ExiPrep™* ADN Viral de la sangre o la guía del usuario de *ExiPrep™* para el flujo de trabajo básico.

#### 8.4.1.1. Asignación de uso de pruebas del programa *ExiStation™* Manager

- 1) Enciende la computadora, que ya tiene pre-instalado el software *ExiStation™* Manager.
- 2) Ejecute el software *ExiStation™* Manager haciendo clic en el ícono ubicado en el escritorio.



Fig. 4 Ícono del Software *ExiStation™* Manager

- 3) Enciende el *ExiPrep™* 16 Dx presionando el botón de encendido ubicado al frente del instrumento. Presione el botón 'STARTING (INICIANDO)' mostrado en la LCD para inicializar el instrumento.



Fig. 5 Fig. 3 Botón de arranque y botón principal de encendido del *ExiPrep™* 16 Dx

- 4) Presione el botón 'MISC SET (AJUSTES MISC)' en la pantalla LCD (o el botón 'LOAD' en el software).



Fig. 6 Pantalla LCD del *ExiPrep™* 16 Dx y botón de carga del software *ExiStation™* Manager

- 5) Adjunte el papel filtro sobre el Protector de Contaminación. Luego instale el Protector de contaminación y el Protector de la punta del instrumento. Presione el botón 'Misc Set (AJUSTES MISC)' una vez instalado.

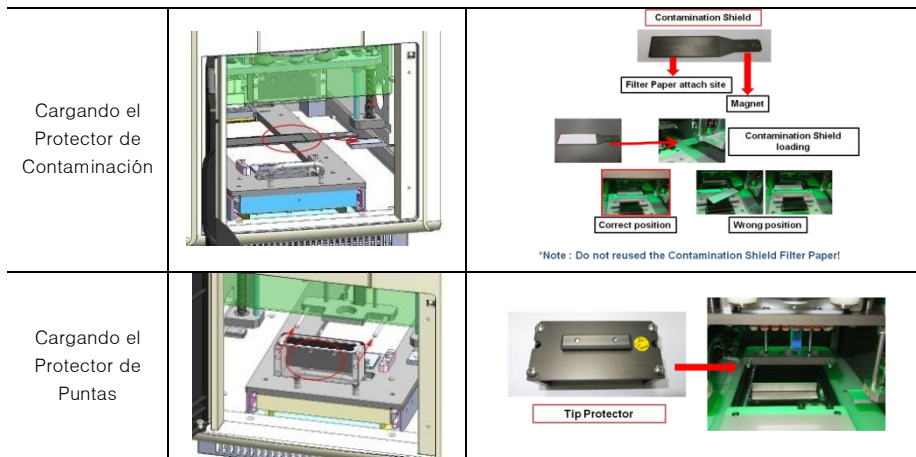


Fig. 7 Cargando el Protector de Contaminación y el Protector de la punta

- 6) El Software *ExiStation™* Manager tiene seis partes distintas.

**Prep** – extracción del ácido nucleico de control (instrumento *ExiPrep™* 16 Dx),

**Assign PCR (Asignar PCR)** – transfiere la información de la muestra desde 'Prep' hasta 'PCR' (*Exicycler* 96) y asigna para la ejecución de la PCR

**PCR** – muestra las condiciones de amplificación en tiempo real (*Exicycler™* 96)

**Resultado** – Cuando la PCR está completa, presente el resultado, experimento e información de muestra.

**Configuration (Configuración)** – información de ajuste del software (accesible solo por el fabricante)

**Version (Versión)** – versión actual del software

- 7) Haga clic en la pestaña '**Prep (Preparación)**' en la parte superior izquierda de la pantalla principal para iniciar el proceso de extracción del ácido nucleico.



Fig. 8 Pantalla principal del software *ExiStation™* Manager

El panel de control de preparación consta de 5 paneles.

**Panel de estado de los instrumentos** – estado de *ExiPrep™* 16 Dx

**Panel de Selección de Kits** – Selecciona/introduce la información del kit de diagnóstico, kit de preparación, e información de lote (o escanee el código de barras de los kits)

**Panel de información de muestra y control** – Ingresa el control (NTC, PC, SPC) y la muestra (o escanee el código de barras de la muestra)

**Panel de Información de pozo** – Represente la información del pozo con un color diferente

**Panel de control *ExiPrep™* 16 Dx** – Botón de control del *ExiPrep™* 16 Dx incluye controlador UV, controlador de almacén, controlador de ejecución, controlador de ajustes MISC

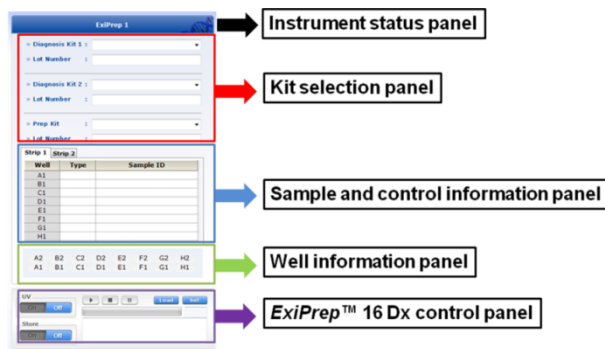


Fig. 9 Preparación del panel de control del software *ExiStation™* Manager

- 8) Haga clic en la flecha desplegable para el 'Diagnosis Kit 1 (Kit de Diagnóstico 1)'. Una ventana emergente aparecerá. Después de seleccionar el 'Diagnostic Kit (Kit de Diagnóstico)', aparecerá una ventana emergente. Inspeccione el Cartucho neutralizador y marque el (los) pozo(s) que ha sido utilizado haciendo clic sobre la ubicación correspondiente a ellos a partir de la muestra de asignación. Luego seleccione 'OK' para terminar.



- 9) Seleccione 'CMV-1111' de los menús desplegables (Tipo de muestra: Plasma EDTA, suero o selección de orina 'CMV-1111' / Tipo de muestra: Sangre completa humana, seleccione 'CMV-11112'). Automáticamente aparecerá una ventana emergente del 'Prep Kit (Kit de Preparación)' apropiado para el kit de diagnóstico seleccionado.

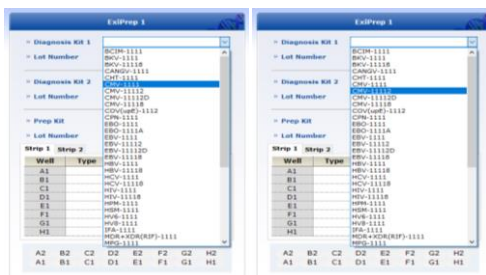


Fig. 10 Selección del kit de diagnóstico (CMV-1111 y CMV-11112)

- 10) El programa asigna automáticamente los pozos NTC y SPC (o LPC, HPC). Ingrese el número de lote del kit de diagnóstico y el kit de preparación. Si el lote de kit de diagnóstico es nuevo, el programa automáticamente asigna el NTC y SPC S1 a S5. Cuando la combinación del mismo lote de kit de diagnóstico y el kit de extracción son utilizados para ensayo previo, la curva estándar es guardada automáticamente y solo 1 LPC (Control positivo bajo) y 1 HPC (Control positivo alto) son asignados como un control positivo.

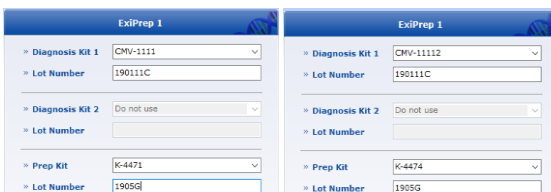


Fig. 11 Ingrese el Número de Lote

- 11) Si bien el Número del lote para el kit de diagnóstico y/o el kit de preparación es nuevo, se mostrará la ventana de Notificación que pide la Calibración Estándar.

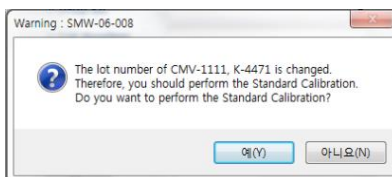


Fig. 12 Mensaje emergente para el proceso de calibración

- 12) Cuando salga el mensaje emergente “Select Lane & Well (Seleccionar Carril y Pozo)”, seleccione el (los) pozo(s) a utilizar. Luego, compruebe el (los) pozo(s) que han sido utilizado/s en el Cartucho neutralizador ①. Luego, haga click a la posición de el (los) pozo(s) utilizado(s), y aparecerá un signo de “X” sobre la posición seleccionada del pozo. Para completar, haga clic en el botón “OK”. Si no hay ningún pozo/s usado, procede al siguiente paso haciendo clic en ‘OK’.

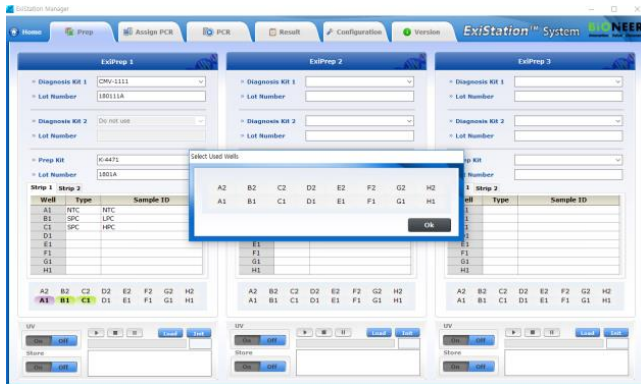


Fig. 13 Pantalla de ‘Selección de carril y pozo’

- 13) La asignación para NTC y SPC se ajustan automáticamente en el resto del (de los) pozo(s) . El ajuste principal es NTC, y cada SPC 1-5.

△ Si el experimento es repetido con el mismo lote de combinación extracción/diagnóstico del kit, CPB (Control Positivo Bajo) y CPA (Control Positivo Alto) se establecen en 1 pozo cada uno en lugar de SPC1-5 porque es usada la curva estándar guardada automáticamente.

- 14) Una vez terminada la generación de la curva estándar, procede al siguiente experimento utilizando las muestras clínicas. Si el experimento funciona, aparecerá la información en la curva estándar y la posición correcta de NTC/LPC/HPC. Luego haga clic en ‘Sample ID (Identificación de muestra)’ e introduce la información de la muestra manualmente o escanee el código de barra.

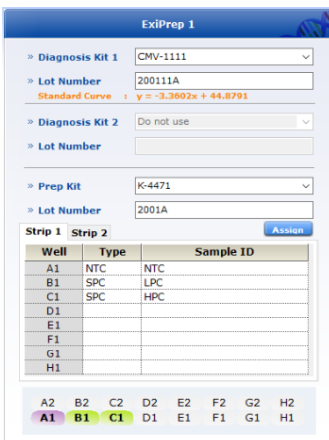


Fig. 14 Ingrese la información de la muestra

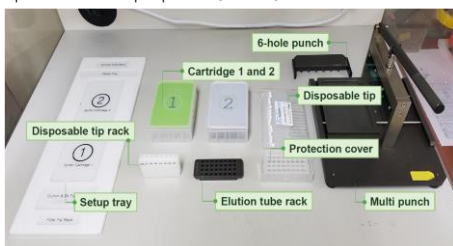
### 8.4.1.2. Extracción del ácido nucleico mediante el *ExiPrep*™ 16 Dx

- 1) BIONEER recomienda utilizar la BSC (Clase II, III) y la banqueta de limpieza para la operación del sistema *ExiStation*™.
- 2) Limpie la superficie (preferiblemente una banqueta de limpieza) donde se realizará el trabajo.

⚠ Limpie la superficie con hipoclorito de sodio al 0.5% en agua destilada o desionizada y enjuague con agua destilada o Et-OH al 70%, antes y después de su uso para evitar la contaminación. Después de cada uso, encienda la lámpara UV para eliminar los contaminantes.

⚠ Apague la lámpara UV mientras la BSC está en uso.

- 3) Prepare el kit de preparación de ácido nucleico en la Banqueta de limpieza 1.



No.	Componentes	Extracción del kit o instrumento
1	Bandeja de utensilios	<i>ExiPrep</i> ™ 16 Dx
2	Cartucho 1 y 2	Kit de extracción
3	Gradilla para puntas desechables	<i>ExiPrep</i> ™ 16 Dx
4	Gradilla de tubos de elución	<i>ExiPrep</i> ™ 16 Dx
5	Puntas desechables	Kit de extracción
6	Cubierta de protección	Kit de extracción
7	Perforadora de 6 hoyos	<i>ExiPrep</i> ™ 16 Dx
8	Perforadora múltiple	Opcional

Fig. 15 Lista de componentes necesarios para la extracción de ácido nucleico

- 4) Retire la envoltura retráctil que encierra ambos cartuchos neutralizadores ① y ② y luego retire las tapas acrílicas.

⚠ Inspeccione los pozos del Cartucho neutralizador y cerciórese de que todos los líquidos estén en la parte inferior de los pozos.



Fig. 16 Remoción de las tapas acrílicas

- 5) Perfore la cinta con la Perforadora de Hoyos de acuerdo con el diseño mapeado en el software.

⚠ Una incorrecta perforación de la cinta puede causar un mal funcionamiento del instrumento. Empuje la perforadora con firmeza para asegurarse de que el cartucho neutralizador esté perforado apropiadamente.

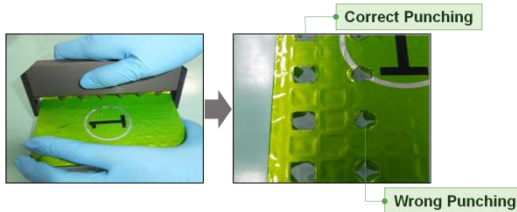


Fig. 17 Perforación de la cinta con la Perforadora

- 6) Cubre los cartuchos neutralizadores ① y ② con las tapas acrílicas después de que la perforación de la película esté completa.
- 7) Cargue los Cartuchos neutralizadores en la bandeja de utensilios.

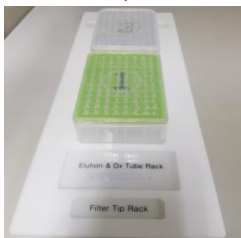


Fig. 18 Carga de los cartuchos neutralizadores en la Bandeja de utensilios.

- 8) Tome el número necesario de tiras del tubo de premezcla de CMV del congelador. Retire el papel aluminio que cubre los tubos. Inserte la cantidad apropiada de tubos de premezcla de CMV en la Gradilla de tubos de elución. Recomendamos el marcaje de cada tira de los tubos de diagnóstico con el número de columna correspondiente.

- ⚠ **Usted DEBE cerciorarse de que los tubos de diagnóstico hayan sido marcados de manera que se pueda identificar después.**
- ⚠ **Debajo de la gradilla de tubos de elución, hay una ranura ajustada para el instrumento *ExiPrep™ 16 Dx*. Cuando se ve desde arriba coloque el lado de la ranura hacia abajo e inserte los tubos de premezcla en las dos filas superiores.**

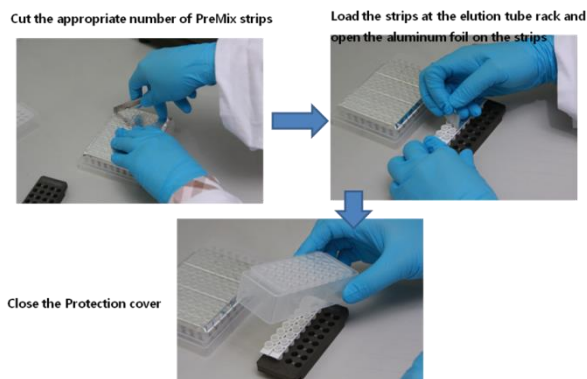


Fig. 19 Introducción de los tubos de premezcla de CMV dentro la Gradilla de tubos de elución

- 9) Sujete la Cubierta de Protección dentro de la Gradilla de tubos de elución.

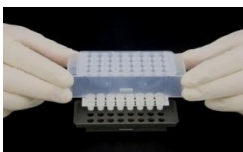


Fig. 20 Cubierta de Protección

- 10) Cargue la Gradilla de tubos de elución (que contiene el kit de diagnóstico) en la Bandeja de utensilios.
- 11) Cargue el número apropiado de puntas desechables en la Gradilla de las puntas desechables. Coloque la Gradilla de puntas desechables en la bandeja de utensilios.

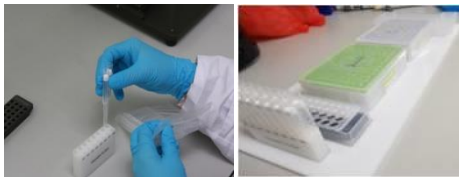


Fig. 21 Carga de las puntas de filtro desechables a la bandeja de utensilios.

- 12) Cargue la bandeja de utensilios al *ExiPrep™* 16 Dx. Abra la puerta del instrumento y saque la placa base.
- 13) Coloque el Cartucho neutralizador ② sobre el bloque térmico de la placa base.

⚠ Si el Cartucho neutralizador ② no está colocado adecuadamente en el bloque térmico, puede resultar en una falla del experimento o una averfa del instrumento.

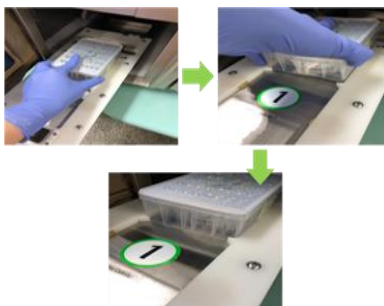


Fig. 22 Carga del cartucho neutralizador ②

- 14) Cargue el Cartucho neutralizador ① en la placa base.

⚠ Coloque el Cartucho neutralizador ① ligeramente inclinado hacia el lado izquierdo de la placa base y presione el lado derecho del cartucho firmemente.

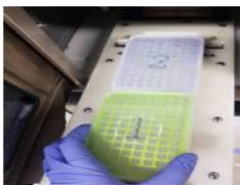


Fig. 23 Carga del cartucho neutralizador ①

- 15) Cargue la Gradilla de tubos de elución y la Gradilla de las puntas desechables sobre la placa base.

⚠ Compruebe que la Cubierta de protección está asegurada apropiadamente sobre la Gradilla de tubos de elución.



Fig. 24 Inserción de las Puntas desechables en la Gradilla de puntas desechables.

- 16) Coloque el cartucho neutralizador ① en la placa base.



Fig. 25 Carga de la bandeja de desperdicios

- 17) Compruebe el estado de instalación de los componentes, y cierre la puerta del instrumento hasta que las muestras clínicas estén listas.
- 18) Los ejemplares clínicos son manipulados en una BSC de presión negativa y la banqueta está desinfectada y limpiada antes de usar.

⚠ Limpie la superficie con hipoclorito de sodio al 0.5% en agua destilada o desionizada y enjuague con agua destilada o Et-OH al 70% antes y después de su uso para evitar la contaminación. Después de cada uso, encienda la lámpara UV para eliminar los contaminantes.

⚠ Apague la lámpara UV mientras la banqueta está en uso.



Fig. 26 Componentes necesarios para la carga de la muestra

- 19) Saque los Tubo de carga de muestra de ADN IPC del embalaje, márkelos con el nombre de la muestra e insértelos en la gradilla.

⚠ Compruebe si el fondo del tubo de carga de muestra es azul (IPC seco para ADN) antes de usar el tubo.

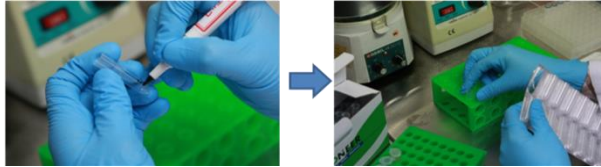


Fig. 27 Preparación del Tubo de carga de muestra

- 20) Tome los contenedores originales de la muestra clínica (NTC y SPC) y pipetee en el tubo de carga de muestra ADN IPC. Sigue los pasos 21) – 24).

⚠ El NTC debe cargarse a la Banqueta de limpieza 1.  
Los PC (SPC, L/HPC) y las muestras clínicas deben cargarse a la BSC (Clase II, III).

- 21) Agregue **400 µl** (o **200 µl** si utiliza una muestra de sangre completa) del Neutralizador SL en el tubo asignado como NTC (suministrado con el Kit de diagnóstico *AccuPower*®).
- 22) Adicionalmente agregue **400 µl** de SPC (**200 µl** si utiliza una muestra de sangre completa,) en el pozo SPC asignado (Estos son proporcionados con el Kit de diagnóstico *AccuPower*®)

⚠ Si el lote utilizado para el kit de diagnóstico y el kit de extracción es el mismo que antes, la información de calibración estándar se guarda automáticamente para el mismo lote, por lo que en éste saco únicamente se utilizan NTC, LPC y HPC.

Cuando el ensayo se repite con el mismo lote del kit de diagnóstico y el kit de extracción:

**NTC:** Cargue **400µl** de NTC de CMV en el tubo NTC (si utiliza una muestra de sangre completa, cargue **200µl** de NTC de CMV)

**LPC:** Cargue **400µl** de LPC, si utiliza una muestra de sangre completa, cargue **200µl** de LPC de CMV

(tubo con tapa Azul, componente del Kit de diagnóstico *AccuPower*®)

**HPC:** Cargue **400µl** de HPC, si utiliza una muestra de sangre completa, **200µl** de HPC de CMV

(tubo con tapa roja, componente del Kit de diagnóstico *AccuPower*®)



- 23) Mueva el tubo lleno con la muestra en la Gradilla de tubos de muestra.

⚠ **Inserte los tubos verticalmente para prevenir derrames.**

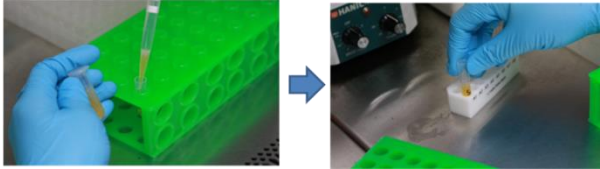


Fig. 28 Carga de las muestras clínicas al Tubo de carga de muestra.

- 24) Destape el contenedor de muestras clínicas y pipetee **400  $\mu\text{l}$**  de muestra (**200  $\mu\text{l}$**  si utiliza una muestra de sangre completa,) en el Tubo de carga de muestra de ADN IPC y mueve el Tubo de carga de muestra de ADN IPC en la Gradilla de tubos de muestra.

- 25) Repite los pasos de carga de muestra hasta que todas las muestras estén cargadas.

⚠ Si por alguna razón, se sospecha de contaminación de los guantes o las puntas de las pipetas, intercámbielas inmediatamente para prevenir la contaminación de las muestras.

- 26) Retire la bandeja de desperdicios de la placa base.

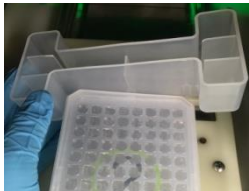


Fig. 29 Remoción de la bandeja de desperdicios

- 27) Cargue la gradilla de tubos de muestra en la placa base del *ExiPrep*™ 16 Dx



Fig. 30 Carga de la Gradilla de tubos de la muestra

- 28) Coloque la bandeja de desperdicios entre la Gradilla de tubos de muestra y el Cartucho neutralizador ②.

⚠ Sé cuidadoso de no dejar caer la Gradilla de tubos de muestra

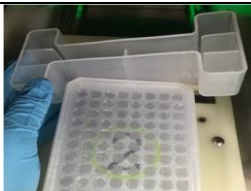


Fig. 31 Carga de la Bandeja de desperdicios

- 29) Retire las tapas acrílicas de los Cartuchos neutralizadores.



Fig. 32 Cartuchos neutralizadores con las Tapas retiradas

- 30) Verifique si todos los accesorios están cargados adecuadamente.

⚠ Cerciórese que las puntas de las pipetas, hoyos y tubos están alineados.

- 31) Empuje la placa base cuidadosamente y cierre la puerta.

- 32) Haga clic en el botón 'RUN (▶) (Ejecutar)' del software *ExiStation™* Manager. Compruebe minuciosamente si todos los accesorios para la extracción están cargados apropiadamente de acuerdo con la lista 'Check ExiPrep Setting (Comprobar el Ajuste ExiPrep)' y marque las casillas. Haga clic en el botón 'OK' para inicializar el proceso de preparación.

⚠ El proceso de extracción de ácido nucleico toma aproximadamente entre 80–100 minutos dependiendo del tipo de ácido nucleico.

⚠ Si algún mensaje de error aparece durante el proceso de extracción, contacte nuestro Centro de Soporte al Cliente.

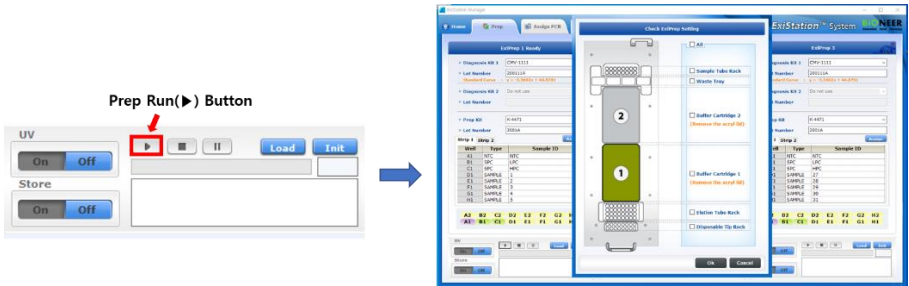


Fig. 33 Haga clic en el botón 'RUN (EJECUTAR)' en el software *ExiStation™* Manager

#### 8.4.2. PCR en tiempo real usando *Exicycler™* 96

\* Por favor, consulte la guía del usuario del programa *Exicycler™* 96 y *ExiStation™* 48 para el funcionamiento detallado.

- 1) Cuando el proceso de extracción del ácido nucleico esté terminado, el bloque de enfriamiento se apaga automáticamente.

Abra la puerta del *ExiPrep™* 16 Dx (A-5050) una vez que la extracción del ácido nucleico está completa, y remueve la Gradillas de tubos de elución de la placa base.

⚠ Proceda al siguiente paso una vez que la extracción de ácido nucleico está completa dentro de 10 minutos. Si no, esto puede causar resultados inexactos.

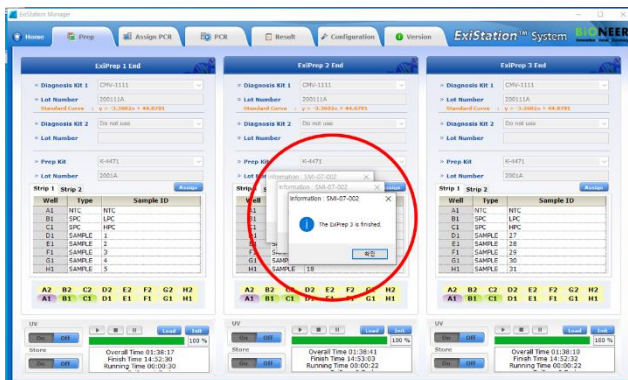


Fig. 34 Mensaje emergente una vez finalizada la extracción

- 2) Mueva la Gradilla de tubos de elución a la Banqueta de limpieza 2.



Fig. 35 Preparación de la PCR

- 3) Retire la Cubierta de protección siguiendo el método de utilidad de la Herramienta de separación de la Cubierta de protección.
- ① Saque la Gradilla de tubos de elución desde el *ExiPrep™* 16 Dx y colóquela encima de la Herramienta de separación de la Cubierta de protección.

⚠ Al colocar la Gradilla de tubos de elución en la Herramienta de Separación de la Cubierta de protección, asegúrese que la palanca está orientada hacia el lado izquierdo.

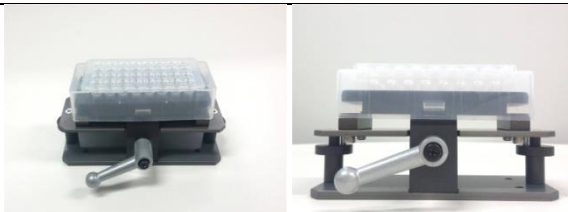


Fig. 36 Gradilla de tubos de elución la Herramienta de separación de la Cubierta de protección

- ② Mantener presionada firmemente la Cubierta de protección y la Herramienta de separación con una mano. Gire la palanca a 180° en el sentido de las agujas del reloj con la otra mano.

⚠ Gire la palanca hasta que la Gradilla de tubos de elución quede firmemente fijada a la Herramienta de Separación de la Cubierta de protección.

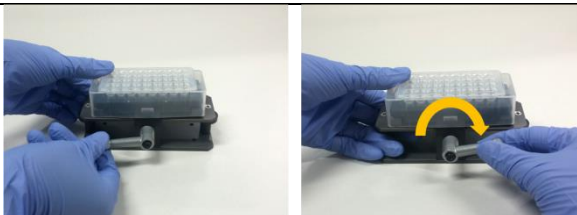


Fig. 37 Rotación de la palanca para ajustar la Gradilla de tubos de elución a la Herramienta de Separación de la Cubierta de Protección

- ③ Presione hacia abajo ambos lados de la Herramienta de separación como se muestra en la figura a continuación. Esta acción empujará la Cubierta de protección hacia arriba para que la Gradilla de tubos de elución pueda removerse con facilidad.

⚠ Mantener presionada la Cubierta de Protección con una mano. Después presione hacia abajo cada lado de la Herramienta de Separación consecutivamente para evitar que salpique cualquier líquido.

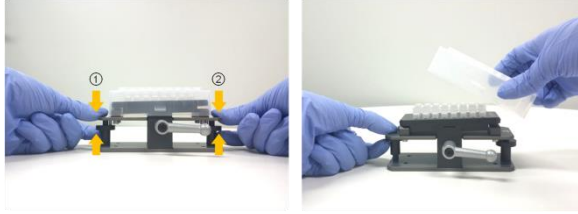


Fig. 38 Presionando desde cada lado de la Herramienta de separación y retiro de la Cubierta de protección de la Herramienta de separación

- 4) Selle el Tubo de PCR usando una Película de Sellado óptico, y luego procede al siguiente paso. Para más información del proceso de sellado, consulte el paso 5).

⚠ Con el fin de evitar las contaminaciones y resultados inválidos, selle todos los tubos completamente.

⚠ Almacene los tubos de diagnóstico sellados a 4°C hasta su uso (si la reacción de preparación está dividida en 2 pasos, almacene hasta que la 2<sup>da</sup> preparación finalice).

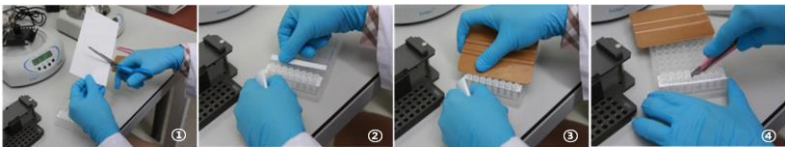


Fig. 39 Sellado de la tira de premezcla PCR

- 5) Justo antes de la reacción de la PCR, mezcle completamente el contenido del tubo utilizando el *ExiSpin™* (A-7040) (*ExiSpin™* parámetros: 2500rpm por 1 seg., Agite fuertemente durante 20 seg./ 20 ciclos).

⚠ La premezcla de PCR de Bioneer contiene reactivos de PCR secados al vacío. El mezclado insuficiente de la premezcla podría ocasionar resultados inválidos, por lo que mezcle hasta que la premezcla esté completamente disuelta.

- ⚠ Asegúrese de marcar cada kit de diagnóstico para evitar confusiones.
- ⚠ Una vez que la extracción de ácido nucleico esté completada, procede al siguiente paso dentro de 10 minutos. Si no, esto puede provocar resultados inexactos.



Fig. 40 Mezcla de la tira de Premezcla PCR utilizando *ExiSpin™*.

- 6) Mientras *ExiSpin™* está operando, enciende el interruptor principal de encendido del *Exicycler™* 96 localizado en la parte trasera del instrumento. Asegúrese que el indicador de estado LED alrededor del botón de encendido en la parte delante del instrumento cambie a azul. El color azul indica el modo de espera. Presione el interruptor de encendido por 3 segundos. Se iniciará una secuencia breve de autoprueba. Cuando se completa la autocomprobación, el LED parpadeará en VERDE con un pitido corto.



Fig. 41 Botón de funcionamiento (botón de la puerta, botón de encendido y estado del LED) de *Exicycler™* 96

- 7) Haga clic en la pentaña 'Assign PCR (Asignar PCR)' y marque la casilla en 'Prep Work List (Preparación de Lista de trabajo)' para asignar la posición del PCR. La posición de la PCR corresponde a *ExiPrep™* Dx 16 No.1– 3 en orden.

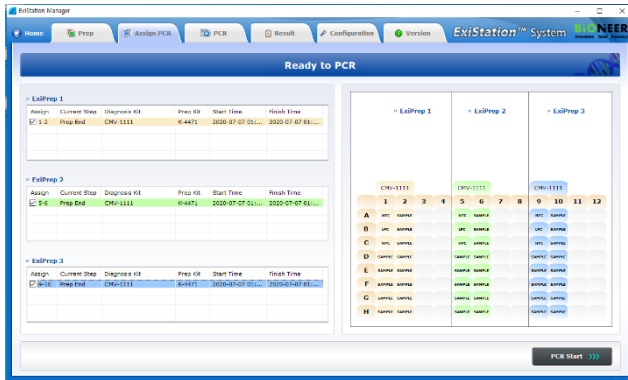


Fig. 42 Pestaña 'Asignar PCR' – Inicio de PCR

- 8) Pulse el botón de la Puerta por dos segundos para sacar el bloque térmico de 96 pozos. Inserte los tubos de reacción en sus ubicaciones. Una vez que la carga de la muestra esté completa, presione el botón Puerta por 2 segundos para cerrar la puerta.

⚠ Cerciórese que las muestra están cargadas en sus localizaciones asignadas.

⚠ Si usted está ejecutando menos de 6 tiras para una ejecución de PCR, por favor inserte una tira ficticia en el extremo opuesto (columna 12) para equilibrar la fuerza de prensado de la tapa caliente en el *Exicycler™ 96*.

- 9) Coloque los tubos de premezcla mezclados en la posición del pozo asignado del *Exicycler™ 96* cuando el ciclo sea completado. Para instrucciones detalladas del funcionamiento del *Exicycler™ 96*, y del software *ExiStation™ Manager*, consulte la Guía del Usuario relevante.

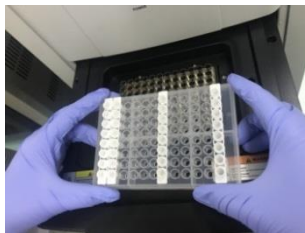


Fig. 43 Configuración de la Tira de Premezcla PCR de *Exicycler™ 96*

- 10) Seleccione la pestaña "Assign PCR (Asignar PCR)" y confirme la "Prep Work List (Lista de trabajo de preparación)" asignada. Después del proceso de 'Prep (Preparación)', 'Current Step (Paso Actual)' se presentará como 'Prep End (Fin de la Preparación)' y la barra de estado superior cambiará a 'Ready to PCR (Listo para la PCR)'. Inicialice la ejecución de la PCR haciendo clic en el botón 'PCR Start (Inicio de la PCR)' activado en la parte inferior derecha de la ventana.

Localización de la Lista de trabajo guardada ; C : > *ExiStation\_Data* > user > GUEST > WorkList

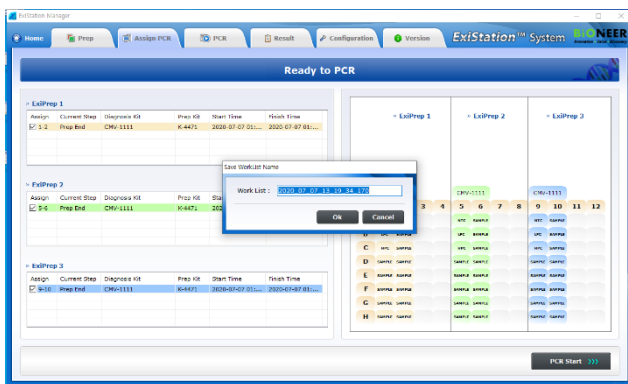


Fig. 44 Ventana emergente de "Data name (Nombre de los datos)"

- 11) Después de introducir los nombres para la Lista de trabajo, se activará la pestaña 'PCR' y el *Exicycler™* 96 inicializará la ejecución de la PCR.

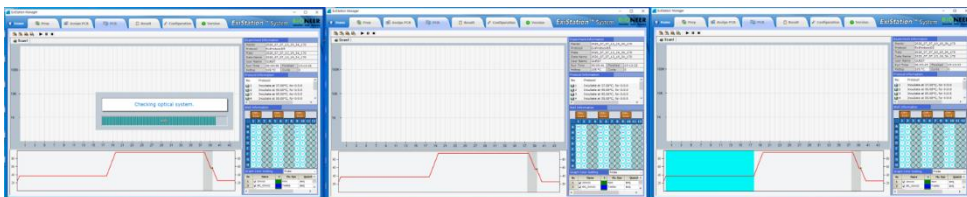


Fig. 45 Pantalla de ejecución de la PCR



- Retire todos los consumibles y componentes, comenzando por los Cartuchos neutralizadores y varias gradillas del instrumento, y deseche todos los líquidos y consumibles en sus contenedores correspondientes.

- ⚠ Si el (los) pozo(s) no utilizados están en los Cartuchos neutralizadores, tome un paño sin pelusas o etanol al 70% y limpie la superficie de la película de los Cartuchos neutralizadores. Reemplace las tapas acrílicas en los Cartuchos neutralizadores y manténgalas en una BSC de presión positiva para su uso posterior.
- ⚠ Cubre los cartuchos neutralizadores utilizados con las tapas y deséchelos de acuerdo con las normas de seguridad locales o el procedimiento interno del laboratorio.

Parameter Data Name:	Well:	Sample ID:	IPC:	CMV Result:	CMV Ct:	CMV (copy/ml):	CMV (IU/ml):	Result:
Analysis Type:	A5	0172	Valid	ND				Valid
Kit Name:	B5	18PC	Valid	24.00	1.00E+04	3.20E+04		Valid
Kit Lot:	C1	18PC	Valid	20.08	1.59E+05	1.41E+05		Valid
Instrument N°/N:	Q2	1	Valid	26.20	3.64E+05	1.02E+05		Valid
Run Date:	B1	2	Valid	18.10	8.71E+05	8.79E+04	8.79E+04	Valid
Prep Kit Lot:	B1	2	Valid	26.60	4.66E+05	7.77E+05		Valid
Prep Kit Lot:	B1	1	Valid	20.71	1.67E+05	1.61E+05		Valid
Diagnostic Kit Name:	H1	5	Valid	20.15	4.89E+07	5.87E+07		Valid
Diagnostic Kit Lot:	A2	6	Valid	1.00			1.00E+00	Valid
Information:	B2	7	Valid	24.20	1.91E+07	1.05E+05	1.05E+05	Valid
Standard Curve Date:								
Last Analysis:								

Fig. 46 Análisis de datos

- Los archivos de datos de los resultados son guardados en 'C:> ExiStation\_Data > user > GUEST > WorkList> carpeta de "nombre del archivo de datos relevante".

## 8.5. Procedimiento Experimental (*ExiStation™ 48*, *ExiStation™ 48A*)

### 8.5.1. Extracción del ácido nucleico– *ExiPrep™ 48 Dx*

\* Por favor, consulte la guía del usuario del Kit *ExiPrep™ 48* de AND/ARN Viral, *ExiPrep™ 48 Dx* o del *ExiLT* para un flujo de trabajo detallado.

#### 8.5.1.1. Métodos de funcionamiento básicos del software *ExiStation™ 48 Manager* para el experimento

- 1) Enciende el interruptor de encendido principal en la parte trasera instrumento del *ExiPrep™ 48 Dx*. Luego presione el botón POWER en la parte frontal del instrumento por más de 1 segundo.
- 2) Una vez que empiece a inicializarse, compruebe si aparece la pantalla LCD que se muestra a continuación.
- 3) Cuando la inicialización esté completada, la pantalla principal aparece en la pantalla LCD. Si la inicialización NO es completada de forma exitosa, contacte nuestro Soporte al Cliente.



Fig. 47 Pantalla principal del *ExiPrep™ 48 Dx*

- 4) La pantalla principal consta de 5 íconos.

**Prep** – Ajuste y control de la extracción del ácido nucleico(*ExiLT™*, *ExiPrep™ 48 Dx*)

**LT** – Sistema automático de desobstrucción y transferencia de líquidos

**Assign** – Puede mostrarse la información extraída

**PCR** – Monitoreo de la extracción de la PCR en tiempo real (*Exicycler™ 96*)

**Resultado** – Muestra los resultados después de ejecutar la PCR

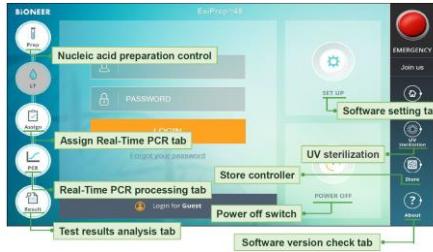


Fig. 48 Función de ícono del software ExiPrep™ 48

- 5) Inicie sesión con la ID registrada. Cuando inicie sesión como invitado, generalmente se guardan los datos en la carpeta especificada. Si inicia sesión con su ID, puede especificar una carpeta de almacenamiento para una gestión eficiente de los datos.
- 6) Antes de la preparación, separe el Protector de contaminación del ExiPrep™ 48 Dx. Limpie el protector con EtOH al 70% y adjunte el papel de filtro del Protector de contaminación I protector. Entonces, instale el Protector de contaminación al instrumento.



Fig. 49 Paso 1 de Descontaminación; Separación e instalación del Protector de contaminación

- 7) Cierre la puerta del instrumento, haga clic en el ícono de esterilización UV y seleccione el botón de '15 Minutes (15 minutos)' (Enciende la esterilización UV). Después de 15 minutos, la esterilización por UV se apaga automáticamente.

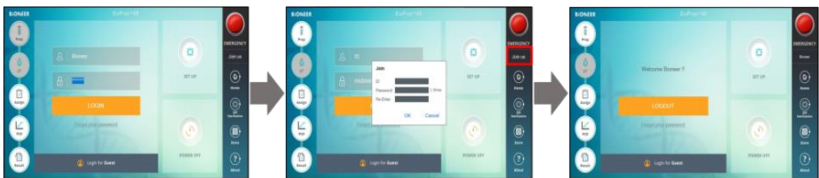


Fig. 50 Paso 2 de descontaminación ; Esterilización por UV

- 8) Pulse el ícono Prep en la pantalla principal. La pantalla se cambiará como se muestra a continuación en la Figura 51. Introduce el modo de preparación de extracción del ácido nucleico pulsando el ExiStation.

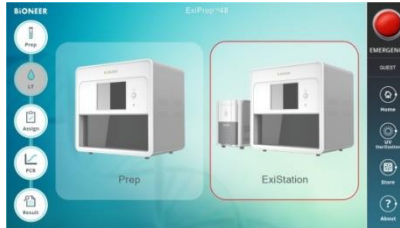


Fig. 51 Pantalla inicial de la pestaña Prep

- 9) Pulse la flecha desplegable del Kit de Diagnóstico 1, se muestra una lista de los kits de diagnóstico disponibles. Presione el CMV-1111.



Fig. 52 Introducir la información del Kit de diagnóstico

- 10) Cuando aparezca el mensaje emergente “Select Lane & Well (Seleccionar Carril y Pozo)”, seleccione el pozo a utilizar. Compruebe que el (los) pozo(s) que se han utilizado en el Cartucho neutralizador ① y haga clic en el (los) pozo(s) utilizado(s) en la pantalla. Aparecerá una señal “X” para la localización de el (los) pozo(s) utilizado(s). Haga clic en el botón “OK” para proceder. Si no hay ningún pozo(s) usado, puede omitir el proceso y proceder al siguiente paso haciendo clic en “OK”.

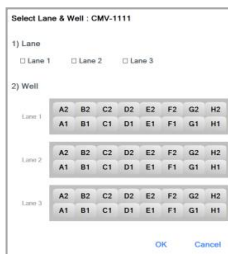


Fig. 53 Pantalla de 'Select Lane & Well (Selección de carril y pozo)'

- 11) Introduce el número del lote del kit de diagnóstico.
- 12) Toque la flecha hacia abajo del Kit de preparación y elije el kit de diagnóstico a utilizar. Luego introduce la información del lote del Kit de preparación.
- 13) Cuando el mensaje emergente “Sample Type (Tipo de muestra)”, seleccione la muestra a utilizar.

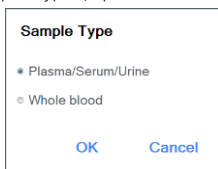


Fig. 54 Pantalla de Sample Type (Tipo de muestra)'

- 14) Si el número de lote para el kit de diagnóstico o/y el kit de preparación es nuevo, se mostrará la Ventana de notificación para la calibración estándar.

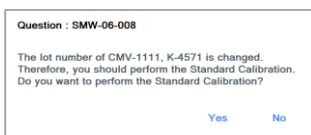


Fig. 55 Mensaje emergente para el proceso de calibración estándar

- 15) Las psociones de NTC y SPC se establecen automáticamente en los pozos restantes. El ajuste primario es NTC y cada SPC 1–5. Si el experimento se repite con el mismo número de lote del kit de extracción/diagnóstico, LPC y HPC se establece para 1 pozo cada uno en vez de SPC1~5 porque se usa la curva estándar guardada automáticamente.
- 16) Una vez que se genere la curva estándar, procede al siguiente experimento utilizando las muestras clínicas. Si el experimento funciona, aparecerá la información en la curva estándar y la posición NTC/LPC/HPC. Luego haga clic en 'Sample ID (Identificación de muestra)' e introduce la información de la muestra clínica manualmente o utilizando el código de barra.



Fig. 56 Ingrese la información de la muestra

**8.5.1.2. Extracción de ácido nucleico utilizando ExiPrep™ 48 Dx**

- 1) Se recomienda que al manipular las muestras clínicas y todos sus trabajos relacionados se realicen dentro de una banqueta BSC de presión negativa (Clase II, III) para la seguridad del usuario y para prevenir la contaminación.
- 2) Limpie la BSC y compruebe todos los componentes necesarios para la extracción y las muestras antes de la extracción de ácido nucleico. Prepare los componentes de extracción dentro de un BSC de presión positiva. Se recomienda realizar esto en una localización separada como se declara en en la sección 8.1.1.

⚠	Limpie la superficie de la banqueta con hipoclorito de sodio al 0.5% y etanol al 70% o agua desionizada antes y después de usarla para evitar contaminación. Después de cada uso, enciende la lámpara UV para eliminar los contaminantes restantes.
⚠	Apague la lámpara UV mientras la banqueta está en uso.

- 3) Compruebe que todos los componentes necesarios estén presentes antes de proceder y realice la operación dentro de la BSC-1 de presión positiva.

**Tabla 3. Lista de componentes necesarios para la extracción de ácido nucleico**

Herramientas de preparación	Consumibles
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Bandeja de utensilios</li> <li>■ Perforadora de hoyos</li> <li>■ Gradilla de tubos de muestra</li> <li>■ Gradilla de tubos de elución</li> <li>■ Abrazadera</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Cartucho neutralizador ① y ②</li> <li>■ Tubos de carga de muestra_IPC</li> <li>■ Puntas desechables y estantes</li> <li>■ Tubos de Elución</li> <li>■ Tapas de tubos de elución</li> <li>■ Bandeja de Desperdicios</li> <li>■ Papel de filtro del Protector de contaminación</li> </ul>

- 4) Retire el empaque digital que envuelve los dos Cartuchos neutralizadores ① y ② dentro de la BSC-1 de presión positiva.

⚠	Inspeccione los pozos del Cartucho neutralizador y asegúrese de que todos los líquidos estén en la parte inferior de los pozos.
---	---

- 5) Tome el número necesario de tubos del kit de diagnóstico AccuPower® del congelador y colóquelos en la gradilla de tubos de elución. Retire la lámina cubierta del kit de diagnóstico y marque cada tira de los tubos de diagnóstico con el número de columna correspondiente.

⚠	Usted DEBE cerciorarse de que los tubos de diagnóstico estén marcados para que puedan identificarse durante el experimento.
---	---

- ⚠ En la parte inferior de la gradilla del tubo de elución, hay una ranura ajustada al instrumento *ExiPrep™* 48 Dx. Cuando se ve desde arriba, coloque el lado de la ranura hacia abajo e inserte los tubos de premezcla en las dos filas superiores como se muestra a continuación en la figura 58.



Fig. 57 Compruebe la posición de los tubos del kit de diagnóstico en la Gradilla de tubos de elución

- 6) Fije la cubierta de protección dentro de la gradilla del tubo de elución.

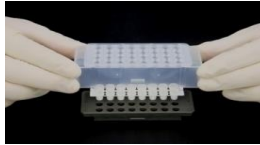
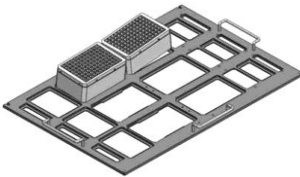


Fig. 58 Instalación de la cubierta de protección

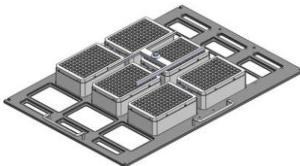
- 7) Abra la puerta del instrumento (*ExiPrep™* 48 Dx (A-5150)), saque la bandeja de preparación y colóquelo en una superficie plana de la banqueta.

①



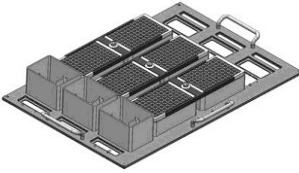
Instale el cartucho neutralizador ①, ② a la cantidad de muestra de la bandeja de preparación.

②



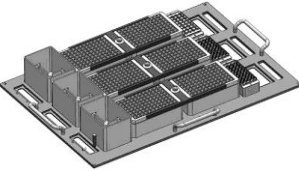
Instale la abrazadera en la parte superior del cartucho neutralizador. Las abrazaderas deben ser instaladas por carril. Y mantener la abrazadera.

③



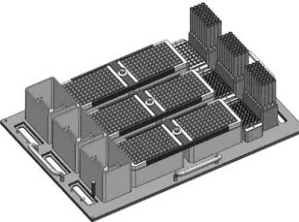
Instale la bandeja de desperdicios.

④



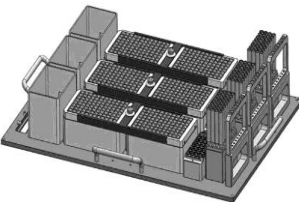
Instale la gradilla de tubos de elución con la tira de premezcla PCR en su interior y coloque la cubierta de protección en la bandeja de preparación.

⑤



Retire la cubierta en la gradilla de la punta desechable e instálela en la Bandeja de utensilios.

⑥



Instale la perforadora de 8 agujeros.

- 8) Una vez que la instalación de los componentes para la extracción del ácido nucleico esté completada, prepare el control y las muestras.
- 9) Prepare la muestras clínicas en la BSC de presión negativa. Asegúrese de limpiar la BSC donde se realizará la extracción del ácido nucleico.

- |   |   |
|---|---|
| ▲ | Limpie la superficie con hipoclorito de sodio al 0.5% y etanol al 70% o agua desionizada antes y después de usarla con el fin de evitar contaminación. Después de cada uso, encienda la lámpara UV para eliminar los contaminantes restantes. |
| ▲ | Apague la lámpara UV mientras la banqueta está en uso.  |



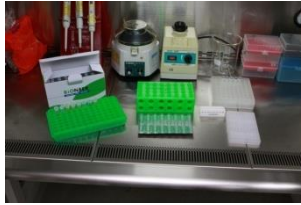


Fig. 59 Componentes necesarios para la carga de la muestra

- 10) Tome el número necesario de Tubos de carga de muestra y márkelos para su posterior identificación. Insértelos en la gradilla.

⚠ Asegúrese de comprobar que el fondo del IPC de ADN seco es azul antes de la carga.

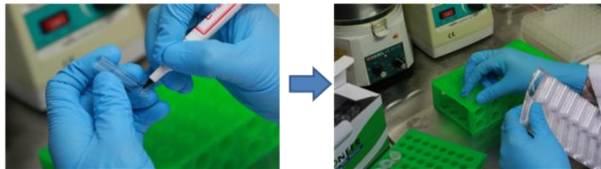


Fig. 60 Preparación del Tubo de carga de muestra

- 11) Prepare el contenedor para la muestra y los controles (CMV NTC, SPC, LPC/HPC), realice la carga dentro del tubo de carga de muestras y sigue los siguientes pasos del 12) ~ 15).

⚠ La carga del NTC se realiza la Banqueta de limpieza 1, y la carga de los PC (SPC, LPC, HPC) y los ejemplares clínicos se realizan en la BSC (Clase II, III).

- 12) Transfiera 400  $\mu\text{l}$  CMV NTC (proporcionado con el Kit de diagnóstico *Accupower®*) al tubo NTC utilizando la pipeta.

(Cargue 200  $\mu\text{l}$  de CMV NTC para la muestra de sangre completa)

- 13) Cargue 400  $\mu\text{l}$  SPC (si utiliza una muestra de sangre completa, 200  $\mu\text{l}$ ) en las tazas del SPC correspondiente. (suministrados con el kit de diagnóstico *AccuPower®*)

⚠ Si el lote utilizado para el kit de diagnóstico y el kit de extracción es el mismo que antes, la información de calibración estándar se guarda automáticamente para el mismo lote, por lo que en éste saco únicamente se utilizan NTC, LPC y HPC.

Cuando el ensayo se repite con el mismo lote del kit de diagnóstico y el kit de extracción:

**NTC:** Cargue 400 $\mu\text{l}$  CMV LPC en el tubo NTC 200 $\mu\text{l}$  de CMV LPC para la muestra de sangre completa.

**LPC:** Cargue **400µl** LPC, 200µl de CMV LPC para la muestra de sangre completa.  
(**Tubo con tapa azul**, proporcionado en el Kit de diagnóstico *AccuPower®*)  
**HPC:** Cargue **400µl** HPC, 200µl de CMV HPC para la muestra de sangre.  
(**Tubo con tapa roja**, proporcionado en el Kit de diagnóstico *AccuPower®*)

- 14) El tubo de carga de muestra que se ha preparado dispensando el control del producto se monta en la Gradilla de tubos de muestra.

- ⚠ Después de desbloquear el dispositivo de fijación de la gradilla de tubos de muestra, coloque el tubo.
- ⚠ Una vez que la Gradilla de tubo de muestra, manténgala en dirección vertical al retirar e instalar la gradilla para evitar cualquier pérdida.

- 15) Transfiera 400 µl (200 µl para la muestra de sangre completa) de las muestras clínicas al Tubo de carga de muestra. Complete la carga de la muestra clínica y mueva el Tubo de carga de muestra a la Gradilla de tubo de muestra.

- ⚠ Confirme la posición exacta de cada Tubo de Carga de muestra y luego ajústelo.
- ⚠ Si los guantes, puntas de pipetas, u otros equipos están contaminados por la muestra clínica, retire el contaminante inmediatamente y utilice el nuevo.
- ⚠ Una vez que el tubo haya sido instalado, empuje el dispositivo de ajuste para bloquear la posición del Tubo de carga de la muestra.

- 16) Coloque la Gradilla de tubos de la muestra sobre la bandeja de utensilios del *ExiPrep™* 48 Dx.

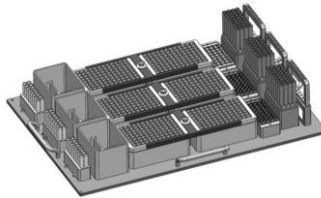


Fig. 61 Instalación de la Gradilla de tubos de la muestra

- 17) Asegúrese que todos los componentes están instalados correctamente en la Bandeja de utensilios.
- 18) Vuelve a introducir la bandeja de utensilios en el instrumento *ExiPrep™* 48 Dx.

- ⚠ Compruebe cada lado de la bandeja de utensilios antes de introducirlo de nuevo al instrumento.

Lado izquierdo: Gradilla de tubos de muestra / Lado derecho : Perforadora de 8 hoyos,  
Luego empuje la bandeja de utensilios dentro del instrumento, cuidadosamente.

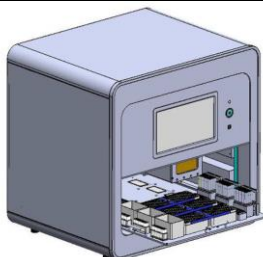


Fig. 62 Instalación de la Bandeja de utensilios

- Después de terminar el proceso de configuración, – ajuste del programa, preparación de muestra e instalación de la bandeja de utensilios– Haga clic en el botón “Apply Run (Aplicar ejecución)” situado en la parte inferior derecha de la pantalla para empezar la extracción de ácido nucleico.

- ⚠ El tiempo de ejecución de extracción toma aproximadamente 60–80 minutos, de acuerdo al tipo de muestra.
- ⚠ Durante el proceso de extracción, si aparece un mensaje de error, por favor contacte a nuestro Soporte Técnico de Diagnóstico Molecular Internacional.



Fig. 63 Comienzo de la extracción del ácido nucleico mediante el software *ExiPrep™ 48*

### 8.5.2. PCR en tiempo real usando *Exicycler™ 96*

\* Por favor consulte la guía del usuario del software *Exicycler™ 96* y *ExiPrep™ 48* para instrucciones detalladas.

- Una vez que la extracción de ácido nucleico está terminada, aparecerá un mensaje de notificación emergente. Luego, presione el botón “Door (Puerta)” para abrir la puerta del instrumento y saque la Bandeja de utensilios.

⚠ Una vez que la extracción del ácido nucleico esté completada, saque la Bandeja de utensilios dentro de 10 minutos. Luego separe la Tira de la Premezcla de PCR de la Gradilla de tubos de elución para pasar al siguiente paso. El retraso en la extracción de la placa puede provocar la degradación del ácido nucleico y afecta el valor del resultado.

- 2) Consulte la sección 8.5.2, pasos 2) –6), para los detalles del proceso ‘Ready to PCR (Listo para PCR)’ después de separar la Tira de Premezcla de PCR de la Gradilla de tubos de elución.
- 3) Haga clic en el ícono “Assign (Asignar)” para obtener la lista de información de la extracción de ácido nucleico terminada. Compruebe las muestras de objetivo para el proceso de PCR y asigne la posición del pozo de PCR siguiendo el *ExiPrep™* 48 Dx,

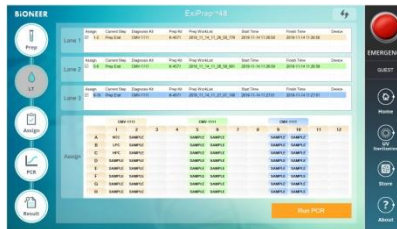


Fig. 64 Selección de la muestra para el proceso de PCR

- 4) Presione el botón Door (Puerta) del *Exicycler™* 96 durante 2 segundos para retraer el bloque térmico de 96 pozos fuera del instrumento. Ajuste la Tira de premezcla de PCR en la posición asignada del pozo por el software.

⚠ Asegúrese que la posición de la/s tira/s de premezcla de PCR coincidan con la posición asignada en el software.

⚠ Si usted ejecuta la PCR con 4 tiras, coloque la tira de equilibrio en la posición opuesta para equilibrar el bloque térmico de *Exicycler™* 96.

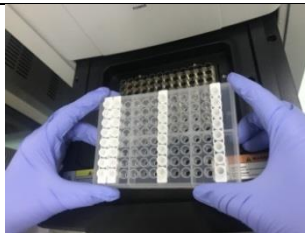


Fig. 65 Configuración de la tira de Premezcla PCR de *Exicycler™* 96

- 5) Después de ajustar la Tira de Premezcla de PCR, presione el botón “Run PCR (Ejecutar PCR)” ubicado en la parte inferior derecha. Aparecerá una ventana emergente de “Data name (Name (Nombre de los datos))”, llénela con el nombre de la prueba y luego presione el botón 'OK'.

⚠ La lista de trabajo puede encontrada en: programa ExiStation™ 48 Manager> ESTABLECER > Datos > Lista de trabajo

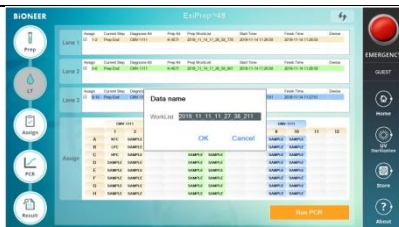


Fig. 66 Ventana emergente de “Data name (Nombre de los datos)”

- 6) Complete el paso 5) para ejecutar *Exicycler™ 96*.

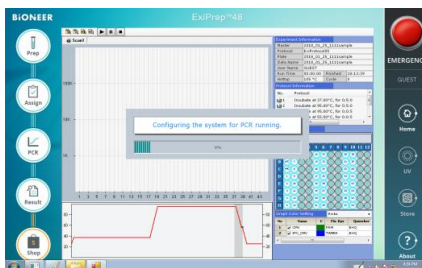


Fig. 67 Pantalla de Ejecución de la PCR

- 7) Una vez que la PCR esté completa, haga clic en el icono ‘Result (Resultado)’ para confirmar el resultado.

⚠ Haga clic en “Analysis (Análisis)”, y cuando aparezca un programa de análisis como una ventana emergente, confirme el resultados.

⚠ Después de hacer clic en el botón ‘Print (Imprimir)’ (al lado derecho del botón de Análisis), seleccione el resultado del análisis del objetivo para imprimirlo como informe.

⚠ Los resultados del análisis pueden encontrarse en:  
: programa *ExiStation™ 48 Manager*> ESTABLECER > Datos > Lista de trabajo > datos relevantes.



Fig. 68 Análisis de datos

## 8.6. Proceso de manejo de desperdicios experimentales

### 8.6.1. *ExiPrep™ 16 Dx*

- 1) Retire todos los consumibles y componentes, comenzando por los Cartuchos neutralizadores y varias gradillas del instrumento, y deseche todos los líquidos y consumibles en sus contenedores correspondientes.

- ⚠ Si los pozos sin usar están presentes en los Cartuchos neutralizadores, tome una paño sin pelusas o etanol al 70% y limpie la superficie de la película de los Cartuchos neutralizadores. Cierre las tapas de los Cartuchos neutralizadores y manténgalos en una BSC de presión positiva para su posterior uso.
- ⚠ Cubra los Cartuchos neutralizadores usados con las tapas acrílicas y deséchelos de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o con el procedimiento interno de su laboratorio.

- 2) Presione el botón 'Misc Set (AJUSTES MISC)' y remueve el Protector de puntas y el Escudo de contaminación. Luego presione de nuevo el botón 'Misc Set (AJUSTES MISC)'.
- 3) Empuje la Placa base hacia dentro y cierre la puerta del instrumento para inicializar la esterilización UV haciendo clic en "UV ON (UV ENCENDIDO)" en el panel de control.

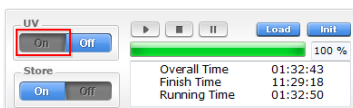


Fig. 69 Panel de control del *ExiPrep™ 16 Dx* – Almacén

### 8.6.2. *ExiPrep™* 48 Dx

- 1) Retire todos los consumibles y componentes, comenzando por los Cartuchos neutralizadores y varias gradillas del instrumento, y deseche todos los líquidos y consumibles en sus contenedores correspondientes.

- ⚠ Si hay pozos sin usar en los Cartuchos neutralizadores, retire las puntas de filtro usadas del cartucho neutralizador. Tome un paño libre de pelusas o etanol al 70% y limpie la superficie de la cinta de los Cartuchos neutralizadores. Cubre los Cartuchos neutralizadores con las tapas acrílicas y manténgalos en una BSC de presión positiva para su posterior uso.
- ⚠ Cubre los Cartuchos neutralizadores usados con las tapas acrílicas y deséchelos de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o con el procedimiento interno de su laboratorio.

- 2) Retire el Protector de Punta y el Protector de Contaminación luego límpielos con etanol al 70% y vuelva a instalarlos al instrumento.
- 3) Introduce de vuelta la Bandeja de utensilios dentro del instrumento, cierre la puerta del instrumento e inicialice la esterilización UV haciendo clic en “UV ON (UV ENCENDIDO)” en el panel de control.



Fig. 70 Panel de control del *ExiPrep™* 16 Dx – UV

### 8.6.3. *Exicycler™* 96

- 1) Después de que la ejecución de la PCR esté completa, seleccione la pestaña ‘Result (Resultado)’ para comprobar los resultados de cada muestra.

- ⚠ NO desprenda una película selladora óptica del Kit de diagnóstico. Deséchelos de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o con el procedimiento interno de su laboratorio.

## 9. ANÁLISIS DE DATOS

### 9.1. Calibración (SPC 1–5)

Para el nuevo lote de pruebas del kit de diagnóstico y/o del kit de extracción, debe realizarse la calibración.

La prueba utiliza 5 pozos de SPC (CMV SPC (1)–(5)) para generar una curva estándar. Adicionalmente, el usuario puede comprobar la validez de los lotes con el software de *ExiStation™* manger, ya sea mediante la supervisión o un informe impreso. El lote es válido, si al menos 3 SPCs son válidos.

### 9.2. Control

#### 1) LPC, HPC

Cada prueba está acompañada con un control. La prueba utiliza 2 pozos de PCs (HPC, LPC) para confirmar la validez de cada prueba. El usuario puede comprobar la validez de los lotes con el software de *ExiStation™* manger, ya sea mediante la supervisión o un informe impreso.

#### 2) IPC

Cada tubo de prueba contiene un IPC para comprobar la inhibición de PCR por la impureza o el ciclo térmico mal controlado, y para monitorear el proceso completo de análisis. El IPC se seca dentro del tubo de carga de muestra (accesorio para la extracción de ácido nucleico, no proporcionado en el kit). Las altas concentraciones de ADN de CMV pueden ocasionar una señal fluorescente de IPC reducida o ausente debido a la competencia de la PCR. La validez del IPC se determina por el valor Ct de la señal IPC. Si su valor Ct está dentro del rango especificado, es válido. Si el valor Ct está fuera del rango especificado, es inválido.

El resultado del IPC determina la validez de la prueba y el valor Ct de la señal de CMV determina la concentración de CMV (IU/mL) de la prueba. Para el ejemplar de título alto por encima del rango cuantitativo deseado, el ejemplar original debería diluirse con el neutralizador SL proporcionado, y la prueba debe repetirse.

#### 3) NTC

Cada prueba utiliza 1 pozo de NTC para comprobar cualquier contaminación en el proceso de carga de la muestra, extracción de ácido nucleico, preparación de la PCR, en orden para prevenir un error falso positivo.

La validez del SPC y NTC se determina por el valor Ct de la señal objetivo. Si el ensayo es válido, el Ct del CMV objetivo será 'indeterminado' el pozo NTC y el valor de Ct de SPC estará dentro de su rango especificado. Si el control de los resultados es inválido, tome las medidas de acuerdo con la sección 10 de la Guía del Usuario. Resolución de problemas.



**Tabla 4. Los ejemplares de los resultados son interpretados de la siguiente manera:**

Resultado del título (IU/ mL*)	Interpretación
No detectado	No se obtuvo valor de Ct (>45Ct) para CMV. Los resultados se reportan como "No detectados".
< 1.00E+02 IU/mL o < 2.00E+02 IU/mL	Los IU/mL calculados están por debajo del Límite de cuantificación del ensayo. Plasma EDTA, Suero, Orina: Resultados reportados como "< 1.00E+02". Sangre completa: Resultados reportados como "< 2.00E+02".
≥ 1.00E+02 IU/mL y ≤ 1.00E+08 IU/mL O ≥ 2.00E+02 IU/mL y ≤ 1.00E+08 IU/mL	Utilizando Plasma EDTA, Suero, Orina: Los resultados calculados mayores o iguales que 1.00E+02 IU/mL y menores o iguales que 1.00E+08 IU/mL están dentro del rango lineal del ensayo. Utilizando Sangre completa: Los resultados calculados mayores o iguales que 2.00E+02 IU/mL y menores o iguales que 1.00E+08 IU/mL están dentro del rango lineal del ensayo.
> 1.00E+08 IU/mL	Las IU/mL calculadas están por encima del rango del ensayo. Los resultados se reportan como "mayores que 1.00E+08 IU/mL". Si se desean los resultados cuantitativos, el ejemplar original debería ser diluido con plasma EDTA negativo humano, suero, orina o sangre completa para CMV y se repete la prueba. Multiplique el resultado reportado por el factor de dilución.

\* IU/mL en Sangre completa, suero, orina; concentración de ADC de CMV en copia/mL X 0.70 IU/copia = ADN de CMV en IU/mL

\* IU/mL en Sangre completa; concentración de ADC de CMV en copia/mL X 0.50 IU/copia = ADN de CMV en IU/mL

## 10. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

### Comentarios y sugerencias

Resultados inválidos del Control Positivo Interno (IPC)	
<p>Si el TAMRA (IPC) La señal fluorescente no se detectó en todos los pozos (incluyendo los controles)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracción y/o error de configuración del PCR               <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Cerciórese de que fue programado y realizado el protocolo correcto de extracción/PCR de acuerdo con los Kits. Repite el ensayo, si es necesario. Consulte la <b>Guía del Usuario 8. PROTOCOLO</b></li> </ul> </li> <li>• Extracción o uso incorrecto del Kit PCR               <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Cerciórese de estar utilizando los kits apropiados para las pruebas previstas.</li> </ul> </li> <li>• El kit puede haberse estropeado, debido a un mal almacenamiento o al vencimiento.               <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Evalúe sus condiciones de almacenamiento y revise la fecha de vencimiento. Repite el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario. Véase la <b>Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL</b></li> </ul> </li> <li>• Resultados inválidos.               <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Debe probarse con los nuevos reactivos</li> </ul> </li> </ul>
<p>Si el TAMRA (IPC) La señal de fluorescencia no se detectó en pocos particulares.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición del PCR               <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Las muestras clínicas pueden contener una variedad de inhibidores de PCR. Repite el ensayo desde el proceso de tratamiento previo de muestras el cual puede reducir la inhibición de PCR.</li> <li>☞ Cerciórese de utilizar el método validado de tratamiento previo de la muestra de acuerdo con el tipo de muestra.</li> </ul> </li> <li>• Bajo volumen de elución debido al material insoluble de las muestras               <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ La producción de ácido nucleico puede verse afectada por las condiciones de la muestra (viscosidad etc.). Repite el ensayo desde el proceso de tratamiento previo de muestras lo cual puede hacer que la muestra sea más soluble.</li> </ul> </li> </ul>

**Resultados inválidos del SPC/PC**

Si la FAM (SPC)  
La señal de  
fluorescencia era  
indeterminada.

- El kit puede haberse estropeado, debido a un mal almacenamiento o al vencimiento.
  - ☞ Evalúe sus condiciones de almacenamiento y revise la fecha de vencimiento. Repite el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario.
  - Véase la **Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL**
- Reutilización de los reactivos
  - ☞ Cerciórese de no reutilizar los reactivos. La reutilización o los ciclos repetidos de congelado/descongelado de los reactivos pueden afectar la calidad del kit y los resultados del ensayo de manera concluyente. Repite el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario.
  - Véase la **Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL**
  - Precauciones generales
- Error de protocolo PCR
  - ☞ Revise su procedimiento de preparación del reactivo. Confirme la cantidad de SPC utilizada en un solo pozo.
  - Véase la **Guía del Usuario 8.1 Preparación de la PCR**
- Puede haber un error de pipeteo.
  - ☞ Revise la técnica de pipeteo y calibración.
- Resultados inválidos.
  - ☞ Debe probarse con los nuevos reactivos

**Resultados Inválidos del Control sin Plantilla (NTC)**

Si se detecta la  
señal fluorescente  
FAM en el pozo  
NCT.

- Puede haber ocurrido una contaminación.
  - ☞ Cerciórese de que el espacio de trabajo y los instrumentos sean descontaminados y repite el ensayo.
- El kit puede haberse estropeado, debido a un mal almacenamiento o al vencimiento.
  - ☞ Evalúe sus condiciones de almacenamiento y revise la fecha de vencimiento. Repite el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario.
  - Véase la **Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL**
- Error de protocolo PCR
  - ☞ Revise su procedimiento de preparación de la reacción. Confirme si los controles y muestras están cargados en los pozos apropiados los cuales son asignados mediante el protocolo S/W (especialmente el (los) pozo(s) NTC).
  - Véase la **Guía del Usuario 8. PROTOCOLO**
- Puede haber un error de pipeteo.
  - ☞ Revise la técnica de pipeteo y calibración.

## 11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### 11.1. Características analíticas

#### 1) Límite de detección (LoD)

**Límite de detección utilizando el 1º Estándar Internacional para Citomegalovirus Humano de la OMS.**

El ADN viral extraído del Estándar Internacional para Citomegalovirus Humano de la OMS (HCMV), se utilizó el código NIBSC 09/162 para determinar el LoD del ensayo *AccuPower®* PCR de CMV cuantitativa. La concentración de ADN del citomegalovirus de 26 UI/ml se diluyó en serie hasta 4 UI/ml para preparar 6 concentraciones de pruebas diferentes de ADN. Se probaron al menos 60 réplicas para cada concentración de ADN, y la proporción de los resultados positivos de cada concentración fue sujeta a análisis probit. Definición de la LoD como la menor concentración de ADN del CMV que pueda detectarse con un 95% de probabilidad, el análisis probit determina que el LoD del ensayo *AccuPower®* PCR de CMV cuantitativa fue de 46.8 UI/ml de CMV en el plasma EDTA, 63.1 UI/ml de CMV en suero, 79.4 UI/ml de CMV en sangre completa, 66.1 UI/ml en la orina.

Tabla 5. Análisis probit del límite de detección

Tipo de muestra	Concepto	LoD	95% C.I.	
Plasma EDTA	IU/ml	46.8	33.1	66.1
	Log <sub>10</sub> IU/ml	1.67	1.52	1.82
Suero	IU/ml	63.1	42.7	93.3
	Log <sub>10</sub> IU/ml	1.80	1.63	1.97
Sangre completa	IU/ml	79.4	57.5	109.6
	Log <sub>10</sub> IU/ml	1.90	1.76	2.04
Orina	IU/ml	66.1	45.7	95.5
	Log <sub>10</sub> IU/ml	1.82	1.66	1.98

### Confirmación del LoD para la glicoproteína B(gB) 2, 3, 4 y 5

El ensayo de *AccuPower*® PCR de CMV cuantitativa confirmó la capacidad de cumplir con el LOD declarado de 1.67 (Plasma), 1.80 (Suero), 1.82 (Orina) y 1.90 (Sangre completa) Log<sub>10</sub> IU en los genotipos gB2, 3, 4 y 5 del CMV.

**Tabla 6. Confirmación de límite de cuantificación, utilizando el genotipo gB2, gB3, gB4 y gB5**

Matriz	CMV gB Genotipo	Concentración (Log <sub>10</sub> IU/ml)	Número de réplicas probadas (N)	Número de positivos detectados	Rango positivo (%)
EDTA-plasma	gB2	1.67	25	25	100
	gB3	1.67	25	24	96
	gB4	1.67	25	25	100
	gB5	1.67	25	24	96
Suero	gB2	1.80	25	24	96
	gB3	1.80	25	24	96
	gB4	1.80	25	24	96
	gB5	1.80	25	25	100
Orina	gB2	1.82	25	24	96
	gB3	1.82	25	25	100
	gB4	1.82	25	24	96
	gB5	1.82	25	24	96
Completa sangre	gB2	1.90	25	24	100
	gB3	1.90	25	24	96
	gB4	1.90	25	24	96
	gB5	1.90	25	24	100

## 2) Rango lineal y límite de cuantificación (LoQ)

### Rango lineal y LoQ utilizando el 1º Estándar Internacional para Citomegalovirus Humano de la OMS.

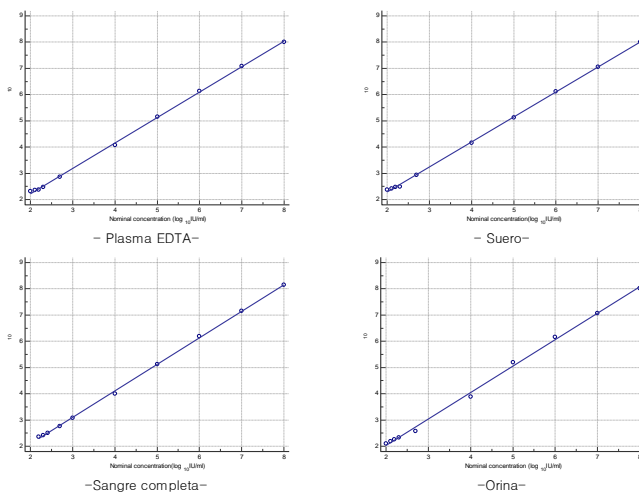
Se determinó el rango lineal del Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa siguiendo la directriz EP06-A del CSLI.

Se prepararon una serie de diluciones del panel de CMV de la OMS y del ADN del plásmido de CMV que van desde 2.0 log<sub>10</sub> UI/ml a 8.0 log<sub>10</sub> UI/ml (100 UI/ml hasta 1.0x10<sup>8</sup> UI/ml) en plasma EDTA, suero, sangre completa o muestras de orina para determinar el rango lineal. Las muestras fueron analizadas utilizando el Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa con un total de un lote del Kit *ExiPrep*™ de ADN Viral y 3 lotes del Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa. Cada nivel de dilución se probó en 36 réplicas.

El rango lineal del ensayo se consideró entre 100 UI/ml a  $1.0 \times 10^8$  UI/ml ( $2.0 \log_{10}$  UI/ml hasta  $8.0 \log_{10}$  UI/ml) de CMV en plasma EDTA, suero, y orina, con una desviación máxima de linealidad de menor o igual a  $0.20 \log_{10}$  UI/ml.

E rango lineal del ensayo se consideró para estar entre 200 UI/ml a  $1.0 \times 10^8$  UI/ml ( $2.3 \log_{10}$  UI/ml a  $8.0 \log_{10}$  UI/ml) del CMV en sangre completa con una desviación máxima de la linealidad de menos o igual a  $0.20 \log_{10}$  UI/ml.

**Fig. 71 Linealidad del Kit AccuPower® de Cuantitativa**



**Tabla 7. Resultados LoQ**

Matriz	N	Nominal con. (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Promedio Medida Con. (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Sesgo	SD	TE <sup>a</sup> = Sesgo  +2 x SD	TE <sup>b</sup> =SQRT[2]x 2 x SD
Plasma EDTA	48	2.00	2.24	0.24	0.20	0.65	0.57
Suero	48	2.00	2.32	0.32	0.19	0.74	0.59
Sangre completa	48	2.30	2.44	0.13	0.20	0.55	0.59
Orina	48	2.00	2.10	-0.10	0.20	0.42	0.89

### **Confirmación de linealidad para el genotipo gB2, 3, 4 y 5 del CMV**

El ADN del CMV clonado por el genotipo individual se diluyó en plasma EDTA negativo humano, suero, orina y sangre completa. Aunque la concentración de la solución de reserva de cada genotipo es diferente, la reserva se diluye a 6.00 Log<sub>10</sub> UI/ml para cada genotipo y se diluye aún más a 5.00, 4.00, 3.00, 2.30, 2.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma, suero, matriz de orina y se diluye a 5.00, 4.000, 3.00, 2.48, 2.30 Log<sub>10</sub> UI/ml en sangre completa.

Se realizó la evaluación con un (1) lote del Kit *Accupower*® CMV de PCR Cuantitativa con cada concentración, tres (3) réplicas, y una (1) ejecución por día. Así la prueba se realizará a lo largo de tres (3) días en cuatro (4) sistemas diferentes de ExiStation™, lo que resulta en nueve (9) datos por dilución.

En el rango lineal del CMV, el genotipo 1 fue de 2.00 – 8.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma, suero, orina y 2.30 – 8.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en sangre completa, y el genotipo restante fue de 2.00 – 5.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma, suero, orina y 2.30 – 5.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en sangre completa.

También se evaluó el rendimiento de linealidad del Kit *Accupower*® CMV de PCR Cuantitativa que detecta el genotipo 1 a 5 gB del CMV, determinando la diferencia máxima entre gB1 y los otros genotipos gB(gB 2,3,4 y 5). El resultado de este estudio demuestra que la prueba del Kit *Accupower*® CMV de PCR Cuantitativa puede cuantificar diferentes genotipos de CMV gB en todo el rango lineal con una desviación no mayor a 0.20 Log<sub>10</sub> UI/ml.

Tabla 8. Regresión lineal de diferencia máxima

Matriz	CMV gB Genotipo	Ecuación lineal	Diferencia máxima (Log10 UI/ml)	Regresión lineal para diluciones estándar del CMV de la OMS (gB1) y el genotipo CMV gB2-5
Plasma EDTA	1	$y = 0.9689x + 0.2826$	N/D	
	2	$y = 0.9400x + 0.4999$	-0.16	
	3	$y = 0.9376x + 0.3518$	0.18	
	4	$y = 0.9527x + 0.2589$	0.15	
	5	$y = 0.9789x + 0.3254$	-0.12	
Suero	1	$y = 0.9529x + 0.3804$	N/D	
	2	$y = 0.9717x + 0.4007$	-0.17	
	3	$y = 0.9575x + 0.4373$	-0.09	
	4	$y = 0.9342x + 0.4530$	0.08	
	5	$y = 0.9472x + 0.2304$	0.20	
Orina	1	$y = 1.0087x + 0.1323$	N/A	
	2	$y = 1.0139x + 0.1135$	-0.02	
	3	$y = 0.9575x + 0.3544$	0.19	
	4	$y = 0.9839x + 0.1612$	0.17	
	5	$y = 0.9750x + 0.2424$	0.16	
Sangre completa EDTA	1	$y = 1.0152x - 0.0427$	N/A	
	2	$y = 1.0295x - 0.1680$	0.18	
	3	$y = 1.0226x - 0.1559$	0.18	
	4	$y = 1.0108x - 0.1027$	0.18	
	5	$y = 1.0167x - 0.1185$	0.16	



### Confirmación del LoQ para el genotipo gB 2, 3, 4 y 5 del CMV

El Kit *AccuPower®* CMV de PCR Cuantitativa puede detectar los cuatro (4) genotipos (Genotipo 2, 3, 4, 5 del CMV) a concentraciones por debajo de 2.00 Log<sub>10</sub> UI/ml (plasma, suero, orina), 2.30 Log<sub>10</sub> UI/ml (sangre completa) con una tasa de posibilidad de 100%. Se analizó el error total en los datos del genotipo LoQ y como resultado, se confirmó el resultado por debajo del valor de error total en cada concentración.

**Tabla 9. Confirmación de límite de cuantificación, utilizando el genotipo gB2, gB3, gB4 y gB5**

Matriz	CMV gB Genotipo	No. de pruebas	Nominal con. (UI/ml)	Nominal con. (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Promedio Medida Con. (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Sesgo	SD	Sesgo  +2 x SD	SQRT [2]x2 x SD
EDTA-plasma	gB2	25	100	2.00	2.50	0.50	0.24	0.97	0.67
	gB3	25	100	2.00	2.12	0.12	0.34	0.81	0.97
	gB4	25	100	2.00	2.40	0.40	0.28	0.96	0.79
	gB5	25	100	2.00	2.34	0.34	0.32	0.97	0.90
Suero	gB2	25	100	2.00	2.42	0.42	0.28	0.99	0.79
	gB3	25	100	2.00	2.39	0.39	0.30	0.99	0.86
	gB4	25	100	2.00	2.40	0.40	0.24	0.88	0.67
	gB5	25	100	2.00	2.41	0.41	0.27	0.96	0.78
Orina	gB2	25	100	2.00	2.15	0.15	0.32	0.79	0.90
	gB3	25	100	2.00	2.30	0.30	0.29	0.88	0.83
	gB4	25	100	2.00	2.23	0.23	0.29	0.81	0.82
	gB5	25	100	2.00	2.36	0.36	0.31	0.97	0.86
Completa sangre	gB2	25	200	2.30	2.18	-0.12	0.32	0.76	0.90
	gB3	25	200	2.30	2.11	-0.19	0.34	0.87	0.95
	gB4	25	200	2.30	2.10	-0.20	0.31	0.83	0.89
	gB5	25	200	2.30	2.17	-0.13	0.35	0.82	0.98

### 3) Precisión

Se determinó la demanda de precisión del Kit *AccuPower®* CMV de PCR Cuantitativa mediante el análisis del panel estándar internacional (1º Estándar internacional de la OMS) y del plásmido de CMV (BIONEER corp.). Se probaron 3 niveles de dilución en 80 réplicas para cada nivel a través de tres lotes del Kit *AccuPower®* CMV de PCR Cuantitativa utilizando el sistema por 20 días en plasma EDTA, suero, sangre completa y orina (para repetibilidad).

El experimento entre sitios se realizó en 3 lotes, 2 réplicas por muestra, y 2 ejecuciones por día durante 5 días. El experimento entre operadores y entre instrumentos se realizó en 1 lote, 2 réplicas por muestra, y 2 ejecuciones por día durante 5 días. El experimento entre sitios se realizó en 1 lote, 2 réplicas por muestra, y 2 ejecuciones por día durante 5 días (para reproducibilidad).

Tabla 10. El resultado de reproducibilidad en el plasma EDTA

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	Dentro de la ejecución SD(S <sub>r</sub> )	SD Entre ejecución (S <sub>r</sub> )	SD Entre días (S <sub>ad</sub> )	SD Precisión total (S <sub>r</sub> )
1	140 (2.15)	2.23	80	0.08	0.04	0.07	0.11
2	1000 (3.00)	3.02	80	0.07	0.04	0.01	0.08
3	1000000 (6.00)	6.11	80	0.03	0.01	0.07	0.08
4	Negativo		80	100.0% (80/80) "No detectado"			

Tabla 11. Resultado de repetibilidad en el suero

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	Dentro de la ejecución SD(S <sub>r</sub> )	SD Entre ejecución (S <sub>r</sub> )	SD Entre días (S <sub>ad</sub> )	SD Precisión total (S <sub>r</sub> )
1	190 (2.28)	2.35	80	0.08	0.01	0.13	0.15
2	1000 (3.00)	3.01	80	0.07	0.03	0.12	0.15
3	1000000 (6.00)	5.92	80	0.03	0.02	0.06	0.08
4	Negativo		80	100.0% (80/80) "No detectado"			

Tabla 12. Resultado de reproducibilidad en la sangre completa

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	Dentro de la ejecución SD(S <sub>r</sub> )	SD Entre ejecución (S <sub>r</sub> )	SD Entre días (S <sub>ad</sub> )	SD Precisión total (S <sub>r</sub> )
1	240 (2.38)	2.47	80	0.11	0.03	0.09	0.14
2	1000 (3.00)	3.03	80	0.07	0.01	0.08	0.11
3	1000000 (6.00)	6.10	80	0.06	0.03	0.19	0.20
4	Negativo		80	100.0% (80/80) "No detectado"			

Tabla 13. Resultado de repetibilidad en la orina

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	Dentro de la ejecución SD(S <sub>r</sub> )	SD Entre ejecución (S <sub>r</sub> )	SD Entre días (S <sub>ad</sub> )	SD precisión total (S <sub>r</sub> )
1	198 (2.30)	2.18	80	0.13	0.07	0.11	0.19
2	1000 (3.00)	2.90	80	0.09	0.03	0.11	0.14
3	1000000 (6.00)	6.00	80	0.06	0.02	0.06	0.09
4	Negativo		80	100.0% (80/80) "No detectado"			

Tabla14. Resultado de reproducibilidad en el plasma EDTA

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	SD Entre lotes	SD Entre Sitios	SD Entre operadores	SD Entre instrumentos
1	140 (2.15)	2.22	140	0.10	0.12	0.10	0.09
2	1000 (3.00)	3.00	140	0.09	0.11	0.07	0.09
3	1000000 (6.00)	6.12	140	0.09	0.08	0.04	0.04
4	Negativo		140		100.0% (140/140)	"No detectado"	

Tabla 17. Resultado de reproducibilidad en el suero

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	SD Entre lotes	SD Entre Sitios	SD Entre operadores	SD Entre instrumentos
1	190 (2.28)	2.38	140	0.14	0.12	0.12	0.12
2	1000 (3.00)	3.06	140	0.14	0.14	0.07	0.07
3	1000000 (6.00)	5.94	140	0.12	0.14	0.05	0.06
4	Negativo		140		100.0% (140/140)	"No detectado"	

Table16. Resultado de reproducibilidad en la sangre completa

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	SD Entre lotes	SD Entre Sitios	SD Entre operadores	SD Entre instrumentos
1	240 (2.38)	2.41	140	0.15	0.10	0.15	0.10
2	1000 (3.00)	3.01	140	0.10	0.07	0.09	0.07
3	1000000 (6.00)	6.14	140	0.21	0.06	0.25	0.09
4	Negativo		140		100.0% (140/140)	"No detectado"	

Tabla 17. Resultado de reproducibilidad en la orina

Nivel	Valores nominales UI/ml (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Valores medios observados (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N de pruebas	SD Entre lotes	SD Entre Sitios	SD Entre operadores	SD Entre instrumentos
1	198 (2.30)	2.18	140	0.15	0.14	0.20	0.14
2	1000 (3.00)	2.89	140	0.14	0.12	0.16	0.14
3	1000000 (6.00)	6.09	140	0.15	0.17	0.09	0.10
4	Negativo		140		100.0% (140/140)	"No detectado"	

#### 4) Sustancias interferentes

Se realizaron pruebas de interferencia para determinar si las posibles sustancias interferentes afectarían los resultados del ensayo ADN PCR. Las muestras clínicas conocidas por ser positivas o negativas para el objetivo fueron dotadas con altos niveles de sustancias potencialmente interferentes y probadas. Se probaron al menos tres réplicas por cada sustancia. No se observó ninguna interferencia para las sustancias enumeradas en la Tabla 15.

**Tabla 18. Sustancias interferentes**

Fase de interfase exógeno		Fase de interfase exógeno	
Sustancia interferente potencial	Concentración	Sustancia interferente potencial	Concentración
Heparina	3 KU/dL	Azatioprina	4 mg/L
Hemoglobina	200 mg/dL	Ciclosporina	1.125 g/L
Citrato	0.327M	Micofelonato sódico	80m g/L
Albúmina	5 g/dL	Prednisona	0.5 mg/L
K2 EDTA	540 mg/dL	Ganciclovir	32 mg/L
Colesterol	500 mg/dL	Valganciclovir	113 M/ml
Bilirrubina	25 mg/dL	Cidofovir	81 mg/L
Glucosa		Foscarnet	700 mg/L
Condición ácida		Sulfamehozazole	200 mg/L
Condición básica		Timetropin	138 umol/L
		Cefotetan(Cefotaxim)	673 umol/L
		Piperacilina	1 g/L
		Tazobactam sódico	125 mg/L
		Clavulanata potásico	25 mg/L
		Clorhidrato de vancomicina	22 mg/L
		Fluconazol	1 mg/L

## 5) Reactividad cruzada

Se probaron un total de 46 especies de bacterias y virus para detectar una posible reactividad cruzada en el uso del Kit *AccuPower®* CMV de PCR en tiempo real. Se evaluaron tres réplicas de cada ADN. Ninguno de los organismos probados interfirió con el Kit de *AccuPower®* CMV de PCR Cuantitativa. En general, los resultados no mostraron reactividad cruzada de los respectivos patógenos con la detección específica de CMV en términos de sensibilidad.

**Tabla 19. Lista de cruce de posibles organismos de reactividad cruzada**

No.	Patógenos	No.	Patógenos
1	Virus del herpes simple tipo 1	24	parainfluenza 1
2	Virus del herpes simple tipo 2	25	parainfluenza 2
3	Virus varicela-zóster	26	parainfluenza 3
4	Virus de Epstein-Barr	27	parainfluenza 4
5	Virus del herpes humano tipo 6	28	Coxsackievirus tipos B1
6	Virus del herpes humano tipo 8	29	Coxsackievirus tipos B2
7	Virus BK	30	Coxsackievirus tipos B3
8	Virus Hepatitis A	31	Coxsackievirus tipos B4
9	Virus Hepatitis B	32	Coxsackievirus tipos B5
10	Virus Hepatitis C	33	Coxsackievirus tipos B6
11	HIV-1	34	WNV(Virus del Nilo Occidental)
12	Adenovirus tipo 1	35	Mycoplasma pneumoniae
13	Adenovirus tipo 2	36	Staphylococcus aureus
14	Adenovirus tipo 3	37	Streptococcus pneumoniae
15	Adenovirus tipo 5	38	Bordetella pertussis
16	Adenovirus (Ad. 71)	39	Klebsiella pneumoniae
17	Enterovirus tipo 71	40	Legionella pneumophila
18	HTLV	41	Proteus mirabilis
19	InfA(H1N1)	42	Bacillus cereus
20	InfA(H3N2)	43	Enterococcus faecalis
21	InfB	44	Escherichia coli
22	Virus sincitial respiratorio A	45	Candida albicans
23	Virus sincitial respiratorio B	46	ADN genómico humano

## 6) Falla total del sistema

Se probaron 128 réplicas de muestra de baja positividad (concentración de 3 x LoD) para determinar el índice de falla del todo el sistema. Todas las pruebas fueron 100% positivas, indicando que el ensayo CMV es firmemente estable.

**Tabla 20. Índice de falla de todo el sistema**

Matriz	Nominal con. (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Número de positivos detectados	Promedio Medida Con. (Log <sub>10</sub> UI/ml)	SD	Índice de detección (%)
Plasma EDTA	2.15	128	2.23	0.10	100%
Suero	2.28	128	2.35	0.11	100%
Sangre completa	2.38	128	2.46	0.19	100%
Orina	2.30	128	2.22	0.19	100%

## 11.2. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

### 1) Sensibilidad y especificidad del diagnóstico

Se confirmaron un total de 226 pruebas clínicas con otro ensayo cuantitativo de CMV, se utilizaron para la prueba de sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

El porcentaje de acuerdo entre el dispositivo de prueba evaluado y el dispositivo de comparación se calculó de la siguiente manera:

**Tabla 21. Sensibilidad y especificidad del diagnóstico**

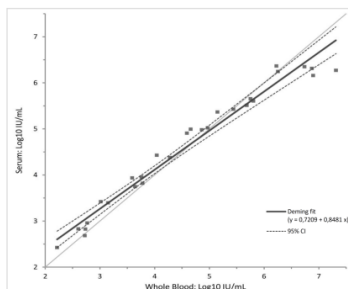
		Sistema de referencia		
		Detectado	No detectado	Total
Kit AccuPower® CMV de PCR Cuantitativa	Detectado	112	0	112
	No detectado	1	113	114
	Total	113	113	226

Sensibilidad diagnóstica (Porcentaje de acuerdo positivo) =99.1% [95% CI 95.2, 99.8%]

Especificidad diagnóstica (Porcentaje de acuerdo negativo) =100% [95% CI 96.7, 100%]

## 2) Equivalencia de sangre completa y suero

Un total de veintiocho (28) muestras emparejadas (muestras de sangre completa y suero), las cuales se recogieron de los pacientes positivos de CMV y del ADN del CMV, se utilizaron para la equivalencia de matriz con el Kit AccuPower® CMV de PCR Cuantitativa. La pendiente de la regresión deming fue 0,8481 (Intervalo de confianza del 95% [0,7627 a 0,9336]) con una intercepción de 0,7209 (Intervalo de confianza del 95% [0,3647 a 1,077]).



	Minimum	Maximum
Whole Blood: Log10 IU/ml	2.217	7.312
Serum: Log10 IU/ml	2.425	6.365

Parameter	Estimate	95% CI
Intercept	0.7209	0.3647 to 1.077
Slope	0.8481	0.7627 to 0.9336
Correlation - r	0.983	

**Fig. 72 Comparación de métodos; Sangre completa y suero**

## 11.3. Estabilidad

### 1) Estabilidad en tiempo real

Se evaluó la estabilidad del Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa desde los resultados, se determinó que el período de validación del Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa es de 1 año a -20°C (-25 a -15°C).

### 2) Estabilidad del ejemplar

Se evaluó la estabilidad del ADN del CMV en la sangre completa (plasma, suero), en el plasma EDTA, en el suero, en la orina, en la sangre completa y en la descongelación de congelados al utilizar el Kit *AccuPower*® CMV de PCR Cuantitativa con el panel estándar internacional del CMV de la OMS.

La estabilidad de la sangre, plasma y suero se probó a cada punto de tiempo de cada condición de temperatura. Los resultados son resumidos en la tabla 19.

El resultado de la estabilidad del ejemplar encontró que el TAE es inferior a 0,42 y el valor cuantitativo de la muestra cumple los criterios de aprobación.

Como resultado, se confirmó que el espécimen de sangre completa (plasma, suero) era estable a 2-8°C por 72 horas, y 25-30°C por 24 horas.

Se confirmó que los ejemplares de plasma, suero y orina eran estables en la siguiente condición. A temperatura ambiente (25°C–30°C) por un máximo de 24 horas, entre 2°C a 8°C por un máximo de 6 días, y entre –15°C y –25°C durante 6 meses.

Se confirmó que la congelación/descongelación repetida hasta cinco veces de los ejemplares de plasma EDTA, suero y orina no afecta su estabilidad, y como resultado está garantizada su estabilidad contra la congelación/descongelación un máximo de cuatro veces.

Se confirmó que el ejemplar de sangre completa era estable en las siguientes condiciones: A temperatura ambiente (25°C–30°C) por un máximo de 24 horas, y entre 2°C a 8°C por un máximo de 6 días.

**Tabla 19. Estabilidad del ejemplar**

Tipo de ejemplar	Temperatura de almacenamiento	Duración
Sangre (Plasma EDTA/Suero)	2–8°C	72 horas
	25–30°C	24 horas
Plasma EDTA Suero Orina	25–30°C	24 horas
	2–8°C	6 días
	–15 a –25°C	6 meses
	Descongelación de congelados	5 ciclos
Sangre completa	25–30°C	24 horas
	2–8°C	6 días

### 3) Estudio de simulación de transporte

El estudio de simulación de transporte fue realizado para evaluar si la estabilidad del kit es afectada por el entorno del envío o no. De acuerdo al proceso de envío, tres lotes de los productos finales fueron enviados a una región nacional y devuelto al sitio (BIONEER) para el estudio. Tardó 2 o 3 días para ser devueltos al lugar desde el día en que fueron enviados los productos. Los productos devueltos fueron probados para evaluar su rendimiento contra los productos en el almacén (de –15 a –25°C, día 0). El estudio de simulación de transporte fue realizado utilizando una serie de dilución de ADN del panel CMV de la OMS o del Control Positivo (LODx3, 1000 UI/ml, 1x10<sup>6</sup> UI/ml) incluido en el kit. El Error Analítico Total (TAE) se calculó basado en los valores log<sub>10</sub> UI/ml de cada dilución. En base a estos resultados, la estabilidad del transporte del Kit *AccuPower*® ST18A–Plex de PCR en tiempo real fue verificado en condiciones locales de envío.



## 12. REFERENCIAS

- Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:190–212
- Hayden RT. et al. (2008) Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *J. clin. Microbiol.* 46:157–163
- Carbone A et al. (2008) CMV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist.* 13:577–585
- Forbes BA. 1989. Acquisition of Cytomegalovirus Infection: an Update. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 1989, p. 204–216
- Souza IE, Nicholson D, Matthey S, et al. 1994. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by polymerase chain reaction and a nonradioactive probe. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 20:13–19.
- Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, Ohshiro M, et al. 2003. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatrics.* 111:1333–6.
- Mocarski ES, Courcelle CT. 2001. Cytomegaloviruses and their replication. In: *Fields Virology*. eds. Knipe D and Howley P. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2629–2674.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 10:413–417. 19.
- Heid CA, Stevens J, Livak K, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986–994. 20.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gen* 93:125–128.
- Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD and the collaborative study group. 2010. Collaborative Study to evaluate the proposed It WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-based Assays. WHO ECBS Report WHO/BS/10.2138
- Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis* 2002; 186(6):829–33
- Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Kraiden M, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68(9):1305–11
- Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, Espy MJ, Smith TF, Paya CV. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis* 2000; 181(2):717–20
- David Tarragó, Carmen Quereda, Antonio Tenorio. Different Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype Distribution in Serum and Cerebrospinal Fluid Specimens Determined by a Novel Multiplex Nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, July 2003, p. 2872–2877, 1128 / JCM. 41.7–2872– 2877.2003

### 13. SÍMBOLOS



Número de catálogo



Límites de temperatura



Dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*



Contiene suficiente para la prueba



Fabricante



Cuidado, consulte los documentos acompañantes



Código del lote



Fecha de vencimiento



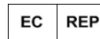
No reutilizar



Consulte las instrucciones de uso



Advertencias por peligro e irritación



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Marca de Conformidad Europea



Mantener alejado de la luz solar

## • Bioneer Worldwide

### **Bioneer Corporation**

Dirección: 8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon 34302, República de Corea  
Tel: +82-42-930-8777 (Corea del Sur: 1588-9788)  
Fax: +82-42-930-8688  
Email: sales@bioneer.com  
Web: www.bioneer.com

### **Bioneer Inc.**

Dirección: 155 Filbert St. Suite 216 Oakland, CA , 94607, EE.UU.  
Tel: +1-877-264-4300 (Línea gratuita)  
Fax: +1-510-865-0350  
Email: order.usa@bioneer.com  
Web: us.bioneer.com

### **Bioneer R&D Center**

Dirección: Korea Bio Park BLDG #B-702, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si Gyeonggi-do, 13488, República de Corea  
Tel: +82-31-628-0500  
Fax: +82-31-628-0555  
Email: sales@bioneer.co.kr  
Web: www.bioneer.co.kr