

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa



**REF** HCV-1111

**IVD** Kit de prueba cualitativa  
ARN del Virus de hepatitis C

# **Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa**

## **Guía del Usuario**



**Versión No.: 3.6 (2019-12-12)**

**Por favor lea toda la información en el folleto antes de usar la unidad**



**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)

## **Advertencias y Precauciones de Seguridad**

Por favor, pregúntele al Centro de Servicio al Cliente de BIONEER (ds@bioneer.co.kr) sobre cómo obtener una copia de la Ficha de Datos de Seguridad del Material (MSDS) para este producto.

Por favor, lea la Guía del Usuario y verifique la integridad de todos los tubos, puntas y otros materiales suministrados con este kit antes de su uso.

Antes, durante y después del uso de este kit según lo descrito en esta Guía del Usuario, todos los materiales potencialmente peligrosos (por ej. materiales que puedan llegar a tener contacto con las muestras clínicas) incluyendo tubos, puntas y materiales deberán ser procesados y eliminados de acuerdo con las regulaciones correspondientes y apropiadas de la municipalidad / gobierno en donde 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).

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.

---

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

### Marcas Registradas

*AccuPower*<sup>®</sup> es una marca comercial registrada de BIONEER Corporation, República de Corea del Sur. *ExiStation*<sup>™</sup>, *Exicycler*<sup>™</sup> 96, *ExiSpin*<sup>™</sup> y *ExiPrep*<sup>™</sup> son marcas comerciales de BIONEER Corporation, República de Corea.

FAM y TAMRA son marcas comerciales de Applera Corporation.

Excel<sup>™</sup> es una marca comercial registrada de Microsoft Corporation.

### Derechos reservados

Derechos reservados 2019. Bioneer Corporation. Todos los derechos reservados

### Aviso

Bioneer Corporation se reserva el derecho a hacer correcciones, modificaciones, mejoras y otros cambios a sus productos, servicios, especificaciones, o descripciones del producto en cualquier momento sin avisar. Toda la información provista aquí está sujeta a cambios sin aviso.

## CONTENIDO

1.	USO PREVISTO.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	1
3.	CARACTERÍSTICAS Y PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	1
4.	CONTENIDO E INSTRUMENTOS RELACIONADOS .....	3
4.1	CONTENIDO DEL KIT .....	3
4.2	INSTRUMENTOS RELACIONADOS .....	4
5.	CONDICIÓN DE ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL .....	4
6.	MATERIALES Y EQUIPOS REQUERIDOS (NO PROPORCIONADOS EN EL KIT) .	5
7.	PRECAUCIONES GENERALES .....	6
8.	PROTOCOLO .....	7
8.1	EQUIPOS Y ENTORNO DE LABORATORIO .....	7
8.2	EJEMPLARES .....	8
8.3	FLUJO DE TRABAJO.....	9
8.4	PARTE 1. ASIGNACIÓN DE LA PRUEBA USANDO EL PROGRAMA <i>ExiSTATION</i> <sup>™</sup> <b>MANAGER</b> 10	
8.5	PARTE 2. EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO MEDIANTE EL <i>ExiPREP</i> <sup>™</sup> <b>16 DX</b> .....	15
8.6	PARTE 3. EJECUCIÓN DEL <i>ExiPREP</i> <sup>™</sup> <b>16 DX</b> Y DEL <i>ExiCYCLER</i> <sup>™</sup> <b>96</b> USANDO EL SOFTWARE <i>ExiSTATION</i> <sup>™</sup> <b>MANAGER</b> .....	23
8.7	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL ( <i>ExiSTATION</i> <sup>™</sup> <b>48</b> , <i>ExiSTATION</i> <sup>™</sup> <b>48A</b> ) .....	32
8.8	ANÁLISIS DE DATOS .....	45
8.9	CONTROL DE CALIDAD .....	46
9.	CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO .....	47
9.1	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS .....	47
9.2	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DEL DIAGNÓSTICO.....	60
10.	RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	63
11.	REFERENCIAS.....	66
12.	SÍMBOLOS .....	67

## **1. USO PREVISTO**

El Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa es un kit de diagnóstico in vitro diseñado para la cuantificación del ADN del VHC (Virus de Hepatitis C) en muestras de plasma EDTA humano o suero humano mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando el Sistema universal MDx *ExiStation*<sup>™</sup>. El Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa ha sido diseñado para su uso junto con la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio para el seguimiento del pronóstico del paciente o de la terapia antirretroviral mediante la medición del genotipo 1-6 del VHC en un rango desde 8,00 hasta 1,30 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma EDTA y suero humano. Este kit está concebido para una prueba de carga viral de VHC y no para una prueba de detección de la infección por el VHC en muestras clínicas, incluyendo la sangre y los productos sanguíneos.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo de la familia *Flaviviridae*, de forma esférica y con envoltura lipídica. La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica en todo el mundo. El VHC se descubrió a finales de 1989 y suele transmitirse a través de la sangre y los productos sanguíneos o de personas que utilizan drogas intravenosas. Además, los niños nacidos de una madre infectada o aquellos que tengan relaciones sexuales con una pareja infectada tienen los factores de riesgo más altos. Siete genotipos (6 genotipos mayores y 1 genotipo menor) de VHC han sido identificados hasta la fecha. Los genotipos 1-3 tienen una distribución global. Los genotipos 4 y 5 se encuentran principalmente en África, y el genotipo 6 está distribuido en Asia, y el genotipo 7 fue encontrado en la República democrática del Congo. Es recomendable la detección de anticuerpos al VHC (anti VHC) para una prueba diagnóstica de primera línea de la infección de VHC. Si se detectan los anticuerpos anti VHC, se recomienda fuertemente un método de sensibilidad molecular (por ej. ensayo NAT VHC) para detectar el ácido ribonucleico (ARN) del VHC antes del comienzo de la terapia antiviral.

La cuantificación del ARN del VHC para medir la carga viral y la carga viral durante el tratamiento está bien establecida. Se recomienda un fármaco específico para el paciente según el genotipo del VHC. Por ejemplo, se recomienda el IFN- $\alpha$  para el genotipo 1 del VHC y la ribavirina para el genotipo 2-3 del VHC.

El Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa permite la detección del genotipo 1-6 del VHC el cual se utiliza desde la extracción del ácido nucleico hasta la qPCR usando el propio sistema Mdx (sistema *ExiStation*<sup>™</sup>) de Bioneer. El propio sistema Mdx de Bioneer se utiliza desde la extracción del ácido nucleico hasta la qPCR. Este kit está concebido para una prueba de carga viral de VHC y no para una prueba de detección de la infección por el VHC en muestras clínicas, incluyendo la sangre y los productos sanguíneos.

## **3. CARACTERÍSTICAS Y PRINCIPIO DE LA PRUEBA**

---

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

La PCR en tiempo real implica la amplificación selectiva de una secuencia de objetivos (5'-UTR) mientras se monitorea el progreso de la amplificación en tiempo real a través de un agente de visualización como un tinte fluorescente. La transcriptasa inversa de PCR desde el ARN inicial promueve la síntesis del cADN. Después de la síntesis, sigue la amplificación de la PCR mediante la Polimerasa de ADN. 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 después de aglomerarse al amplicon.

El kit fue diseñado para maximizar la reproducibilidad y conveniencia mediante un secado al vacío de todos los reactivos para la PCR incluyendo cebadores, sondas, polimerasa de ADN, dNTPs y sales utilizando nuestra tecnología exclusiva de estabilización para preservar la actividad total de los reactivos mezclados. El conjunto cebador-sonda se seleccionó a partir de un conjunto de combinaciones cebador-sonda diseñadas por algoritmos bioinformáticos para lograr la mayor eficiencia de amplificación posible y para que el programa del termociclador coincida con todos nuestros otros kits de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>. Así pues, este producto puede ejecutarse simultáneamente con otras series de kits de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>.

## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa

### 4. CONTENIDO E INSTRUMENTOS RELACIONADOS

#### 4.1 Contenido del Kit



Fig. 1 Contenido del Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa



## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

No.	Reactivo	Unidad	Cantidad
①	Premezcla HCV	8 pozos/tira x 12 tiras	1 paquete
②	VHC SPC <sup>a</sup> (S1)	1300 $\mu\text{l}$ / tubo (Tubo atornillable verde de 2 ml)	1 tubo
	VHC SPC (S2)		1 tubo
	VHC SPC (S3)		1 tubo
	VHC SPC (S4)		1 tubo
	VHC SPC (S5)		1 tubo
③	VHC LPC <sup>b</sup>	1300 $\mu\text{l}$ / tubo (Tubo atornillable azul de 2 ml)	3 tubos
	VHC HPC <sup>c</sup>	1300 $\mu\text{l}$ / tubo (Tubo atornillable rojo de 2 ml)	3 tubos
④	VHC NTC <sup>d</sup>	1300 $\mu\text{l}$ / tubo (Tubo atornillable transparente de 2 ml)	3 tubos
⑤	Neutralizador SL	1300 $\mu\text{l}$ / tubo (Tubo atornillable transparente de 2 ml)	2 tubos
⑥	Cinta de sellado óptico	-	1 hoja.
⑦	Manual Rápido	-	1 c/u

a : Control Positivo Estándar, b : Control Positivo Bajo, c : Control Positivo Alto, d : Control Sin Plantilla

### 4.2 Instrumentos relacionados

Este kit está optimizado para su uso con el Sistema universal de Diagnóstico molecular *ExiStation*<sup>™</sup> de BIONEER. Para instrucciones detalladas, consulte 8. Protocolo en esta Guía del Usuario.

### 5. CONDICIÓN DE ALMACENAMIENTO Y VI



El kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa debe almacenarse a -25 ~ -15°C lejos de los rayos UV/luz solar. Se garantiza que el kit sea estable hasta la fecha de vencimiento (12 meses) impresa en la etiqueta. Debe evitarse la descongelación y congelación repetida del tubo de qPCR premezclado para el VHC, de los SPC y de los PC, ya que esto puede reducir el rendimiento del ensayo. Si se espera un uso intermitente del kit y de los componentes (tubo de qPCR premezclado para el VHC, los SPC y los PC), el tubo de qPCR premezclado para el VHC es estable hasta 10 ciclos de congelación/descongelación y los SPC (SPC para el VHC (1)-(5))/PC (HPC/LPC) son estables hasta 3 ciclos de congelación/descongelación.

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

<b>Sistema</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Reactivo (Extracción)</b>
<b>ExiStation™ (A-2200)</b>	- <i>ExiPrep™</i> 16 Dx (Cat. No. A-5050) -Bloque térmico cuantitativo en tiempo real <i>Exicycler™</i> 96 (Cat. No. A-2060)	- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ADN/ARN Viral (K-4471) - Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ARN Viral (K-4473)
<b>ExiStation™ V4 (A-2200-N)</b>	- <i>ExiPrep™</i> 16 Dx (Cat. No. A-5050) - Bloque térmico cuantitativo en tiempo real <i>Exicycler™</i> 96 ver.4 (Cat. No. A-2060-1)	- Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ADN/ARN Viral (K-4471) - Kit <i>ExiPrep™</i> Dx de ARN Viral (K-4473)
<b>ExiStation™ 48 (A-2400) ExiStation™ 48A (A-2410)</b>	- <i>ExiPrep™</i> 48 Dx (Cat. No. A-5150) - Bloque térmico cuantitativo en tiempo real <i>Exicycler™</i> 96 ver.4 (Cat. No. A-2060-1) - <i>ExiLT</i> (Cat.No. A-7100)	- Kit <i>ExiPrep™</i> 48 de ADN/ARN Viral (K-4571) - Kit <i>ExiPrep™</i> 48 de ARN Viral (K-4573)
<b>Etc</b>	- <i>ExiSpin™</i> (Cat. No. A-7040)	N/A

## **7. PRECAUCIONES GENERALES**

- La PCR en tiempo real con este kit debe realizarse usando el Bloque Térmico Cuantitativo en tiempo real *Exicycler™* 96.
- Por favor lea esta Guía del Usuario antes de su uso.
- Todos los ejemplares de los pacientes deben ser manipulados como material infeccioso.
- Use siempre guantes y una máscara cuando maneje ejemplares o agentes.
- Cambie los guantes después del contacto con contaminaciones potenciales, por ej. ejemplares, eluyentes, etc.
- Lávese las manos vigorosamente después de manipular ejemplares y reactivos y quítese los guantes.
- No pipetee oralmente.
- No coma, beba o fume en áreas especializadas de trabajo.
- NO reutilice los reactivos abiertos ni mezcle reactivos de distintos lotes de producción.
- NO cambie el protocolo según lo descrito en esta Guía del Usuario.
- Siempre use puntas de pipeta desechables que estén filtradas y esterilizadas.
- Las muestras clínicas y sus derivados deben almacenarse en una ubicación/congelador por separado de donde es almacenado el resto de los componentes del kit.
- NO congele todas las muestras de sangre o cualquier muestra almacenada en un tubo principal.
- Debe permitirse que todos los componentes del kit se descongelen por al menos 10 minutos antes de iniciar un experimento.
- Gire rápidamente y centrifugue todos los componentes del kit por poco tiempo después de descongelarlos para garantizar resultados óptimos.
- Todos los SPC o PC deben ser añadidos en una ubicación físicamente separada de donde es reconstituida la premezcla.
- Tenga cuidado cuando utilice las tijeras o el cúter.
- Limpie y desinfecte las muestras derramadas y/o el área de trabajo dedicada con hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada (dilución 1:10 de blanqueador líquido de uso doméstico) y deberá enjuagarse a fondo con etanol al 70% o agua destilada.
- DESECHE LOS DESPERDICIOS (desperdicios líquidos, productos plásticos o desperdicios biológicos) de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o con el procedimiento interno del laboratorio.

## 8. PROTOCOLO

### 8.1 Equipos y entorno de laboratorio

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.

Cuando maneje las muestras clínicas, todos los trabajos relacionados (es decir, destapado, pipeteo, tapado de muestras clínicas y contenedores) **deben ser llevadas a cabo dentro de una cabina de bioseguridad de presión negativa (clase II o III)**. La cabina de bioseguridad de presión negativa envía aire desde el espacio externo del laboratorio. En otras palabras, el aire fluye hacia adentro. Este flujo de aire evita que las sustancias peligrosas contaminen el entorno del laboratorio.

Cuando abra los contenedores esterilizados tales como Cartuchos neutralizadores incluidos dentro del kit (kit de preparación serie *ExiPrep™ Dx*), el trabajo deberá llevarse a cabo en un entorno de presión positiva para evitar que los contaminantes ambientales entren y dañen los suministros estériles. La cabina de bioseguridad de presión positiva es un espacio de trabajo donde el aire filtrado fluye hacia afuera, por tanto mantiene un entorno limpio dentro del espacio de trabajo.

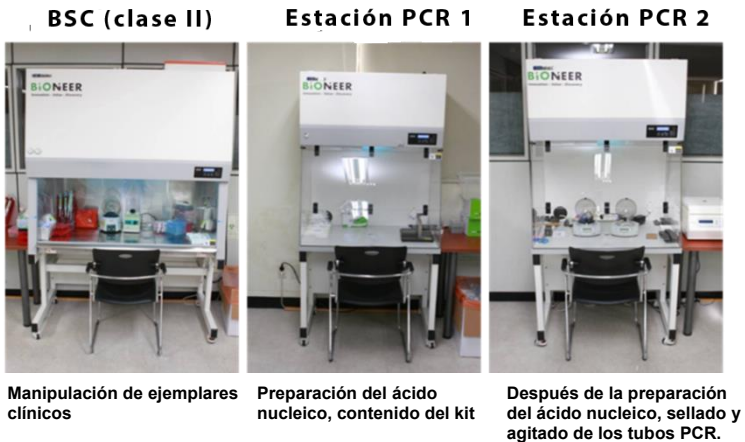


Fig. 2 Cabina de bioseguridad (BSC)

## **8.2 Ejemplares**



Todas las muestras deben ser tratadas como potenciales peligros biológicos. Para mejores resultados, recomendamos ADN extraído de las muestras de plasma EDTA humana o de suero humano.

### **8.2.1 Recopilación de Ejemplares**

El Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa está optimizado para el ARN extraído de las muestras de plasma EDTA humana o de suero humano. Para la recolección de plasma EDTA o para el suero humano, puede utilizarse los tubos estándar de recolección de ejemplares tales como tubos desechables que contienen EDTA como anticoagulante. Todas las muestras deberán guardarse en contenedores sin preservantes.

### **8.2.2 Transporte de Ejemplares**

Todas las muestras deberán ser transportadas en un contenedor de transporte a prueba de choques para evitar una posible infección a causa de una fuga de la muestra. Las muestras deberán ser transportadas de acuerdo con las pautas locales o nacionales respecto al transporte de peligros biológicos. La sangre total recogida en tubos de EDTA debe almacenarse y/o transportarse dentro de 24 horas a una temperatura entre 2°C y 25°C

### **8.2.3 Preservación de ejemplares**

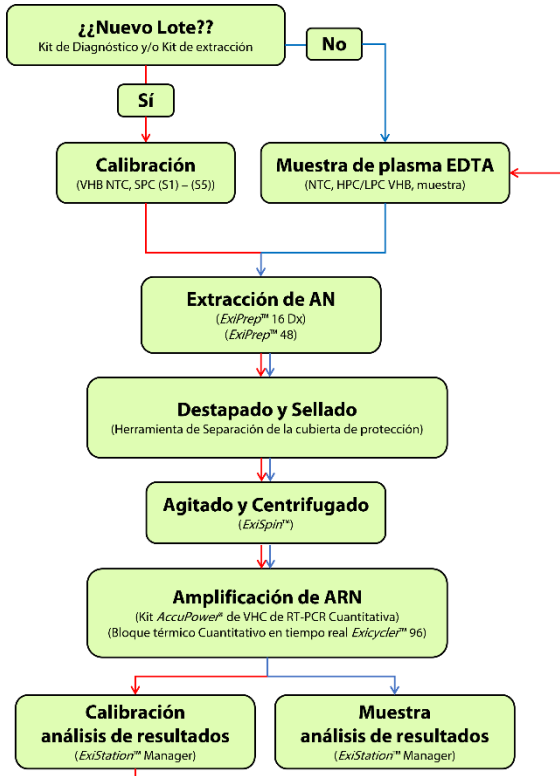
El plasma humano aislado con EDTA o el suero humano pueden almacenarse con la siguiente condición. Temperatura ambiente (25~30°C) por hasta 1 día. Temperatura entre 2 y 8°C por hasta 7 días. Temperatura entre -15~-25°C y -70~-80°C durante 4 semanas.

### **8.2.4 Sustancias Interferentes**

Las muestras clínicas pueden contener una variedad de inhibidores de PCR. Para una PCR eficaz, estos inhibidores deben eliminarse durante el proceso de extracción y purificación del ADN.

### 8.3 Flujo de Trabajo

El Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa está diseñado para el uso con el Sistema universal de Diagnóstico molecular ExiStation™.



**Fig. 3 Flujo de trabajo**

Cuando utilice el kit de acuerdo con el 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*. La PCR puede llevarse a cabo sin pasos adicionales para la preparación de la mezcla de PCR cuando se usa con el Sistema universal de Diagnóstico molecular ExiStation™. Después que se haya completado la PCR, los datos pueden analizarse automáticamente mediante el software ExiStation™ Manager. Para más instrucciones, por favor refiérase a esta Guía del Usuario (8.4 Procedimiento (Sistema universal de Diagnóstico molecular ExiStation™)).

#### 8.4 Parte 1. Asignación de la prueba usando el programa *ExiStation*<sup>™</sup> Manager

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

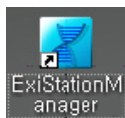


Fig. 4 Ícono del Software *ExiStation*<sup>™</sup> Manager

- 3) Encienda el *ExiPrep*<sup>™</sup> 16 Dx presionando el botón de encendido ubicado al frente del instrumento. Presione la imagen 'STARTING (INICIANDO)' mostrada en la LCD para iniciar el arranque del instrumento.



Fig. 5 Botón de arranque y botón principal de encendido del *ExiPrep*<sup>™</sup> 16 Dx

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



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

- 5) Adjunte el papel filtro sobre el Protector de Contaminación. Coloque el Protector de Contaminación y luego el Protector de puntas en el instrumento. Presione de nuevo el botón 'Misc Set (Ajustes Misc)'.

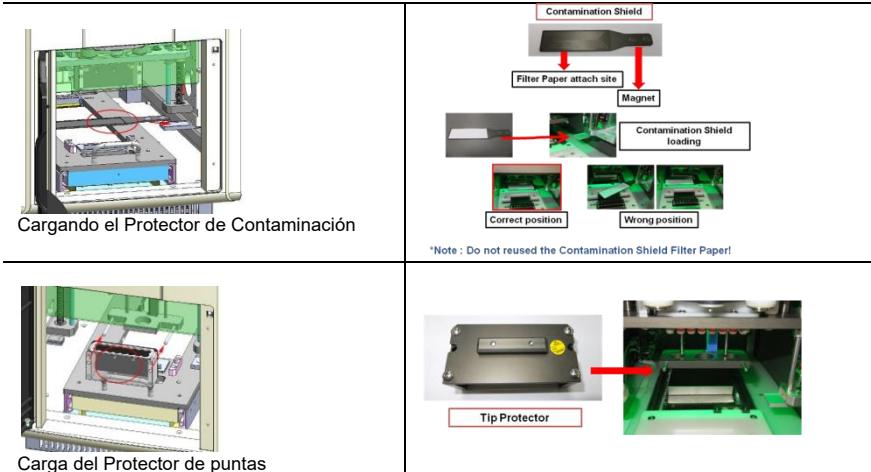


Fig. 7 Carga del Protector de Contaminación, Protector de las Puntas

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)

**Result (Resultado)** - cuando la PCR se haya completado, presenta la información del resultado, experimento y muestra

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

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



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



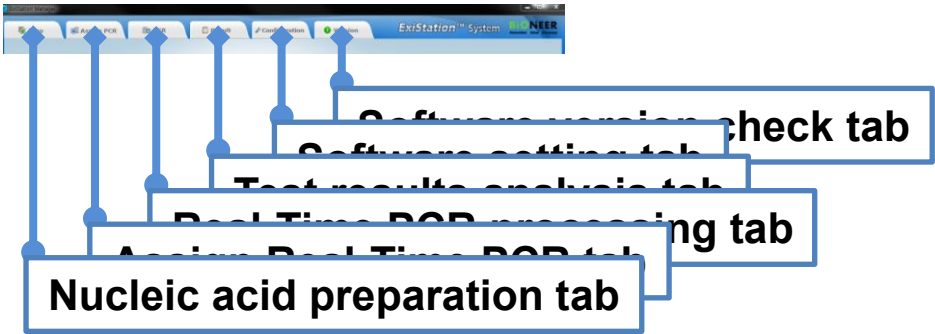


Fig. 9 Función de la pestaña del software *ExiStation*<sup>™</sup> Manager

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

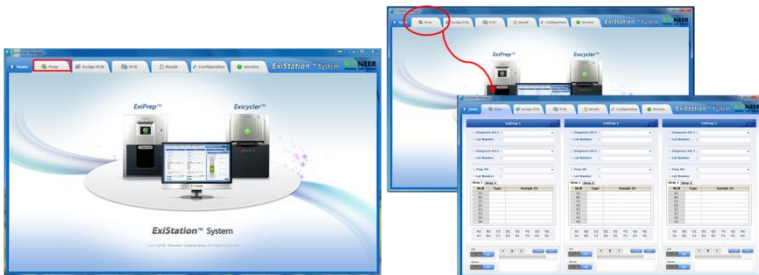


Fig. 10 El panel de control de preparación consta de 5 paneles

El panel de control de preparación consta de 5 paneles.

**Panel de estado de los instrumentos** - estado del *ExiPrep*<sup>™</sup> 16 Dx

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

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

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

**Panel de control *ExiPrep*<sup>™</sup> 16 Dx** - Botón del control del *ExiPrep*<sup>™</sup> 16 Dx que incluye el controlador UV, controlador de almacén, controlador de ejecución, controlador de ajustes MISC

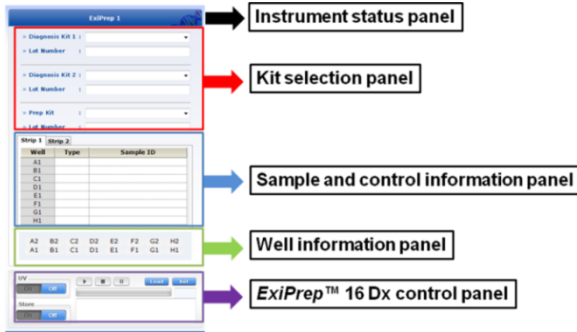


Fig. 11 Panel de control Prep del software *ExiStation™* Manager

8) Haga clic en la flecha desplegable para 'Diagnosis Kit 1 (Kit de Diagnóstico 1)'. Aparecerá una ventana emergente. Seleccione 'HCV-1111' de los menús desplegables.

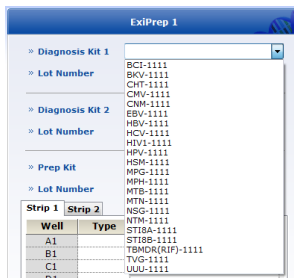


Fig. 12 Selección del kit de Diagnóstico

9) Después de seleccionar el 'Diagnosis Kit (Kit de Diagnóstico)', aparecerá una pantalla emergente. Inspeccione el Cartucho neutralizador y marque el pozo utilizado haciendo clic en la ubicación correspondiente para excluir el pozo usado de la asignación de la muestra. Seleccione 'OK' para terminar.

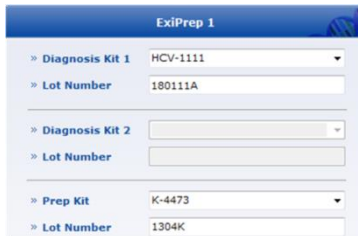


**Fig. 13 Ventana emergente 'Prep' en el software ExiStation™ Manager**

10) Haga clic en la flecha desplegable para el 'Prep Kit (Kit de Preparación)'. Aparecerá automáticamente una ventana emergente del 'Prep kit (Kit de preparación)' para el kit de diagnóstico seleccionado. Seleccione 'Prep Kit (Kit de Preparación)' desde los menús desplegables.

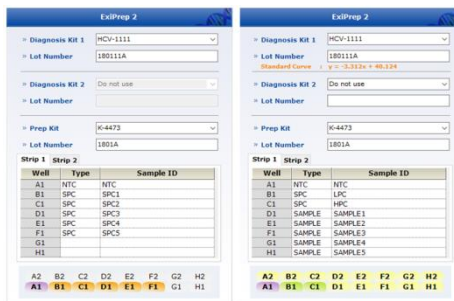
11) Ingrese el número de lote del kit de diagnóstico y el kit de preparación. El programa asignará automáticamente los pozos NTC y SPC (o PC).

El lote del kit de diagnóstico y/o del kit de extracción es nuevo, el programa asigna automáticamente el NTC y el SPC 1 hasta 5. Cuando se utiliza la misma combinación de lotes del kit de diagnóstico y del kit de extracción para el ensayo anterior, la curva estándar se guarda automáticamente y sólo se asigna 1 LPC (Control Positivo Bajo) y 1 HPC (Control Positivo Alto) como control positivo.



**Fig. 14 Ingreso del Número de Lote**

12) Haga clic en la columna 'Sample ID (ID de la muestra)', usando un lector de código de barra (opcional) o escribiéndolo manualmente.



**Fig. 15 Ingreso del Sample ID (ID de la Muestra (Primer ensayo/Ensayo repetido))**

**8.5 Parte 2. Extracción del ácido nucleico mediante el ExiPrep™ 16 Dx**

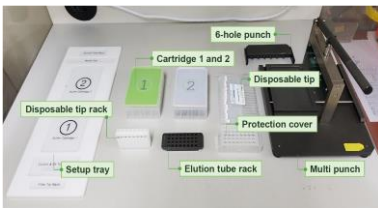
1) Bioneer recomienda el uso de una BSC (Clase II) y una banqueta de limpieza para el funcionamiento del sistema ExiStation™.

2) Limpie la superficie (preferiblemente una BSC de presión positiva) 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) Preparar el kit de preparación de ácido nucleico en la estación PCR 1.



No.	Componentes	Componente de
1	Bandeja de utensilios	ExiPrep™16 Dx
2	Cartucho 1 y 2	Kit de Extracción
3	Gradilla para puntas desechables	ExiPrep™16 Dx
4	Gradilla de tubos de elución	ExiPrep™16 Dx
5	Puntas desechables	Kit de Extracción
6	Cubierta de Protección	de Kit de Extracción
7	Perforadora de 6 agujeros	ExiPrep™16 Dx
8	Perforadora múltiple	Opcional

**Fig. 16** Lista de componentes necesarios para la extracción del ácido nucleico

4) Retire la envoltura retráctil que cubre a los dos cartuchos neutralizadores ① y ② y luego retire las tapas.

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

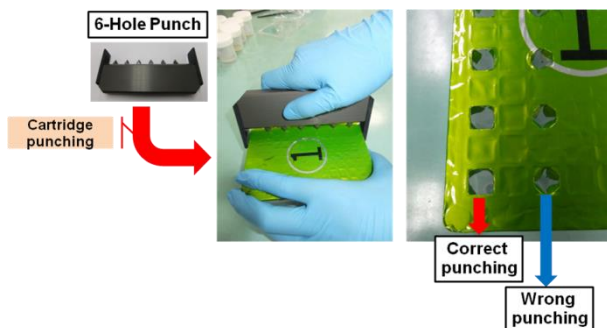


**Fig. 17** Remoción de las tapas

5) Perfore la cinta con la Perforadora 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. 18 Perforación de la cinta con la Perforadora**

6) Cubra los cartuchos neutralizadores ① y ② con las tapas acrílicas luego de que la perforación de la cinta se haya completado.

7) Coloque los cartuchos neutralizadores en la bandeja de utensilios.



**Fig. 19 Instalación del cartucho neutralizador en la bandeja de utensilios**

8) Tome el número necesario de tiras de los Tubos del Kit de Diagnóstico del congelador. Retire el papel aluminio que cubre los tubos. Inserte la cantidad apropiada de tubos del kit de diagnóstico 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 estar seguro que los tubos de diagnóstico han sido marcados de manera que se pueda identificar después.**

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa



En la parte inferior de la gradilla de tubos de elución, hay una ranura ajustada al instrumento *ExiPrep*<sup>™</sup> 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.

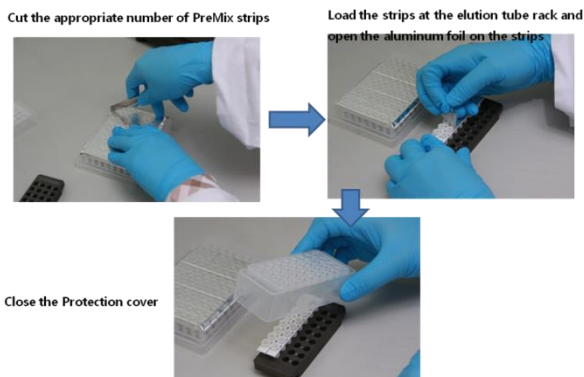


Fig. 20 Inserción de los tubos del Kit de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup> dentro de la Gradilla de tubos de elución

9) Coloque la Gradilla de Tubos de Elución (que contiene el Kit de Diagnóstico) en la bandeja de utensilios.

10) Cargue el número apropiado de Puntas desechables en la Gradilla de las puntas desechables.

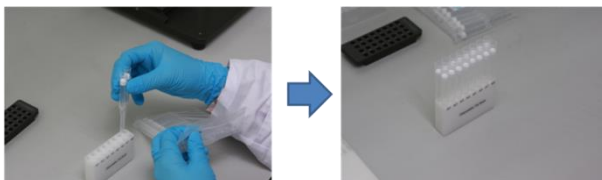


Fig. 21 Carga de las puntas de filtro desechables en la Gradilla de las puntas desechables

11) Coloque la gradilla de las puntas desechables en la bandeja de utensilios.

12) Coloque la bandeja de desperdicios en la bandeja de utensilios



Fig. 22 Carga de la Gradilla de tubos de elución en la Bandeja de utensilios.

13) Mueva la bandeja de utensilios al *ExiPrep*<sup>™</sup> 16 Dx. Abra la puerta y jale la placa base del *ExiPrep*<sup>™</sup> 16 Dx.

14) Coloque el Cartucho neutralizador ② sobre el bloque de calentamiento de la placa base.

⚠ Si el Cartucho neutralizador ② no es colocado adecuadamente en el bloque de calentamiento, esto resultaría en una falla del experimento o una avería al instrumento.

15) Coloque 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.

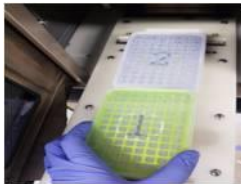


Fig. 23 Carga del cartucho neutralizador

16) Coloque la Gradilla de tubos de elución y la Gradilla de las puntas desechables sobre la placa base.

Nota: Compruebe que la cubierta de protección esté apropiadamente asegurada sobre la gradilla del tubo de elución.

## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa



Fig. 24 Insetión de las puntas desechables en la gradilla de puntas desechables.

17) Coloque la bandeja de desperdicios entre la Gradilla de los tubos de muestras y el Cartucho neutralizador ②.



**Sea cuidadoso de no dejar caer la gradilla de tubos de Muestra**



Fig. 25 Instalación de la Bandeja de desperdicios

18) Preparación de muestras clínicas, tubos de Carga para Muestra y controles en la BSC. Limpie la BSC de presión negativa sobre la cual se llevará a cabo la extracción del ácido nucleico.



**Limpie la superficie con hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada y enjague 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 lampara UV mientras la BSC está en uso.**




Fig. 26 Preparación de los componentes necesarios para la carga de la muestra



## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

19) Saque los Tubos de Carga de Muestra de ARN IPC del embalaje, márkelos con el nombre de la muestra e insértelos en la gradilla.

 **Antes de usar el Tubo de Carga de la muestra, DEBE revisar que la parte inferior del Tubo de Carga de la muestra sea de color Amarillo (IPC Seco para el ARN)**

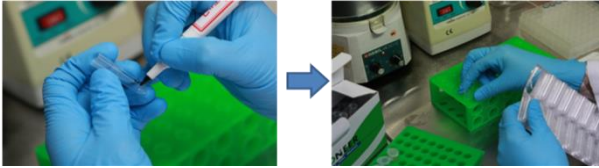



Fig. 27 Preparación del Tubo de carga de muestra


20) Tome los contenedores originales de muestra clínica y los controles (NTC y SPC) y pipetee dentro de los tubos de carga de la muestra de ARN de IPC siguiendo los pasos 21) a 24).

21) Añada 400  $\mu\text{l}$  de neutralizador SL dentro de un tubo asignado como NTC. (suministrados con el kit de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>)

22) Añada además 400  $\mu\text{l}$  de SPC 1~5 dentro de los pozos SPC apropiados. (suministrados con el kit de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>)

 **Cuando el ensayo sea repetido con la misma combinación del lote del Kit de diagnóstico y el kit de extracción, añada 400  $\mu\text{l}$  de LPC (tapa azul) y de HPC (tapa roja) dentro de cada pozo asignado. No se necesita calibración en este caso.**

23) Mueva el tubo lleno con la muestra a la gradilla del tubo de la muestra.

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

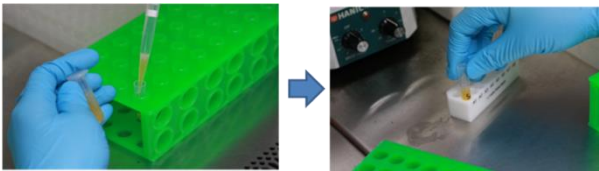


Fig. 28 Carga de la muestra clínica al Tubo de carga de la muestra

## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa

24) Destape el contenedor original de la muestra clínica y pipetee 400  $\mu\text{l}$  de muestra dentro del tubo de carga de la muestra ARN IPC. Mueva el Tubo de Carga de la Muestra ARN IPC a la Gradilla de tubo de la Muestra cuando se haya llenado con la muestra.

25) Repita los pasos de carga de la muestra individualmente hasta que todas las muestras estén cargadas.



**Si por alguna razón se tiene sospecha de contaminación de los guantes o las puntas, inmediatamente cambie los guantes o la punta para evitar la contaminación de las muestras.**

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

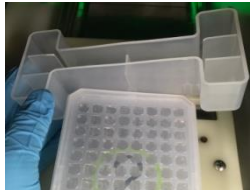


Fig. 29 Remoción de la bandeja de desperdicios

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

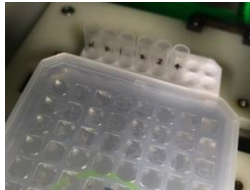


Fig. 30 Instalación la Gradilla de tubos de Muestra

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



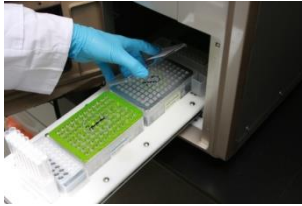
**Sea cuidadoso de no dejar caer la gradilla de los tubos de Muestra**



Fig. 31 Recarga de la bandeja de desperdicios

29) Todos los materiales están cargados.

30) Retire las tapas de los Cartuchos neutralizadores.



**Fig. 32 Remoción de las tapas**

31) Verifique si todos los accesorios están cargados adecuadamente.



**Ceróiese de que las puntas, hoyos y tubos esten todos alineados.**

32) Empuje la placa base con cuidado y cierre la puerta.

### 8.6 Parte 3. Ejecución del *ExiPrep™* 16 Dx y del *Exicycler™* 96 usando el software *ExiStation™* manager

1) Haga clic en el botón 'RUN (▶)' (Ejecutar) del software *ExiStation™* Manager. Compruebe minuciosamente si todos los accesorios 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 iniciar el proceso de preparación.

⚠ El proceso de extracción del ácido nucleico tarda 80-100 minutos dependiendo del tipo de ácido nucleico.

⚠ Si aparece algún mensaje de error durante el proceso de extracción en la, contacte a su oficina local Bioneer para recibir asistencia técnica.



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

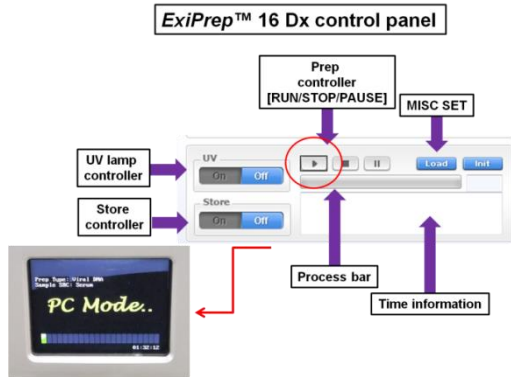


Fig. 34 Panel de control del ExiPrep™ 16 Dx

2) Cuando el proceso de extracción del ácido nucleico haya finalizado, el bloque de enfriamiento se apaga automáticamente.

Abra la puerta del ExiPrep™ 16 Dx (A-5050) cuando el proceso de extracción de ácidos nucleicos haya finalizado, y retire la gradilla de tubos de elución.

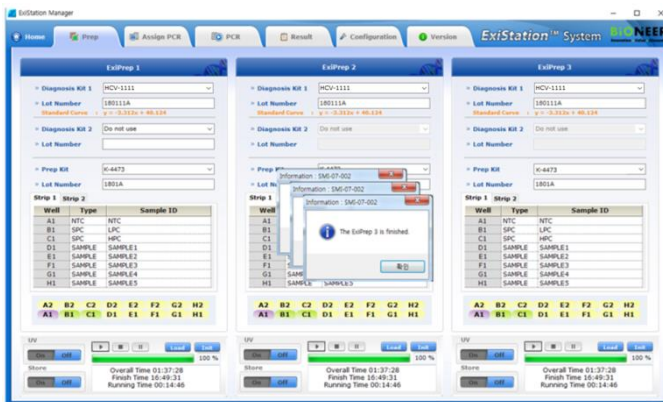


Fig. 35 Mensaje emergente de la extracción terminada

3) Mueva la gradilla de los tubos de elución a la estación PCR 2.



Fig. 36 Preparación de la PCR

4) Por favor retire la Cubierta de protección de acuerdo al método de utilidad de la Herramienta de separación de la Cubierta de protección.



**Cuando haya finalizado la extracción del ácido nucleico, el siguiente paso debe continuar dentro de 10 minutos. Si no, esto puede, esto puede provocar un resultado equivocado.**

① Saque la gradilla del tubo de elución del *ExiPrep™* Dx y colóquela encima de la herramienta de separación de la cubierta de protección.

Nota: Al colocar la Gradilla de Tubo de Elución en la Herramienta de Separación de la Cubierta de protección, la palanca debe estar orientada hacia el lado izquierdo.

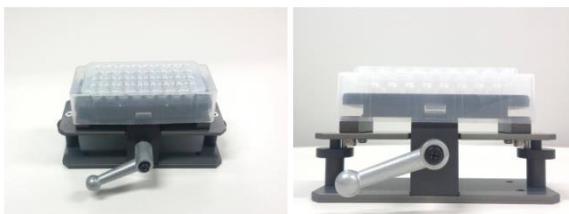


Fig. 37 Imagen de la Gradilla de los tubos de elución en la parte superior de la herramienta de separación de la cubierta de protección

② Sostenga firmemente la Cubierta de Protección y la Herramienta de Separación con una mano. Gire la palanca en el sentido de las agujas del reloj 180° con la otra mano.

Nota: Gire la palanca hasta que la gradilla para tubos de elución quede firmemente fijada a la Herramienta de Separación de la Cubierta de protección.

## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa

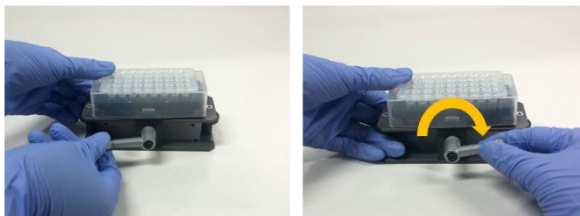


Fig. 38 Imagen de la rotación de la palanca para la fijación de la Gradilla del tubo de elución a la herramienta de separación de la Cubierta de protección

③ Presione hacia abajo ambos lados de la Herramienta de Separación como se muestra en la imagen de abajo. Esta acción empujará la cubierta de protección hacia arriba para que la gradilla de tubos de elución pueda retirarse con facilidad.

Consejo: Sujete 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.

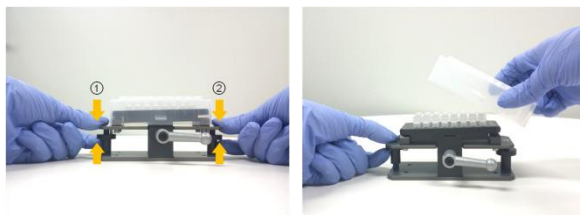


Fig. 39 Imagen de cómo presionar desde cada lado de la herramienta de separación y de la remoción de la cubierta de protección de la herramienta de separación

5) Selle el Tubo de PCR usando una Cinta de sellado óptico y luego proceda al siguiente paso. Para obtener más información sobre el proceso de sellado, consulte el paso 6).

6) Selle los Tubos de diagnóstico con la Cinta adhesiva de sellado óptico.

- |   |  |
|---|--|
| ⚠ | <b>Con el fin de evitar las contaminaciones y resultados inválidos, selle todos los tubos completamente.</b>   |
| ⚠ | <b>Almacene los tubos de diagnóstico sellados a 4°C hasta su uso (si la reacción de preparación es dividida en 2 pasos, almacénelo hasta que finalice la 2da preparación).</b> |

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

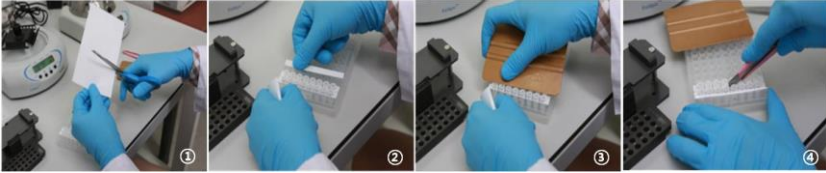


Fig. 40 Sellado de la tira de la premezcla PCR

7) Justo antes de la reacción de la PCR, mezcle completamente el contenido del tubo usando el *ExiSpin*<sup>™</sup> (A-7040). (Parámetros del *ExiSpin*<sup>™</sup>: 2500rpm por 1 seg., Agite fuertemente durante 20 seg./ 20 ciclos)

- ⚠ **La premezcla PCR de Bioneer contiene unos reactivos PCR secados al vacío. El mezclado insuficiente podría ocasionar resultados inválidos, así que mezcle hasta que la premezcla esté completamente disuelta.**
- ⚠ **ASEGURESE DE marcar cada kit de diagnóstico para evitar confusiones.**
- ⚠ **Cuando haya finalizado la extracción del ácido nucleico, el siguiente paso debe continuar dentro de 10 minutos. Si no es así, esto puede provocar un resultado impreciso.**



Fig. 41 Mezcla de la tira de Premezcla PCR utilizando el *ExiSpin*<sup>™</sup>.

- ⚠ **NO manipule el protocolo de *ExiSpin*<sup>™</sup> de forma arbitraria**
- ⚠ **TIENE QUE ajustar el equilibrio.**

8) Mientras el *ExiSpin*<sup>™</sup> esté funcionando, encienda el *Exicycler*<sup>™</sup> 96. Encienda el interruptor de espera, ubicado en la parte trasera del instrumento. La luz del estado LED en la parte frontal del instrumento debe cambiar a color Azul. Presione el interruptor de encendido por 3 segundos. Se iniciará una secuencia breve de autoprueba. Cuando la autoprueba se haya completado, el LED parpadeará en color VERDE con un pitido corto.



## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa

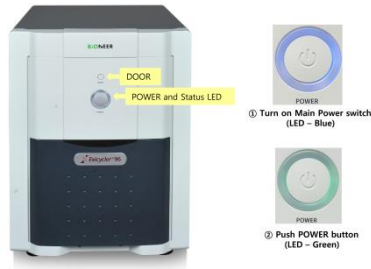


Fig. 42 Botón de funcionamiento (botón de la puerta, botón de encendido y estado del LED) de Exicycler™ 96

9) Haga clic en la pestaña 'Assign PCR (Asignar PCR)' y marque cada casilla en la 'Prep Work List' para asignar cada posición de la PCR. La posición de la PCR corresponde al *ExiPrep*™ 16 Dx No. 1~3 en orden.

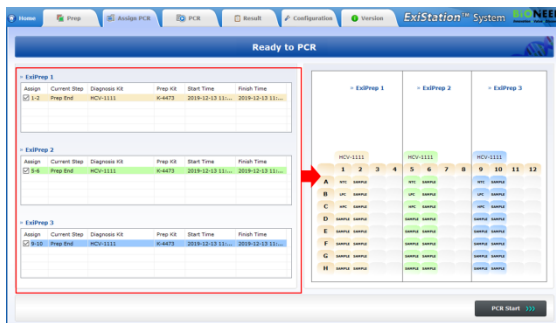


Fig. 43 Pestaña 'Asignar PCR' - Inicio de PCR

10) Presione el interruptor de la puerta por 2 segundos para deslizar hacia afuera el bloque térmico de 96 pozos. Inserte los tubos de reacción en sus ubicaciones. Cuando la carga de la muestra esté completada, presione el interruptor de la puerta por 2 segundos para cerrar la puerta.



**Asegúrese de que la configuración de la carga de las muestras esté de acuerdo con la posición del pozo asignado.**



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

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

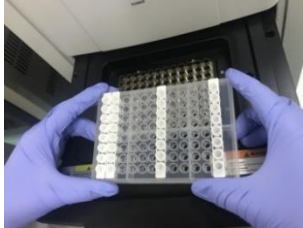


Fig. 44 Forma de ajuste de la Tira de premezcla de PCR del *Exicycler™* 96

12) Seleccione la pestaña 'Assign PCR (Asignar PCR)' y confirme la 'Prep Work List (Lista de Trabajo Prep)' asignada. Después del proceso de 'Prep (Preparación)', 'Current Step (Paso Actual)' se puede presentar como 'Prep End (Fin de la Preparación)' y la barra de estado superior cambiará a 'Ready to PCR (Listo para la PCR)'. Inicie la ejecución de la PCR haciendo clic en el botón 'PCR Start (Iniciar PCR)' activado en la parte inferior derecha de la ventana. Una ventana emergente aparecerá indicando al usuario a ingresar un Nombre de la Lista de trabajo. Haga clic en 'OK' luego de introducir el nombre para generar una lista de trabajo para la PCR en tiempo real.



La ruta predeterminada del archivo de la lista de trabajo es 'C: > ExiStation\_Data > usuario > GUEST > WorkList'

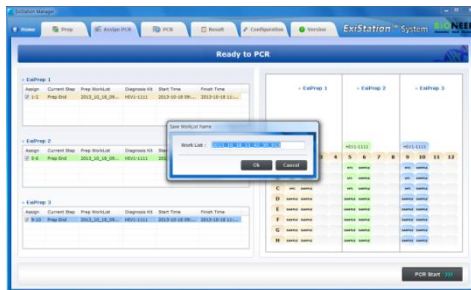


Fig. 45 Ventana emergente de "Data name (Nombre de los datos)"

13) Después de ingresar al Nombre de la lista de trabajo, se activará la pestaña 'PCR' y el *Exicycler™* 96 iniciará automáticamente la ejecución de PCR.

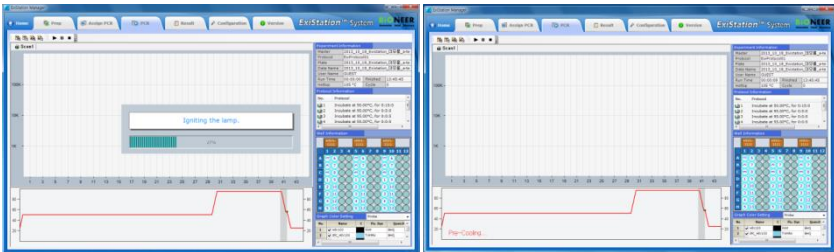


Fig. 46 Pantalla de Ejecución de la PCR

14) 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 no utilizados están presentes en los Cartuchos neutralizadores, tome una prenda 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.
- ⚠ Cubra los Cartuchos neutralizadores usados con las tapas acrílicas y deséchelos de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o con el procedimiento interno del laboratorio.

15) Presione el botón 'Misc Set (Ajuste Misc)', retire el Protector de las Puntas y el Protector de Contaminación luego presione el botón 'Misc Set (\*Ajuste Misc)' otra vez.

16) Empuje la Placa base, cierre la puerta del instrumento e inicie la esterilización por UV haciendo clic en "UV ON (UV ENCENDIDO)" en el panel de control.

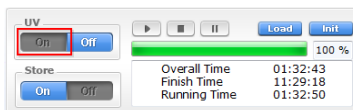


Fig. 47 Panel de control del ExiPrep™ 16 Dx– UV

17) Después de que la ejecución de la PCR haya terminado, seleccione la pestaña 'Result (Resultado)' para comprobar los resultados de cada muestra.

- ⚠ Haga clic en el botón 'Analysis (Análisis)' para abrir la ventana emergente dedicada al análisis, que presenta resultados detallados incluyendo un gráfico de fluorescencia.

⚠ NO despegue la cinta de sellado óptico del kit de diagnóstico. Deséchelos de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o el procedimiento interno del laboratorio.



Fig. 48 Análisis de resultados usando el software ExiStation™ Manager

18) Los archivos de datos de resultados son guardados en 'C:\> ExiStation\_Data > user > GUEST > WorkList > relevant data file name' folder (carpeta con el nombre del archivo de los datos relevantes).

## 8.7 Procedimiento experimental (*ExiStation™ 48*, *ExiStation™ 48A*)

### 8.7.1 Extracción del ácido nucleico - *ExiPrep™ 48 Dx*

\* Por favor, refiérase a la guía del usuario del Kit *ExiPrep™ 48* del ADN/ARN Viral, del *ExiPrep™ 48 Dx* o del *ExiLT* para un flujo de trabajo básico.

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

- 1) Encienda el *ExiPrep™ 48 Dx*. Encienda la parte posterior del instrumento, presione el botón POWER en la parte frontal del instrumento durante 1 segundo.
- 2) A medida que comience la inicialización por sí mismo, la pantalla LCD aparecerá automáticamente.
- 3) Cuando la iniciación del instrumento este completada, la pantalla principal aparecerá en la pantalla LCD si la iniciación no es completada satisfactoriamente, contáctenos (Bioneer) o a las agencias.



Fig. 49 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*)

**Assign PCR (Asignar PCR)** - Se puede mostrar la información extraída.

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

**Result (Resultado)** – Muestra los resultados después de ejecutar la PCR.

**Shop (Tienda)** – Vínculos a la página de inicio en la que puede comprar los productos relacionados.

- 5) Inicie sesión con el ID registrada. Cuando inicia sesión como invitado, generalmente se guardan los datos en la carpeta especificada. Si inicia sesión con su ID, puede identificar una carpeta para almacenarlos para que pueda gestionar los datos resultantes de forma más eficiente (opcional).
- 6) Pulse el ícono Prep en la pantalla principal. La pantalla cambiará como se muestra en la siguiente 51. Entre en el modo de extracción del ácido nucleico pulsando el *ExiStation*.

## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa



Fig. 50 Pantalla inicial de la pestaña Prep

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



Fig. 51 Ingreso de la información del kit de diagnóstico

- 8) Ingrese el número del lote del kit de diagnóstico.
- 9) Pulse la flecha desplegable del Kit de preparación. Muestra el kit de diagnóstico a utilizar. Luego ingrese la Información del lote del Kit de preparación.



Fig. 52 Ingreso de la información de la Kit

- 10) Aparecerá el mensaje emergente "Sample Type (Tipo de Muestra)", seleccione la muestra a utilizar

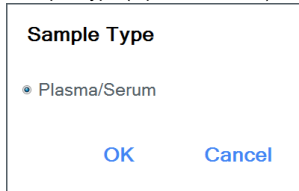


Fig. 53 Pantalla de 'Sample Type (Tipo de Muestra)'

- 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

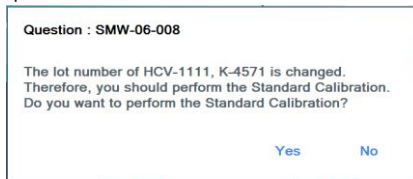


Fig. 54 Mensaje emergente durante el proceso de Calibración estándar

- 12) Mientras sale el mensaje emergente "Select Lane & Well (Seleccionar Carril y Pozo)", seleccione el pozo a utilizar. Luego compruebe el pozo ya utilizado del Cartucho neutralizador ①. Haga clic en el pozo utilizado, aparecerá la señal "X" arriba de ese pozo. Para finalizar, haga clic en el botón "OK". Si no están usando pozos, haga clic en el botón "OK" a la derecha.

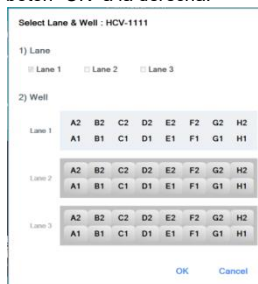


Fig. 55 Pantalla de 'Select Lane & Well (Seleccionar Carril y Pozo)'

- 13) La posición NTC y SPC se ajusta automáticamente en el pozo restante, el ajuste principal es NTC y cada uno del SPC 1~5. Repita el mismo número de lote de la curva estándar del kit de extracción/diagnóstico ya guardado. En este caso, el LPC y el HPC se establece a un pozo para cada uno en vez de SPC 1~5.
- 14) Complete la generación de la curva estándar con normalidad, proceda al siguiente experimento utilizando las muestras clínicas. Si el experimento funciona, aparece mucha información; curva estándar, posición correcta del NTC/LPC/HPC. Luego haga clic en 'Sample ID (ID de la Muestra)', ingrese la información de las muestras clínicas. (Opcional - usando el lector del código de barras)



Fig. 56 Ingrese la información de la muestra

### 8.7.1.2. Extracción del ácido nucleico mediante el ExiPrep™ 48 Dx

- 1) Se recomienda que, al manejar las muestras clínicas, todos los trabajos relacionados deberán ser llevados a cabo dentro de una BSC de presión negativa (Clase II) para la seguridad del usuario y para la prevención de contaminación.
- 2) Limpie la BSC y verifique todos los componentes necesarios para la extracción y la muestra antes de la extracción de ácido nucleico. Prepare los componentes de extracción dentro de una BSC de presión positiva. Recomendamos que la lleve a cabo en un lugar por separado refiriéndose al inciso 8.1.1.

⚠ Limpie la superficie con 0.5% de hipoclorito de sodio y 70% de etanol o desinfecte el agua antes y después de su uso para prevenir contaminación. Después de cada uso, encienda la lampara UV para eliminar los contaminantes.

⚠ La lampara UV debe apagarse antes de utilizar la BSC.

- 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 del ácido nucleico

Herramientas de preparación	Consumibles
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Bandeja de Ajuste</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>■ Cartuchos neutralizadores 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 los tubos de elución</li> <li>■ Bandeja de Desperdicios</li> <li>■ Papel de filtro del Protector de contaminación</li> </ul>

- 4) Retire la envoltura retráctil que cubre a 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*<sup>®</sup> del congelador e inserte el tubo del kit de diagnóstico en la gradilla de tubos de elución. Retira el papel aluminio cubierto del tubo del kit de diagnóstico. 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 ser identificados durante el proceso.**

⚠ **En la parte inferior de la gradilla del tubo de elución, hay una ranura ajustada al instrumento *ExiPrep*<sup>™</sup> 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 en la figura 61 a continuación.**



Fig. 57 Chequeo de la posición de los tubos del kit de diagnóstico en la gradilla de los tubos de elución

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

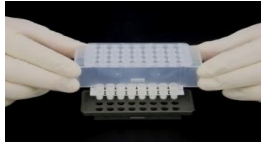
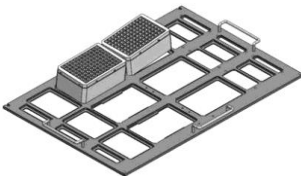


Fig. 58 Instalación de la Cubierta de protección

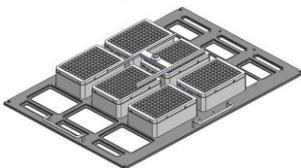
- 7) Abra la puerta del instrumento (*ExiPrep*<sup>™</sup> 48 Dx (A-5150)), retire la bandeja de ajuste instalada dentro y colóquela sobre la banqueta plana del experimento.

①



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

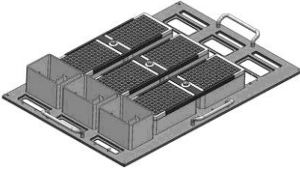
②



Instale la abrazadera encima del cartucho neutralizador. Las abrazaderas deben ser instaladas por carril. Y retenga la abrazadera.

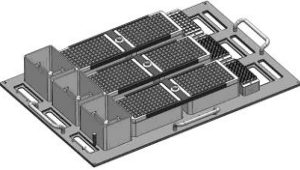
## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa

③



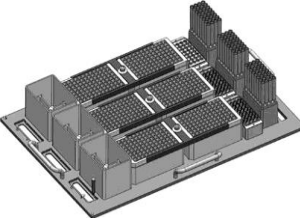
Instale la bandeja de desperdicios.

④



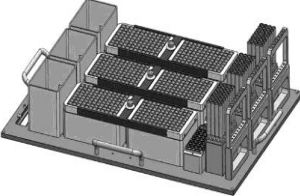
Instale la Gradilla de los tubos de elución que fueron instaladas en la tira de la premezcla PCR y la Cubierta de protección a la bandeja de utensilios.

⑤



Retire la cubierta de la Gradilla de la punta desechable e instálela en la bandeja de utensilios.

⑥



Instale la perforadora de 8 agujeros.

- 8) Al completar la instalación de los componentes para la extracción del ácido nucleico, prepare el control y las muestras.
- 9) Prepare la muestra clínica en la BSC de presión negativa. Antes del uso, limpie la BSC sobre la cual se llevará a cabo la extracción del ácido nucleico. Realice la muestra dentro de una BSC a presión negativa, limpie la BSC antes de ser usada.



**Limpie la superficie con hipoclorito de sodio al 0.5% y etanol al 70% o agua destilada antes y después de usarla con el fin de evitar contaminación. Después de cada uso, encienda la lámpara UV para eliminar los contaminantes.**



**Debe apagar la lampara UV mientras usa la banqueta de limpieza.**

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa



Fig. 59 Preparación de los componentes necesarios para la carga de la muestra

- 10) Tome el número necesario de Tubos de Carga de muestra, marque el nombre sobre el tubo de carga de muestra para evitar confusiones. Insértelo dentro de la gradilla



**Use un tubo de carga de muestra con ADN IPC seco y verifique el color azul (ADN IPC) en el final del tubo.**

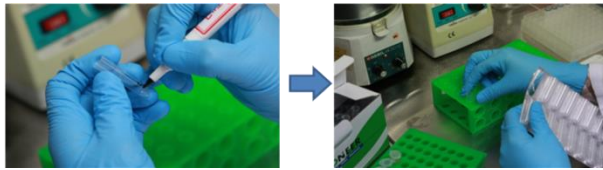


Fig. 60 Preparación del Tubo de carga de muestra

- 11) Prepare el contenedor para la muestra y el control (neutralizador SL, SPC, LPC/HPC), lleve a cabo la carga dentro del tubo de carga de muestras y siga los siguientes pasos del 12) ~ 15).
- 12) Cargue 400  $\mu\text{l}$  de neutralizador SL (componente del kit de Diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>) en el tubo NTC usando una pipeta.
- 13) Añada además 400  $\mu\text{l}$  de SPC 1~5 dentro de los pozos SPC apropiados. (suministrados con el kit de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>)



Si tiene la fecha previa de los mismos lotes del kit de diagnóstico y del kit de extracción, puede saltar la calibración SPC. Mediante el guardado automático de la información estándar, en este caso NTC, LPC y HPC funcionan como control.

Cuando el ensayo sea repetido con el mismo lote del Kit de diagnóstico y el Kit de extracción

**NTC** : Cargue 400  $\mu\text{l}$  del neutralizador SL en el tubo NTC.

**LPC** : Cargue 400  $\mu\text{l}$  de LPC (tubo de tapa color azul, componente del kit de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>)

**HPC** : Cargue 400  $\mu\text{l}$  de HPC (tubo de tapa color rojo, componente del kit de diagnóstico *AccuPower*<sup>®</sup>)

## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa

- 14) Listo para usar el control del producto cargado con el tubo de carga de la muestra, instale la gradilla del tubo de la muestra

- ⚠ Después de desbloquear el dispositivo de fijación del tubo de las muestras, ajuste el tubo.
- ⚠ Cuando instale la Gradilla de los tubos de muestra, mantenga una dirección vertical durante la remoción e instalación de la gradilla para evitar verter la solución cargada

- 15) Cargue 400  $\mu\text{l}$  de la muestra clínica al tubo de carga de la muestra. Termine la carga de la muestra clínica, mueva el Tubo de carga de la muestra a la gradilla de los tubos de muestra.

- ⚠ Confirme la posición exacta de cada Tubo de Carga de muestra, y luego ajústelo.
- ⚠ Si los guantes o la punta y así sucesivamente están contaminados mediante una muestra clínica, retire el contaminante de inmediato. Luego use uno 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.

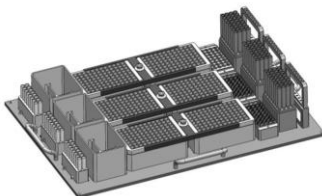


Fig. 61 Instalación de la Gradilla de tubos de la muestra

- 17) Verifique que todos los componentes estén instalados con normalidad en la Bandeja de utensilios.
- 18) Instale la bandeja de utensilios sobre el instrumento *ExiPrep™* 48 Dx.

- ⚠ Verifique cada lado, izquierdo : Gradilla de tubos de muestra / Derecho : Perforadora de 8 agujeros, Luego empuje la bandeja de utensilios dentro del instrumento, con mucho cuidado.

## Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa

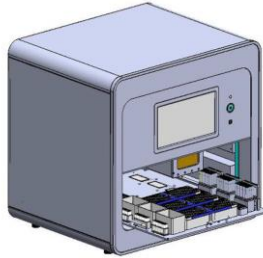


Fig. 62 Instalación de la Bandeja de utensilios

- 19) Finalizado todo el proceso, – ajuste del programa, muestra lista y bandeja de ajuste instalada- Haga clic en la pantalla “Apply Run (Aplicar Ejecución)” ubicada en la parte inferior derecha para comenzar la extracción del ácido nucleico.



El tiempo de ejecución de la extracción tarda de 60 a 80 minutos dependiendo del tipo de muestra.



Durante el proceso de extracción, si aparece un mensaje de error, por favor contacte a la tienda más cercana o al equipo TS de Diagnóstico Molecular Internacional de Bioneer.



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

### 8.7.2 PCR en tiempo real usando Exicycler™ 96

\* Por favor refiérase a la guía del usuario del Exicycler™ 96 y del software ExiPrep™ 48.

Al terminar la extracción del ácido nucleico, verá el mensaje emergente que notifica el final. Presione el botón "Door (Puerta)" para abrir la puerta en la parte frontal de la máquina, y saque la Bandeja de utensilios.



Al terminar la extracción del ácido nucleico, saque la Bandeja de ajuste dentro de 10 minutos. Luego separe la Tira de la Premezcla de PCR de la Gradilla de tubos de elución, y procese todos los pasos. El retraso prolongado puede ocasionar la degradación del ácido nucleico, lo cual puede afectar el valor del resultado.

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

- 1) Refiérase a 8.5.2 2)~6), Listo para el proceso PCR después de separar la tira de premezcla de PCR de la Gradilla de los tubos de elución.
- 2) Haga clic en el ícono “Assign (Asignar)”. La lista de información de la extracción de ácido nucleico terminada aparece en pantalla. Marque la casilla que desee para el proceso de PCR. Dependiendo de la posición del carril del *ExiPrep*<sup>™</sup> 48 Dx, decida la posición del pozo PCR.



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

- 3) Presione el botón Door (Puerta) del *Exicycler*<sup>™</sup> 96 durante 2 segundos, el bloque térmico de 96 pozos sale del instrumento. Ajuste la Tira de premezcla de PCR en la posición correcta seleccionada por el software.



**La posición de las tiras de premezcla de PCR coincide exactamente con la posición asignada por el software.**



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

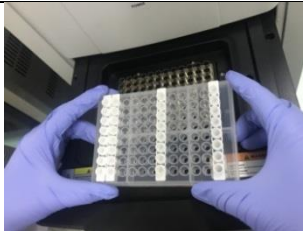


Fig. 65 Forma de ajuste de la Tira de premezcla de PCR del *Exicycler*<sup>™</sup> 96

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

⚠ **WorkList (La Lista de trabajo) se guarda de esta forma; programa ExiStation™ 48 Manager> SET UP > Data > WorkList**

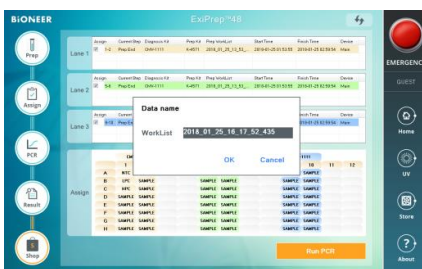


Fig. 66 Ventana emergente de “Data name (Nombre de los datos)”

- 5) Complete el paso 4), el *Exicycler™ 96* se ejecuta automáticamente.

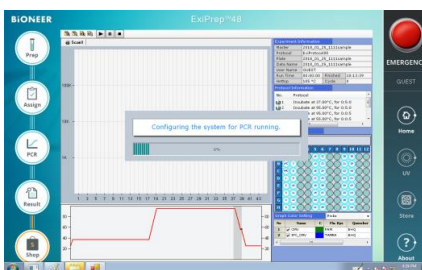


Fig. 67 Pantalla de Ejecución de la PCR

- 6) Complete la PCR, haga clic en el ícono ‘Result (Resultado)’ para confirmar el resultado.

⚠ Haga clic en “Analysis (Análisis)”, aparece un programa de análisis en una ventana emergente y puede confirmar el detalle de los resultados.

⚠ Después de hacer clic en el botón "Print (Imprimir)" (a la derecha del botón Analysis (Análisis)), seleccione el resultado del análisis que desea imprimir y pueda ser impreso un informe.

⚠ El análisis de los resultados se guarda automáticamente en esta carpeta programa *ExiStation™ 48 Manager*> SET UP > Data > WorkList > relevant data (datos relevantes).

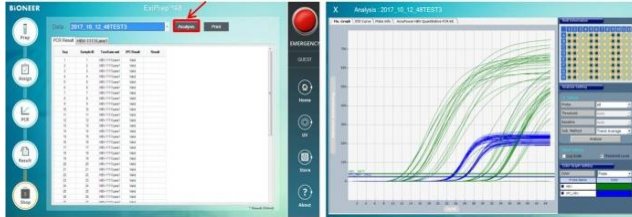


Fig. 68 Análisis de datos

### 8.7.3 Proceso de manejo de desperdicios experimentales

- 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 no utilizados en los Cartuchos neutralizadores, retire la punta de filtro usada del Cartucho neutralizador ②. Tome un paño libre de pelusas o etanol al 70% y limpie la superficie de la cinta de los Cartuchos neutralizadores. Reemplace las tapas acrílicas en los Cartuchos neutralizadores y manténgalas en una BSC de presión positiva para su uso posterior.
- ⚠ Cubra los Cartuchos neutralizadores usados con las tapas acrílicas y deséchelos de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o con el procedimiento interno del laboratorio.

- 2) Retire el Protector de la punta y el Protector de contaminación, luego límpielas con etanol al 70% y vuelva a instalarlas.
- 3) Empuje la Bandeja de ajuste, cierre la puerta del instrumento e inicie la esterilización por UV haciendo clic en "UV ON (UV ENCENDIDO)" en el panel de control.

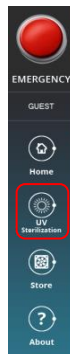


Fig. 69 Panel de control del ExiPrep™ 16 Dx - UV



---

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

4) Después de que la ejecución de la PCR haya terminado, seleccione la pestaña 'Result (Resultado)' para comprobar los resultados de cada muestra.



NO desprenda la cinta de sellado óptico del Kit de Diagnóstico. Deséchelos de acuerdo con las regulaciones locales de seguridad o con el procedimiento interno del laboratorio.

## 8.8 Análisis de datos

### (1) Calibración (VHC SPC (1) – (5))

Para la prueba con el nuevo Lote de kit de diagnóstico y/o kit de extracción, debe realizarse una calibración.

La prueba utiliza 5 pozos de SPC (VHC SPC (1)–(5)) para generar una curva estándar. Además, el usuario puede chequear la validez del lote con el software *ExiStation™* manager ya sea en el monitor o en un informe impreso. El lote es válido, si al menos 3 SPC son válidos.

### (2) Control (LPC y HPC del VHC)

Cada prueba está acompañada con un control. La prueba utiliza 2 pozos de PC (HPC, LPC) para confirmar una validez de cada prueba. El usuario puede comprobar la validez de la prueba con el software *ExiStation™* Manager ya sea en el monitor o en un informe impreso.

### (3) NTC

Cada prueba utiliza 1 pozo de NTC para chequear cualquier contaminación en el proceso de la carga de la muestra, extracción del ácido nucleico, preparación de la PCR, para así evitar un error de falso positivo.

La validez del SPC y del NTC se determina por el valor Ct de la señal VHC. Si el ensayo es válido, el Ct de VHC será 'undetermined (no determinado)' en el pozo NTC y el valor de Ct de SPC estará dentro de su intervalo especificado. Si los resultados del control son inválidos, tome las medidas de acuerdo con la Guía del Usuario sección 10. Resolución de problemas.

**Los resultados de los ejemplares se interpretan como sigue:**

Resultado de la Titulación	Interpretación
No detectado	No hay Valor Ct (> 45Ct) del VHC obtenido. Los resultados son informados como "Not Detected (No detectados)".
<2.00E+01 UI/ml	Las UI/ml calculadas están por debajo del Límite de Cuantificación. Resultado informado como "<2.00E+01 UI/ml".
≥ 2.00E+01 UI/ml Y ≤ 1.00E+08 UI/ml	Los resultados calculados mayores que o iguales a 2.00E+01 UI/ml y menores que o iguales a 1.00E+08 UI/ml están dentro del Intervalo Lineal del ensayo.
>1.00E+08 UI/ml	Las UI/ml calculadas están por encima del intervalo. Resultado informado como "mayor que 1.00E+08 UI/ml". Si se desean resultados cuantitativos, la muestra original debe diluirse con plasma humano EDTA negativo para el VHC o con suero humano y repetir la prueba. Multiplique el resultado por el factor de dilución.

\* UI/ml ; concentración del ARN del VHC en copia/ml × 1.50 UI/copia = ADN de VHC en UI/ml

## **8.9 Control de Calidad**

### **(1) IPC (Control Interno Positivo)**

Cada tubo de ensayo contiene un IPC para comprobar la inhibición de la PCR por la impureza o el ciclo térmico mal controlado con el fin de controlar todo el proceso. El IPC se seca con el Tubo de la carga de la muestra (accesorio para la extracción del ácido nucleico). Las altas concentraciones de ARN de VHC pueden ocasionar una señal fluorescente de IPC reducida o ausente debido a la competencia de la PCR. La validez de la PCR se determina por el valor Ct de la señal IPC. Si el valor Ct está dentro del rango especificado, es válido. Si el valor Ct está fuera del rango especificado, es inválido. La validez del SPC y del NTC se determina por el valor Ct de la señal VHC. Si el ensayo es válido, el Ct de VHC será 'undetermined (no determinado)' en el pozo NTC y el valor de Ct de SPC estará dentro de su intervalo especificado. Si los resultados del control son inválidos, tome las medidas de acuerdo con la Guía del Usuario sección 10. Resolución de problemas.

El resultado del IPC determina la validez de la prueba y el valor Ct de la señal de VHC determina la concentración de VHC (IU/ml) de la muestra. Para el ejemplar de alta titulación por encima del intervalo cuantitativo deseado, el ejemplar original deberá ser diluida con el neutralizador SL proporcionado, y la prueba debe repetirse.

## 9. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### 9.1 Características Analíticas

#### 9.1.1 Límite de Detección (LoD)

El límite de detección del kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa fue determinado mediante el análisis de diluciones en serie de la Norma Internacional de la OMS para el ARN de VHC de los Ensayos tecnológicos de Amplificación del Ácido nucleico (5ª Norma Internacional de la OMS), en plasma EDTA humana con resultado negativo de VHC y en suero con resultado negativo de VHC. Se probaron 6 diluciones en serie del panel y el negativo con 3 lotes del kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa.

El kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa detectó ARN de VHC con una tasa de detección del 95%, según lo determinado por PROBIT, a una concentración de 10.7 UI/ml en plasma EDTA y de 14.1 UI/ml en suero

**Tabla 1. Tasa de detección del Kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa en cada concentración en plasma EDTA**

Concentración nominal		Plasma Número de réplicas probadas (N)	Plasma Número de positivos detectados	Plasma Tasa Positiva (%)
UI/ml	(Log <sub>10</sub> UI/ml)			
NTC	0	72	0	0
1.55	0.19	72	29	40
3.09	0.49	72	52	72
6.31	0.8	72	62	86
12.59	1.1	72	67	93
25.12	1.4	72	72	100
50.12	1.7	72	72	100

**Tabla 2. Tasa de detección del Kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa en cada concentración en Suero**

Concentración nominal		Suero Número de réplicas probadas (N)	Suero Número de positivos detectados	Suero Tasa Positiva (%)
UI/ml	(Log <sub>10</sub> UI/ml)			
NTC	0	72	0	0
1.55	0.19	72	30	41
3.09	0.49	72	43	59
6.31	0.8	72	54	75
12.59	1.1	72	68	94
25.12	1.4	72	72	100
50.12	1.7	72	72	100

**Tabla 3. Análisis probit del Límite de Detección en plasma EDTA**

Concepto	LoD	95% C.I	
UI/ml	10.7	7.94	14.45
Log <sub>10</sub> UI/ml	1.03	0.9	1.16

Tabla 4. Análisis probit del Límite de Detección en Suero

Concepto	LoD	95% C.I	
UI/ml	14.1	10.47	19.50
Log <sub>10</sub> UI/ml	1.15	1.02	1.29

### 9.1.2 Trazabilidad

El estudio de Trazabilidad del kit **AccuPower®** de VHC de RT-PCR Cuantitativa fue determinado probando el 5<sup>to</sup> panel del Estándar Internacional de VHC de la OMS (código NIBSC:14/150, UK) que contiene 5.00 Log<sub>10</sub> UI/ml de VHC, genotipo 1a y se probaron Control Positivo Estándar de VHC de dos diluciones del panel del estándar internacional, 7 diluciones del Control Positivo Estándar y una dilución (9.00 Log<sub>10</sub> UI/ml) de la partícula del virus.

Todos los materiales demostraron una dilución co-lineal de rendimiento a lo largo del intervalo lineal del kit **AccuPower®** de VHC de RT-PCR Cuantitativa. Según estos resultados, el valor de cuantificación para el panel positivo de la norma internacional del VHC, el control positivo estándar y la partícula de virus fue similar al valor esperado con los resultados de Desviación del valor de linealidad dentro de Log<sub>10</sub> UI/ml

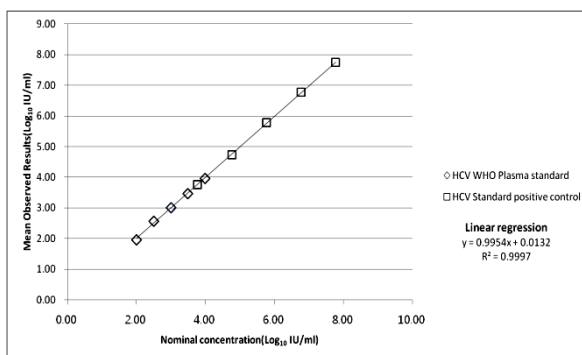


Fig. 70 Trazabilidad con el panel del estándar internacional de la OMS (plasma EDTA)

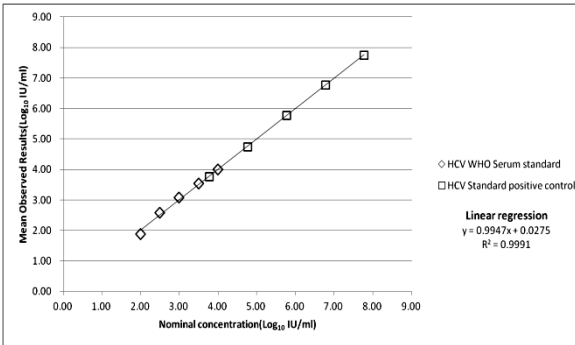


Fig. 71 Trazabilidad con el panel del estándar internacional de la OMS (Suero humano normal)

### 9.1.3 Verificación del límite de detección para el VHC genotipo 1 - 6

La verificación del límite de detección en el kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa para el genotipo VHC 1-6 se determinó mediante el análisis de 6 diluciones en serie del Panel de Cualificación *AccuTrak*<sup>™</sup> del Genotipo de ARN de VHC.

Se realizaron 20 réplicas en cada dilución y los resultados del estudio demuestran que el kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa puede detectar el ARN del VHC en plasma EDTA a una concentración tan baja como 1.4Log<sub>10</sub> UI/ml, con una tasa positiva mayor que o igual a 95%.

La tabla a continuación demuestra el resultado del análisis probit para los genotipos 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6. El kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa puede detectar el LoD del genotipo VHC en el plasma EDTA y en el suero normal humano.

Tabla 7. Tasa de detección del Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa en cada concentración en plasma EDTA

Genotipo	Concentración	Número de réplicas probadas	Número de positivos	Tasa Positiva (%)
----------	---------------	-----------------------------	---------------------	-------------------

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

	(Log <sub>10</sub> UI/ml)	(N)	detectados	
1b	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	20	100
	0.80	20	20	100
	0.49	20	14	70
	0.19	20	9	45
2a	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	18	90
	0.80	20	16	80
	0.49	20	15	75
	0.19	20	5	25
2b	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	17	85
	0.80	20	17	85
	0.49	20	5	25
	0.19	20	8	40
3	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	18	90
	0.80	20	16	80
	0.49	20	12	60
	0.19	20	5	25
4	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	19	95
	0.80	20	17	85
	0.49	20	13	65
	0.19	20	7	35
5	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	19	95
	0.80	20	12	60
	0.49	20	7	35
	0.19	20	7	35
6	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	19	95
	0.80	20	13	65
	0.49	20	10	50
	0.19	20	6	30

**Tabla 8. Tasa de detección del Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa en cada concentración en Suero**

Genotipo (suero)	Concentración (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Número de réplicas probadas	Número de positivos	Tasa Positiva (%)
------------------	---	-----------------------------	---------------------	-------------------

**Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR  
Cuantitativa**

		(N)	detectados	
1b	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	20	100
	0.80	20	20	100
	0.49	20	14	70
	0.19	20	9	45
2a	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	20	100
	0.80	20	16	80
	0.49	20	10	50
	0.19	20	11	55
2b	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	16	80
	0.80	20	11	55
	0.49	20	7	35
	0.19	20	3	15
3	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	20	100
	0.80	20	15	75
	0.49	20	11	55
	0.19	20	8	40
4	1.70	20	20	100
	1.40	20	20	100
	1.10	20	19	95
	0.80	20	17	85
	0.49	20	11	55
	0.19	20	7	35
5	1.70	20	20	100
	1.40	20	19	95
	1.10	20	18	90
	0.80	20	12	60
	0.49	20	9	45
	0.19	20	7	35
6	1.70	20	20	100
	1.40	20	19	95
	1.10	20	16	80
	0.80	20	14	70
	0.49	20	13	65
	0.19	20	5	25

**Tabla 9. Resumen de resultados del LoD de genotipos del kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa por fábrica**

Matriz	Genotipo	LoD (Log <sub>10</sub> UI/ml)	95% CI (Log <sub>10</sub> UI/ml)
--------	----------	-------------------------------	----------------------------------



plasma EDTA	1b	0.73	0.54 - 0.93
	2a	1.05	0.75 - 1.35
	2b	1.26	1.01 - 1.51
	3	1.14	0.90 - 1.38
	4	1.14	0.85 - 1.43
	5	1.26	1.02 - 1.50
Suero	6	1.20	0.96 - 1.44
	1b	0.91	0.68 - 1.14
	2a	1.08	0.82 - 1.34
	2b	1.35	1.13 - 1.57
	3	1.09	0.85 - 1.33
	4	1.09	0.83 - 1.35
5	1.33	1.07 - 1.59	
6	1.40	1.11 - 1.69	

### 9.1.4 Rango lineal y Límite de Cuantificación (LoQ)

La linealidad y el LOQ del VHC genotipo 1a fue realizado con una de dilución del 5<sup>er</sup> Panel del estándar Internacional de VHC de la OMS (código NIBSC: 14/ 150, UK). Para los miembros de titulación y el miembro de titulación alta con el kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa.

Fueron preparadas 8 diluciones de cada panel (4 diluciones) y de partículas del virus VHC (4 diluciones) desde 8.00 log<sub>10</sub> UI/ml hasta 1.18 log<sub>10</sub> UI/ml en plasma EDTA y desde 8.00 log<sub>10</sub> UI/ml hasta 1.30 log<sub>10</sub> UI/ml en suero humano para el genotipo 1a del VHC. Se prepararon tres (3) diluciones de cada panel desde 3.00 log<sub>10</sub> UI/ml hasta 1.18 log<sub>10</sub> UI/ml en el plasma EDTA y desde 3.00 log<sub>10</sub> UI/ml hasta 1.18 log<sub>10</sub> UI/ml en suero para otros genotipos de VHC

La evaluación del LoQ principal y la linealidad fueron realizadas con tres lotes diferentes del kit *Accupower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa. La prueba fue realizada con cada concentración en dos (2) réplicas y dos (2) ejecuciones por día. La prueba fue realizada sobre el periodo de cuatro (4) días diferentes y en tres (3) sistemas *ExiStation*<sup>™</sup> diferentes. Resultando en cuarenta (40) datos por dilución.

El rango lineal para el kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa fue desde 1.18 Log<sub>10</sub> UI/ml hasta al menos 8.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma EDTA y 1.30 Log<sub>10</sub> UI/ml hasta al menos 8.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en suero humano. La desviación máxima entre la media observada de la titulación Log<sub>10</sub> y el modelo de 1er orden mejor ajustado menor que 0.20 Log<sub>10</sub> UI/ml para cada nivel probado en este intervalo. Por lo tanto, el resultado de este estudio soporta el rango lineal de 1.18 Log<sub>10</sub> UI/ml hasta al menos 8.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma EDTA y de 1.30 Log<sub>10</sub>

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

UI/ml hasta al menos 8.00 Log<sub>10</sub> UI/ml en suero humano.

Esto fue incluido en el valor de referencia del error analítico total (TAE) de 1.00 Log<sub>10</sub> UI/ml. Por lo tanto, el LOQ declarado para el kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa, considerando todos los genotipos VHC, está entre el 1,00 hasta el 1,70 Log<sub>10</sub> UI/ml.

**Tabla 10. Ecuación lineal y rango de todos los genotipos VHC analizados**

Genotipo VHC		Ecuación lineal en el estudio de linealidad del genotipo	Diferencia máxima entre el genotipo 1a del VHC y el genotipo VHC correspondiente (Log <sub>10</sub> UI/ml)
Plasma	1 <sup>a</sup>	$y = 0.9385x + 0.0373$	N/A
	1b	$y = 1.1189x - 0.1718$	0.10
	2a	$y = 0.9649x - 0.068$	0.06
	2b	$y = 1.0264x - 0.2885$	0.18
	3	$y = 1.0409x - 0.3147$	0.18
	4	$y = 1.1671x - 0.3034$	0.05
	5	$y = 1.0234x - 0.2866$	0.18
	6	$y = 1.0706x - 0.3082$	0.12
Suero	1a	$y = 1.0071x - 0.0244$	N/A
	1b	$y = 1.0127x + 0.0841$	-0.13
	2a	$y = 1.0051x + 0.0136$	-0.03
	2b	$y = 1.0744x - 0.3382$	0.11
	3	$y = 0.9636x + 0.0465$	0.06
	4	$y = 1.0582x - 0.1291$	-0.05
	5	$y = 1.2203x - 0.63$	-0.03
	6	$y = 0.9315x + 0.2427$	-0.04

**Tabla 11. LoQ de todos los genotipos VHC analizados**

## Kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa

VHC Genotipo	Matriz	Nominal concentración (Log <sub>10</sub> UI/ml)	N	Promedio Medida Concentración (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Sesgo (Log <sub>10</sub> UI/ml)	SD (Log <sub>10</sub> UI/ml)	TAE =  Sesgo  + 2 x SD (Log <sub>10</sub> UI/ml)	RAI[ZCD(2)x2 x SD (Log <sub>10</sub> UI/ml)
1a	Plasma	1.18	40	1.15	0.0	0.31	0.65	0.88
	Suero	1.30	40	1.52	0.2	0.29	0.81	0.82
1b	Plasma	1.00	26	0.77	-0.2	0.27	0.77	0.77
	Suero	1.00	26	1.03	0.0	0.21	0.45	0.60
2a	Plasma	1.18	26	1.10	-0.1	0.19	0.45	0.53
	Suero	1.70	26	1.74	0.0	0.15	0.35	0.43
2b	Plasma	1.70	26	1.45	-0.3	0.14	0.52	0.39
	Suero	1.40	26	1.15	-0.3	0.19	0.64	0.54
3	Plasma	1.18	26	0.91	-0.3	0.30	0.86	0.84
	Suero	1.40	26	1.47	0.1	0.21	0.49	0.60
4	Plasma	1.18	26	1.06	-0.1	0.23	0.59	0.66
	Suero	1.18	26	1.10	-0.1	0.33	0.75	0.95
5	Plasma	1.70	26	1.44	-0.3	0.13	0.52	0.36
	Suero	1.70	26	1.37	-0.3	0.25	0.83	0.71
6	Plasma	1.40	26	1.20	-0.2	0.18	0.56	0.52
	Suero	1.70	26	1.89	0.2	0.17	0.53	0.48

### 9.1.5 Precisión

El estudio de precisión fue realizado para determinar la Repetibilidad y la Reproducibilidad del kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa. La prueba fue realizada usando el 5<sup>to</sup> panel del Estándar internacional de VHC de la OMS (código NIBSC: 14/150, Reino Unido) que contiene 5.00 Log<sub>10</sub> UI/ml del genotipo 1a del VHC.

#### 9.1.5.1 Repetibilidad

Para esta prueba, se prepararon tres (3) diluciones en serie del 5<sup>to</sup> panel del Estándar internacional de VHC de la OMS (código NIBSC: 14/150, Reino Unido) en plasma EDTA (Seracare, Milford, EE.UU.) y en suero humano normal (Merck Millipore, Alemania). Cada panel consistió de tres (3) concentraciones de ARN de VHC de 3.00, 2.00, 1.48 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma y de 3.00, 2.00, 1.65 Log<sub>10</sub> UI/ml en suero humano.

La evaluación fue realizada con tres (3) lotes diferentes del kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa. La prueba fue realizada en tres (3) sistemas *ExiStation*<sup>™</sup> diferentes. Cada concentración fue probada en dos (2) réplicas y dos (2) ejecuciones por día, un total de veinte (20) pruebas por día. Los resultados están resumidos en las tablas 12 y 13.

**Tabla 12. Resumen de repetibilidad en plasma EDTA**

Concentración nominal (Log <sub>10</sub> UI/mℓ)	Concentración asignada (Log <sub>10</sub> UI/mℓ)	No. de pruebas válidas	dentro de la- Ejecución (S <sub>r</sub> )	Entre Ejecución (S <sub>rr</sub> )	la- Entre días (S <sub>dd</sub> )	Precisión total (S <sub>T</sub> )
3.00	2.89	80	0.15	0.10	0.09	0.20
2.00	1.82	80	0.23	0.12	0.10	0.27
1.48	1.34	80	0.31	0.11	0.11	0.35

**Tabla 13. Resumen de repetibilidad en Suero**

Concentración nominal (Log <sub>10</sub> UI/mℓ)	Concentración asignada (Log <sub>10</sub> UI/mℓ)	No. de pruebas válidas	dentro de la- Ejecución (S <sub>r</sub> )	Entre Ejecución (S <sub>rr</sub> )	la- Entre días (S <sub>dd</sub> )	Precisión total (S <sub>T</sub> )
3.00	3.01	80	0.17	0.05	0.12	0.21
2.00	1.92	80	0.18	0.03	0.12	0.22
1.65	1.59	80	0.23	0.10	0.18	0.30

Los resultados de la repetibilidad fueron dentro de la ejecución (S<sub>r</sub>); 0.31, entre la ejecución (S<sub>rr</sub>); 0.12, entre días (S<sub>dd</sub>); 0.11, y Precisión total (S<sub>T</sub>); 0.35 en Plasma, y dentro de la ejecución (S<sub>r</sub>); 0.23, entre la ejecución (S<sub>rr</sub>); 0.10, entre días (S<sub>dd</sub>); 0.18, y Precisión total (S<sub>T</sub>); 0.30 en suero.

### 9.1.5.2 Reproducibilidad

Para determinar la reproducibilidad, se prepararon tres (3) diluciones en serie del 5<sup>to</sup> panel del Estándar internacional de VHC de la OMS (código NIBSC: 14/150, Reino Unido) en plasma EDTA (Seracare, Milford, EE.UU.) y en suero humano normal (Merck Millipore, Alemania). Cada panel y partículas consistió de tres (3) concentraciones de ARN de VHC de 3.00, 2.00, 1.48 Log<sub>10</sub> UI/mℓ en plasma y de 3.00, 2.00, 1.65 Log<sub>10</sub> UI/mℓ en suero. Cada panel fue evaluado en dos (2) réplicas, dos (2) ejecuciones por día y sobre el periodo de cinco (5) días.

El experimento entre lotes fue llevado a cabo en tres (3) lotes, dos (2) réplicas por muestra, y dos (2) ejecuciones por día durante cinco (5) días. El experimento entre operadores y entre instrumentos fue realizado en un solo lote, dos (2) réplicas por muestras, y dos (2) ejecuciones por día durante diez (10) días. El experimento entre sitios fue llevado a cabo en un solo lote, dos (2) réplicas por muestra, y dos (2) ejecuciones por durante diez (10) días.

La evaluación fue realizada con tres (3) sistemas ExiStation™ diferentes. Se utilizaron dos lotes diferentes de kits *Exiprep*™ Dx de ADN/ARN Viral y tres (3) lotes diferentes del kit *AccuPower*® de VHC de RT-PCR Cuantitativa para el estudio. Los resultados están resumidos en las tablas 14 y 15.

**Tabla 14. Resultado de la reproducibilidad en plasma EDTA**

Concentración nominal (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Concentración asignada (Log <sub>10</sub> UI/ml)	No. de pruebas válidas	Desviación estándar (SD)			
			Entre lotes	Entre sitios	Entre operadores	Entre instrumentos
3.00	3.04	140	0.19	0.25	0.21	0.25
2.00	2.04	140	0.21	0.39	0.24	0.41
1.48	1.52	140	0.33	0.37	0.34	0.42

**Tabla 15. Resultado de reproducibilidad en Suero humano**

Concentración nominal (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Concentración asignada (Log <sub>10</sub> UI/ml)	No. de pruebas válidas	Desviación estándar (SD)			
			Entre lotes	Entre sitios	Entre operadores	Entre instrumentos
3.00	3.14	140	0.23	0.25	0.18	0.24
2.00	2.13	140	0.23	0.38	0.22	0.44
1.65	1.78	140	0.28	0.39	0.24	0.34

### 9.1.6 Sustancias interferentes

Se utilizaron veintidós (22) sustancias exógenas (incluida la sustancia antiviral) y cinco (5) sustancias endógenas para la prueba de interferencia del kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa.

Las sustancias endógenas y exógenas potencialmente interferentes se introdujeron en plasma y suero con EDTA en ausencia o presencia de tres veces el LOD x 3 (Plasma 1.48 Log<sub>10</sub> UI/ml y Suero 1.65 Log<sub>10</sub> UI/ml). La concentración de VHC de 3,00 Log<sub>10</sub> UI/ml se comparó con el plasma EDTA de control y el suero sin sustancias interferentes. Cada sustancia interferente se probó a una concentración de 3,00 Log<sub>10</sub> UI/ml y 1,48, 1,65 Log<sub>10</sub> UI/ml en tres (3) y catorce (14) repeticiones.

Todas las concentraciones de sustancias interferentes probadas no mostraron ninguna influencia en el rendimiento del kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa.

**Tabla 16. Interferencia - Sustancias interferentes exógenas**

**Kit AccuPower® de VHC de RT-PCR  
Cuantitativa**

No.	Sustancia interferente potencial	Concentración (ug/ml)
1	Entecavir	164ng/ml
2	Raltegravir	25.8 mg/L
3	Adefovirdipivoxil.	368ng/L
4	Isoniazid	5840umol/l
5	Lamivudine	44.8ug/ml
6	pyrazina	576ug/ml
7	Rifabutin	9200ng/ml
8	Rifampicin	312 mg/l
9	Sulfameth	31.6mmol/l
10	Telbivudine	74ug/ml
11	Amprenavir	153.2ug/mL
12	Efavirenz	81.4ug/mL
13	Ribavirin	54.96ug/L
14	Trimethoprim	2760umol/L
15	Nelfinavir	40ug/mL
16	Nevirapine	40ug/L
17	Ritonavir	224ug/L
18	Saquinavir	104.16ug/mL
19	Tenofovir	6ug/ml
20	Abacavir	60ug/L
21	Valganciclovir	113ug/mL
22	Zidovudine	45.8ug/ml

**Tabla 17. Interferencia - Sustancias Interferentes Endógenas**

No.	Sustancia interferente potencial	Concentración (ug/ml)
1	EDTA	540 mg/dL
2	Citrato	0.327M
3	Heparina	3KU/dL
4	Hemoglobina	200 mg/dL
5	Albúmina	5 g/dL
6	Bilirrubina	25 mg/dL

### 9.1.7 Reactividad cruzada

Los siguientes virus y bacterias fueron sometidos a pruebas de reactividad cruzada del kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa. Las muestras fueron preparadas diluyendo bien sea organismos o ADN/ARN en la siguiente matriz. Plasma/suero EDTA negativo para el VHC o plasma/suero EDTA enriquecido con VHC a 3 veces el LoD (plasma EDTA : 1.48 log<sub>10</sub> UI/ml, suero : 1.65 log<sub>10</sub> UI/ml). La prueba fue realizada en tres (3) réplicas.

El plasma EDTA y suero negativo mostraron una detección negativa. Los especímenes positivos para el VHC que se sometieron a una prueba de reactividad cruzada mostraron una detección de ±0,50 Log<sub>10</sub> UI/ml y ±0,50 Log<sub>10</sub> UI/ml en plasma y suero, respectivamente.

**Tabla 18. Lista de organismos con potencial reactividad cruzada**

Virus	Bacteria	
Virus de Hepatitis A	Virus de Varicella-Zoster	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Virus Hepatitis B	Virus del Nilo Occidental	<i>Chlamydia trachomatis</i>
HIV-1	Virus Zika	<i>Mycobacterium gordonae</i>
VIH-2	Virus de herpes humano 6B	<i>Staphylococcus aureus</i>
Virus de Epstein-Barr	Virus de herpes humano 8	
Citomegalovirus	Adenovirus tipo 5	
Virus de papiloma humano 16	Virus del dengue tipo 1	
Virus de papiloma humano 18	Virus del dengue tipo 2	
Poliomavirus humano BK	Virus del dengue tipo 3	
Virus del herpes simple 1	Virus del dengue tipo 4	
Virus del herpes simple 2	Virus de Influenza A (H1N1)	
Virus de Influenza A (H3N2)	Virus Powassan	
Virus de encefalitis de St. Louis	Virus Usutu	

Líquido ascítico inmune a la encefalitis japonesa

### 9.1.8 Falla total del sistema

La tasa de falla total del sistema fue evaluada con ciento dos (102) réplicas utilizando el kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa. Se obtuvieron resultados positivos en la detección del 100% de ciento dos (102) réplicas, en general, se demostró una tasa de éxito del sistema del 100% en el kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa en plasma y suero respectivamente.

**Tabla 19. Tasa de falla total del Sistema**

Matriz	Concentración (Log <sub>10</sub> UI/ml)	Número de prueba	Tasa de detección (%)
Plasma	1.48	102	100%

### 9.1.9 Contaminación cruzada

Esta evaluación consiste en 8 muestras cada una de positivo y negativo altos, y 5 ejecuciones sobre el mismo instrumento durante 5 días. Todas las muestras negativas no deberían ser detectadas como una señal de VHC.

La prueba de contaminación cruzada fue realizada utilizando el kit de diagnóstico VHC de acuerdo con la pauta CTS. Se probaron altos positivos y negativos a una concentración de 8,00 Log<sub>10</sub> UI/ml y una matriz libre de VHC negativa, respectivamente.

Tabla 20. Resultados de la Contaminación cruzada en plasma EDTA

Run (Ejecución)	Número de muestras (detectadas/probadas)		Información de la muestra (Log <sub>10</sub> UI/ml)		Aprobado/fallido
	Positivo	Negativo	8.00	Negativo	
Ejecución 1	8/ 8	0/ 8	7.83	No detectado	Aprobado
Ejecución 2	8/ 8	0/ 8	7.77	No detectado	Aprobado
Ejecución 3	8/ 8	0/ 8	7.8	No detectado	Aprobado
Ejecución 4	8/ 8	0/ 8	7.86	No detectado	Aprobado
Ejecución 5	8/ 8	0/ 8	7.86	No detectado	Aprobado
Promedio			7.83	-	-
SD			0.04	-	-

Tabla 21. Resumen de resultados de contaminación cruzada (Entre equipos Plasma)

Equipos	Número de muestras (detectados/ probados)		Información de la muestra (Log <sub>10</sub> UI/ml)		Aprobado/fallido
	Positivo	Negativo	8.00	Negativo	
Equipo 1	8/ 8	0/ 8	8.02	No detectado	Aprobado
Equipo 2	8/ 8	0/ 8	8.03	No detectado	Aprobado
Equipo 3	8/ 8	0/ 8	8.05	No detectado	Aprobado
Equipo 4	8/ 8	0/ 8	8.05	No detectado	Aprobado
Equipo 5	8/ 8	0/ 8	8.02	No detectado	Aprobado
Promedio	-	-	8.03	-	-
SD	-	-	0.04	-	-

Tabla 22. Resultados de la Contaminación cruzada en Suero



Run (Ejecución)	Número de muestras (detectadas/probadas)		Información de la muestra (Log <sub>10</sub> UI/mL)		Aprobado/fallido
	Positivo	Negativo	8.00	Negativo	
Ejecución 1	8/ 8	0/ 8	8.29	No detectado	Aprobado
Ejecución 2	8/ 8	0/ 8	8.29	No detectado	Aprobado
Ejecución 3	8/ 8	0/ 8	8.27	No detectado	Aprobado
Ejecución 4	8/ 8	0/ 8	8.25	No detectado	Aprobado
Ejecución 5	8/ 8	0/ 8	8.27	No detectado	Aprobado
Promedio			8.28	-	-
SD			0.035	-	-

**Tabla 23. Resumen de resultados de contaminación cruzada (Entre equipos\_suero)**

Equipos	Número de muestras (detectados/ probados)		Información de la muestra (Log <sub>10</sub> UI/mL)		Aprobado/fallido
	Positivo	Negativo	8.00	Negativo	
Equipo 1	8/ 8	0/ 8	8.03	No detectado	Aprobado
Equipo 2	8/ 8	0/ 8	8.02	No detectado	Aprobado
Equipo 3	8/ 8	0/ 8	8.05	No detectado	Aprobado
Equipo 4	8/ 8	0/ 8	8.08	No detectado	Aprobado
Equipo 5	8/ 8	0/ 8	7.98	No detectado	Aprobado
Promedio	-	-	8.03	-	-
SD	-	-	0.07	-	-

## 9.2 Características de Rendimiento del Diagnóstico

### 9.2.1 Sensibilidad y Especificidad del diagnóstico

Se compararon un total de doscientas cincuenta (250) muestras clínicas de plasma Negativo EDTA positivo para el VHC con un ensayo NAT VHC aprobado por CE-IVD.

La sensibilidad del diagnóstico fue de 99.26% (95% CI 95.95 – 99.87) y la especificidad fue de 99.12 % (95% CI 95.21 – 99.84). Esto satisfizo los criterios propuestos de aceptación del 95% o más.

**Tabla 20. Resumen de los resultados de la Evaluación clínica de VHC del kit AccuPower® de VHC de RT-PCR Cuantitativa.**

		ensayo NAT VHC aprobado por CE-IVD		
		Positivo	Negativo	Total
<b>sistema ExiStation™</b>	Positivo	135	1	136
	Negativo	1	113	114
	Total	136	114	250

Sensibilidad del Diagnóstico (Porcentaje de concordancia positiva) = **99.26 % (95% C.I 95.95 - 99.87)**

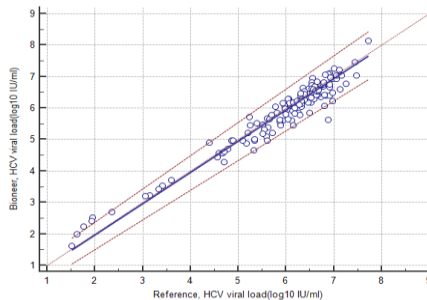
Especificidad del Diagnóstico (Porcentaje de concordancia negativa) = **99.12 % (95% C.I 95.21 - 99.84)**

### 9.2.2 Correlación

Se comparó el kit *AccuPower®* de VHC de RT-PCR Cuantitativa con otro ensayo VHC aprobado por CE-IVD. Se recolectaron un total de 136 ejemplares de pacientes infectados con VHC y probados en un sitio externo. 135 de 136 resultados fueron válidos. Los resultados fueron analizados con un método de regresión lineal.

El valor de R<sup>2</sup> fue de 0.9435, la pendiente fue de 0.9939(95% CI: 0.9470 ~ 1.0559) y la intercepción fue de - 0.007(95% CI: -0.3942~0.2695)Log<sub>10</sub> UI/ml.

<b>Regression Equation</b>	<b>y = -0.007 + 0.9939 x</b>
<b>Intercept</b>	<b>-0.007(95% CI: -0.3942~0.2695)</b>
<b>Slope</b>	<b>0.9939(95% CI: 0.9470 ~ 1.0559)</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9435</b>
<b>Linear model validity (Cusum test for linearity)</b>	<b>P=0.31 (P&gt; 0.05)</b>



**Fig. 72 Correlación con el ensayo aprobado por CE-IVD**

### 9.2.3 Verificación de la precisión

La precisión del kit fue validada por el fabricante. Los resultados de la prueba de precisión del fabricante fueron verificados en el sitio clínico. Este estudio fue analizado usando dos (2) diluciones del panel estándar internacional de VHC y un único lote del kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa de acuerdo con la CLSI EP15-A. Cada dilución fue probada en tres (3) réplicas y por un periodo de más de tres (3) días.

Los resultados de la prueba de precisión del usuario fueron menores que la prueba de precisión del fabricante.

Se verificó que la precisión  $S_{dentro}$  o  $S_{Total}$  del ensayo con el kit *AccuPower*<sup>®</sup> de VHC de RT-PCR Cuantitativa es coherente con la afirmación del fabricante.

**Tabla 18. Resumen de resultados de la verificación de la precisión del usuario.**

Concentración	Rendimiento analítico Valor de precisión		Rendimiento de la verificación Valor de precisión		Rendimiento de la verificación Valor de verificación	
	$\sigma_{dentro}$	$\sigma_{total}$	$S_{dentro}$	$S_{total}$	$S_{dentro}$	$S_{total}$
	30 UI/ml	0.31	0.35	0.43	0.41	0.48
1.000 UI/ml	0.15	0.2	0.16	0.15	0.23	0.29

## 10. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

### Comentarios y sugerencias

#### Resultados inválidos del Control Positivo Interno (IPC)

Si el TAMRA (IPC)

No se detectó la señal de fluorescencia en todos los pozos (controles inconclusos)

- Extracción y/o error de configuración del PCR
  - ☞ Cerciórese de que fue programado y realizado el protocolo correcto de extracción/PCR de acuerdo con los Kits.. Si es necesario, repita el ensayo.  
Consulte la **Guía del Usuario 8. PROTOCOLO**
  
- Extracción incorrecta o uso incorrecto del kit de PCR
  - ☞ Cerciórese de estar utilizando los kits apropiados para las pruebas previstas.
  
- El kit podría estar dañado, debido al mal almacenamiento o vencimiento.
  - ☞ Evalúe sus condiciones de almacenamiento y revise la fecha de vencimiento. Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario.  
Consulte la **Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL**
  
- Resultados inválidos.
  - ☞ Debe probarse con el nuevo reactivo

<p>Si el TAMRA (IPC) No se detectó la señal de fluorescencia en los pozos 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. Repita el ensayo a partir del proceso de pretratamiento de muestras el cual puede reducir la inhibición de PCR.</li> <li>☞ Cerciórese de usar el método validado de pretratamiento 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.). Repita el ensayo a partir del proceso de pretratamiento de muestras lo cual puede hacer que la muestra sea más soluble.</li> </ul> </li> </ul>
---	---

#### Resultados inválidos del SPC/PC

<p>Si el FAM (SPC) La señal de fluorescencia no fue determinada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <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. Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario.</li> </ul> <p>Consulte la <b>Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL</b></p> </li>   <li>• Reutilización de los reactivos           <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ 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. Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario.</li> </ul> <p>Consulte la <b>Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL</b></p> <p>Precauciones Generales</p> </li>   <li>• Error de protocolo PCR           <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Revise su procedimiento de preparación del reactivo. Confirme la cantidad de SPC utilizada en un solo pozo.</li> </ul> <p>Consulte la <b>Guía del Usuario 8. PROTOCOLO</b></p> </li> </ul>
--	--

	<ul style="list-style-type: none"><li>• Puede haber un error de pipeteo.<ul style="list-style-type: none"><li>☞ Revise la técnica de pipeteo y calibración.</li></ul></li><li>• Resultados inválidos.<ul style="list-style-type: none"><li>☞ Debe probarse con el nuevo reactivo</li></ul></li></ul>
--	--

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

<p>Si la señal de fluorescencia FAM fue detectada en un pozo NTC.</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Puede haber ocurrido una contaminación.<ul style="list-style-type: none"><li>☞ Cerciórese de que el espacio de trabajo y los instrumentos sean descontaminados y repita el ensayo.</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. Repita el ensayo con nuevos reactivos, si es necesario.</li></ul><p>Consulte la <b>Guía del Usuario 5. ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL</b></p></li><li>• Error de protocolo PCR<ul style="list-style-type: none"><li>☞ Revise su procedimiento de preparación del reactivo. 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).</li></ul><p>Consulte la <b>Guía del Usuario 8. PROTOCOLO</b></p></li><li>• Puede haber un error de pipeteo.<ul style="list-style-type: none"><li>☞ Revise la técnica de pipeteo y calibración.</li></ul></li></ul>
---	--

## **11. REFERENCIAS**

- Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin.Microbiol. Infect. 10:190-212
- EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C, 2018
- Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa, Journal of Clinical Microbiology, March 2015 Volume 53 Number 3.
- MESSINA ET AL. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C virus Genotypes, HEPATOLOGY, January 2015.
- Lavanchy, Evolving epidemiology of Hepatitis C virus, Clinical Microbiology and Infection, Volume 17 Number 2, February 2011
- Philippe H. (2006) Real-Time PCR Assay for Hepatitis C virus (HCV) RNA Quantification Are Adequate for Clinical Management of Patients with Chronic HCV Infection. Journal of Clin.Microbiol. 44:2507-2511
- Fernanda M. (2007) Comparison of Performance Characteristics of Three Real-Time Reverse Transcription-PCR Test Systems for Detection and Quantification of Hepatitis C virus. Journal of Clin. Microbiol.45:2529-2536

## 12. 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



Advertencia de peligro e irritación



Manténgalo 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