

ARGENE® TTV R-GENE®

IVD

1. USO PREVISTO	1
2. CONTEXTO CIENTÍFICO	1
3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA	2
4. CONTENIDO DEL KIT Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	4
5. REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	4
6. PRECAUCIONES DE UTILIZACIÓN	5
7. TRANSPORTE, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	5
8. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS	6
9. PROTOCOLO DE DETECCIÓN/CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL	7
10. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	10
11. VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	12
12. PRESTACIONES	13
13. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	22
14. BIBLIOGRAFÍA	26
15. TABLA DE SÍMBOLOS	28
16. GARANTÍA LIMITADA	28
17. HISTÓRICO DE REVISIONES	28

Kit de detección y cuantificación en tiempo real, TTV R-GENE®

Kit de detección y cuantificación en tiempo real, TTV R-GENE®

1. Uso previsto

El kit TTV R-GENE®, que utiliza tecnología de PCR en tiempo real después de la extracción del ADN vírico, permite detectar y cuantificar el genoma de TTV en muestras de sangre total y plasma.

Combinado con otros métodos de investigación biológica (imágenes médicas, recuento de glóbulos blancos, fenotipado de linfocitos, etc.), los resultados obtenidos con el kit TTV R-GENE® permiten la monitorización de la carga viral de TTV y son una ayuda para evaluar la función inmunitaria: la monitorización de la carga viral de TTV se puede utilizar para evaluar el estado inmunitario de pacientes adultos trasplantados.

Este kit está indicado únicamente para diagnóstico *in vitro* realizado en laboratorios clínicos por parte de profesionales sanitarios.

Limitación de la prueba:

Este kit no se puede utilizar para screening de donantes.

2. Contexto científico

El virus Torque teno (TTV), clasificado en la familia *Anelloviridae*, es un virus de ADN circular, monocatenario y sin envoltura. Su secuencia de ADN tiene un tamaño genómico total de aproximadamente 3,8 kb y contiene dos marcos de lectura abiertos principales (ORF1 y 2), entre varios otros. TTV es miembro del género *Alfatorquevirus*, que incluye al menos 22 especies (fuente: Comité Internacional de Taxonomía de Virus ICTV, 1 de febrero 2022, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Los *Anelloviridae* humanos también están representados por el virus Torque Teno Mini (TTMV) y el Torque Teno Midi (TTMDV), pertenecientes a los géneros *Betatorquevirus* y *Gammatorquevirus*, respectivamente. La familia de los anellovirus, muy diversa, ha sido identificada como uno de los principales componentes del viroma de la sangre humana; su prevalencia es muy alta, generalmente más del 90 %. Se adquieren

múltiples infecciones con diferentes especies de TTV con el tiempo, comenzando temprano en la infancia y dan lugar a una viremia de por vida. Este virus se transmite por muchos canales: sanguíneo, oral, fecal, sexual, de la madre al hijo, entre otros.⁽⁴⁾

Hasta la fecha, TTV no se ha asociado claramente con ninguna manifestación clínica y la utilidad clínica de TTV se basa en su relación con el estado inmunitario funcional de la persona. De hecho, el tratamiento clínico de los pacientes inmunodeprimidos, en particular los receptores de trasplantes de órganos sólidos (SOT) y de células madre hematopoyéticas (HSCT), depende en parte de la evaluación del estado inmunitario a lo largo de la enfermedad. En consecuencia, la evaluación del estado inmunitario ayuda a predecir las complicaciones posteriores al trasplante asociadas al sistema inmunitario, como las complicaciones infecciosas, el rechazo del injerto o la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Debido a su correlación con el sistema inmunitario funcional, el TTV circulante sistémico se considera un marcador sustitutivo de la función inmunitaria. En consecuencia, entre los receptores de trasplantes, la cinética de la carga viral del TTV ayuda a estratificar a los pacientes con riesgo de rechazo del injerto y a los pacientes con riesgo de infecciones oportunistas.^(4, 11, 16)

3. Principio de la prueba

3.1. Tipos de muestra

Los tipos de muestras validados con este kit son los siguientes:

- Sangre total
- Plasma

3.2. Extracción de ácido nucleico

Los sistemas de extracción validados con este kit son los siguientes:

- EMAG®
- NUCLISENS® easyMAG®
- MagNA Pure 96
- QIA Symphony SP

El ADN diana contenido en la muestra y en el control interno (IC2) se extrae con la ayuda de uno de los sistemas de extracción validados e indicados anteriormente.

3.3. Amplificación y detección en tiempo real

Principio

La PCR en tiempo real se basa en la amplificación de ciertas regiones del genoma de interés. La detección se realiza utilizando la técnica de sonda de hidrólisis de nucleasa de 5'.

La mezcla de amplificación y detección lista para usar contiene dNTP, MgCl₂, el tampón de amplificación, la polimerasa Taq, los cebadores y las sondas de carácter específico para TTV y los cebadores y las sondas para el control interno.

Secuencias amplificadas

Los cebadores utilizados permiten la amplificación del gen de la región 5'-UTR (región sin traducción). El tamaño del fragmento amplificado es de 128 pb.

Intervalo de cuantificación

El intervalo de cuantificación de la prueba TTV R-GENE® está incluido entre 250 copias/mL y 1,0E+09 copias/mL (es decir, entre 2,4 log₁₀ y 9,0 log₁₀ copias/mL). Los resultados obtenidos se expresan en forma de número de copias/mL de muestra. Los resultados se validan mediante un control de extracción, un control de inhibición y un control negativo que se suministran con el kit.

Plataformas de amplificación validadas

- Applied Biosystems
 - 7500 Fast⁽¹⁾
 - 7500 Fast Dx⁽¹⁾
 - QuantStudio 5 (bloques para placas de 96 pocillos de 0,1 mL y 0,2 mL)⁽¹⁾
 - QuantStudio 5 Dx⁽¹⁾
- LightCycler 480 (System II)
- CFX96
- CFX Opus 96
- Rotor-Gene Q

Handwritten signature and text:
GABRIEL DELGADO
DNI: 27941903
A. PARRAS

(1) Procesar solamente en el modo **Fast**.

ATENCIÓN: Las prestaciones técnicas descritas se han validado y están garantizadas si el kit se utiliza con las técnicas de extracción y plataformas de amplificación que se describen en la ficha técnica. Para seguir la evolución de la carga viral en las muestras de un paciente después de la prueba, es necesario que los análisis sucesivos de las muestras se realicen siguiendo el mismo protocolo y con las mismas combinaciones de instrumentos de extracción y amplificación.

3.4. Controles

3.4.1. Controles de extracción + inhibición

3.4.1.1. Control de extracción + inhibición de muestras (IC2sample)

- Este control consiste en un control interno **IC2** que se añade a las muestras de pacientes, se extrae y se amplifica para comprobar la eficacia de la extracción y detectar la posible presencia de inhibidores.
- Su señal se detecta a **560 nm**.

3.4.1.2. Control de extracción + inhibición de referencia (IC2W0)

- Este control consiste en un control interno **IC2** que se añade al control negativo de extracción (**W0**), se extrae y se amplifica a la vez que las muestras de pacientes con el fin de obtener una referencia (**IC2W0**) por serie de extracción. Los resultados se deben comparar con los controles de extracción/inhibición de las muestras (**IC2sample**).
- Su señal se detecta a **560 nm**.

⇒ La comparación de los valores de Ct (umbral de ciclo) de **IC2W0** y **IC2sample** a **560 nm** se utiliza para evaluar la eficacia de la extracción y para detectar posibles inhibidores.

Nota: Excepción: Una muestra extraída con el control interno **IC2** de este kit se puede probar con otro kit de la gama de productos ARGENE®. El **IC2** utilizado con **W0** y la muestra deben proceder del mismo lote.

3.4.2. Controles negativos de extracción + amplificación (IC2W0)

- Se trata del mismo tubo que el descrito en la sección *REFERENCIA DE EXTRACCIÓN + CONTROL DE INHIBICIÓN* pero, cuando se hace la lectura a **530 nm**, constituye un control negativo que permite comprobar la ausencia de contaminación en la extracción y en la amplificación.
- Su señal se detecta a **530 nm**.

3.4.3. El intervalo estándar (QS1, QS2, QS3 y QS4)

- Es imprescindible usar la gama de intervalos estándar suministrada con el kit para la cuantificación de muestras.
- Los estándares de cuantificación se usan para obtener una curva estándar a partir de la cual se calcula la carga viral de la diana
- Los estándares de cuantificación se amplifican con una premezcla de amplificación **R33** para TTV.
- Cada uno de los cuatro puntos de la gama estándar consiste en un plásmido específico del patógeno diana. No se debe extraer.
- Las concentraciones de los estándares de cuantificación oscilan entre 5000 copias/μL (**QS1**) y 5 copias/μL (**QS4**).
- Los estándares de cuantificación se deben designar como "estándares" y sus concentraciones respectivas se deben especificar durante el registro de las muestras en el programa de análisis de los datos.
- La señal de **QS** se detecta a **530 nm**.

3.4.4. Estándar de cuantificación (QS3)

- La prueba estándar **QS3** permite evitar la generación de una curva patrón nueva para cada serie de la prueba.
- **Nota:** Considere la posibilidad de importar una curva estándar a los termocicladores validados con este kit.
- Solo se puede importar la curva patrón mediante **QS3** utilizando kits con un mismo número de lote y siempre que el tiempo transcurrido entre la ejecución de la prueba y la importación de la curva estándar sea inferior a tres meses.
- Su señal se detecta a **530 nm**.

3.4.5. Control de sensibilidad (SC)

- El control de sensibilidad (**SC**) imita un eluido con baja positividad. Por esta razón, podría dar ocasionalmente un resultado negativo. Permite a los laboratorios supervisar el procedimiento de amplificación del ensayo a lo largo del tiempo e identificar posibles desviaciones.
- El control de sensibilidad (**SC**) se amplifica con la premezcla de amplificación **R33** para TTV.
- El control de sensibilidad (**SC**) equivale a una muestra ligeramente positiva. Por esta razón, podría dar ocasionalmente un resultado negativo.
- El uso de este control es opcional.

- Su señal se detecta a **530 nm**.

3.4.6. Trazabilidad metrológica

La trazabilidad metrológica de los estándares de cuantificación (QS) TTV R-GENE® se lleva a cabo probando los estándares de cuantificación frente a una referencia interna.

4. Contenido del kit y condiciones de almacenamiento

TTV R-GENE® ref. 423414 Número de pruebas: 90 Antes y después de abrir el kit, es necesario almacenar los reactivos a -15 °C/-31 °C. Una vez descongelado, se tiene que utilizar un bloque frío (entre +2 °C/+8 °C) para manejar los reactivos, y utilizar un enfriador de PCR para manejar la placa/galería de PCR. Es necesario homogeneizar todos los reactivos antes de usarlos. Después de su uso, es necesario almacenar los reactivos a -15 °C/-31 °C.				
---	--	--	--	--

Denominación	Nombre	Composición	Presentación	Condiciones de almacenamiento
W0	Agua (grado molecular)	-	2 x 1,8 mL	-
IC2 (azul)	Control interno 2	ADN encapsulado	1 x 1,0 mL	El IC2 no tolera más de 50 ciclos de congelación/descongelación. Es estable hasta seis horas a ≤+30 °C. Posteriormente se recomienda realizar alícuotas del control interno.
De QS1 a QS4 (de púrpura oscuro a blanco)	Estándares de cuantificación de TTV	Plásmido recombinante	1 x 300 µL para cada QS QS1: 5000 copias/µL QS2: 500 copias/µL QS3: 50 copias/µL QS4: 5 copias/µL	QS y SC no toleran más de 30 ciclos de congelación/descongelación.
SC (gris)	Control de sensibilidad de TTV	Plásmido recombinante	1 x 300 µL SC: 1 copia/µL	
R33 (rojo)	Premezcla de amplificación para TTV e IC2	Contiene los dNTPs, MgCl ₂ , tampón de amplificación, cebadores y sondas para la diana probada y para control interno, polimerasa Taq	3 x 450 µL	La premezcla de amplificación (R33) no tolera más de 10 ciclos de congelación/descongelación y se debe conservar protegida de la luz.
1 ficha técnica disponible para descargar en www.biomerieux.com				

5. Reactivos y material necesarios pero no suministrados

- Plataformas de amplificación validadas con el kit (consulte la sección *PRINCIPIO DE LA PRUEBA*).
- Centrifugadora adaptada a la plataforma de amplificación.

GABRIEL DELGADO
DNI: 27941903
A. PARRAS

- Sistemas de extracción validados con el kit; siga las instrucciones del fabricante (consulte la sección *PRINCIPIO DE LA PRUEBA*).
- Tubos o placas adecuados para la plataforma de amplificación en tiempo real validada con el kit.
- Bloque frío o enfriador de PCR adecuado para la plataforma de amplificación validada con el kit.
- Luz ultravioleta.
- Estación de trabajo o pantalla de plexiglás para la distribución de las premezclas y de las muestras.
- Micropipetas y puntas con filtro estériles adecuadas para el volumen que se vaya a dispensar.

6. Precauciones de utilización

- El kit lo debe manejar personal cualificado de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio y las instrucciones de manipulación para biología molecular.
- Lea todas las instrucciones antes de empezar.

6.1. Precauciones generales de utilización

- Evite cualquier contacto entre los reactivos y la piel. En caso de contacto, lavar abundantemente con agua.
- Las muestras se deben preparar en una campana de seguridad biológica.
- Este equipo contiene compuestos de origen animal. El origen y/o el estado sanitario de los animales no pueden garantizar de forma absoluta que estos productos no contienen ningún agente patógeno transmisible; se recomienda manipularlos con las precauciones de uso relativas a los productos potencialmente infecciosos (no ingerir; no inhalar).
- Los reactivos no utilizados pueden eliminarse como residuos no peligrosos. Eliminar los reactivos usados, así como los materiales desechables contaminados siguiendo los procedimientos relativos con los productos infecciosos o potencialmente infecciosos.

Es responsabilidad de cada laboratorio la gestión de los desechos y efluentes que produce según su naturaleza y peligrosidad, garantizando (o haciendo garantizar) su tratamiento y eliminación, según las reglamentaciones aplicables.

- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

6.2. Precauciones de utilización para la biología molecular

- Para los procedimientos de amplificación se necesitan técnicas muy desarrolladas con las que evitar el riesgo de contaminación de las muestras:
 - Las fases de preparación de reactivos, preparación de muestras y amplificación deben desarrollarse en zonas de trabajo separadas. Los movimientos en el laboratorio deben ir en una dirección solamente: del área de preparación de reactivos al área de amplificación. Asigne un juego de batas de laboratorio y pipetas a cada zona. No introduzca nunca un producto amplificado en las zonas de preparación de reactivos o muestras.
 - Las pipetas utilizadas para manejar las muestras se deben reservar para este fin solamente. Las pipetas empleadas para preparar y distribuir los reactivos se deben reservar también para este fin solamente.
 - En el caso de un uso manual, no se deben abrir nunca los tubos con distintas muestras y distintas premezclas de amplificación a la vez.
 - Las muestras usadas se deben reservar exclusivamente para este análisis.
- No intercambie los reactivos de kits con números de lote distintos.
 - Excepción: Una muestra extraída con el control interno **IC2** de este kit se puede probar con otro kit de la gama de productos ARGENE®.
- No sustituya los reactivos por otros de diferentes fabricantes.
- No utilice los reactivos del kit de amplificación si están descongelados en el momento de recibirlos.
- Los reactivos deberán descongelarse completamente entre a +18 °C/+25 °C antes de utilizarlos y ser homogeneizados.
- Una vez descongelado, se tiene que utilizar un bloque frío (entre +2 °C/+8 °C) para manejar los reactivos, y utilizar un enfriador de PCR para manejar la placa/galería de PCR.
- Realice el mantenimiento preventivo de las estaciones de trabajo, los sistemas de extracción automáticos, las plataformas de amplificación y los sistemas de centrifugación según las recomendaciones del fabricante.

Para obtener información más detallada, consulte la ficha de datos de seguridad del producto, que puede descargar en www.biomerieux.com.

7. Transporte, preparación y almacenamiento de muestras

- Si se utilizan procedimientos de recogida, tratamiento, almacenamiento o transporte incorrectos, se podrían obtener resultados erróneos.
- Es necesario recoger las muestras según las instrucciones del laboratorio y transportarlas conforme a las normativas locales.
- El laboratorio debe transportar y tratar las muestras en el menor tiempo posible (preferiblemente en 24 horas).
- Las muestras deben ser transportadas en medios compatibles con las pruebas de biología molecular.

7.1. Sangre total

ATENCIÓN: El uso de muestras de sangre recogidas en tubos heparinizados es incompatible con un análisis por amplificación génica. Los tubos de obtención de muestras sanguíneas contienen citrato, que puede provocar pérdida de señal durante la detección de los productos amplificados.

La sangre total se debe recoger en tubos con EDTA.

Es necesario recoger todas las muestras de sangre utilizando las precauciones universales de venopunción. Utilice el volumen de muestra adecuado para garantizar un cociente óptimo de sangre/aditivo.

- Antes de proceder a la extracción, es necesario homogeneizar las muestras de sangre invirtiéndolas manualmente o con un agitador automático. Alícuote la muestra en una campana de seguridad biológica.
- Si las muestras no se procesan a la llegada, se pueden almacenar:
 - 72 horas a +18 °C/+25 °C
 - 8 días a +2 °C/+8 °C
 - 4 meses a -15 °C/-31 °C o ≤-60 °C con un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación.

7.2. Plasma

ATENCIÓN: El uso de muestras de sangre recogidas en tubos heparinizados es incompatible con un análisis por amplificación génica. Los tubos de obtención de muestras sanguíneas contienen citrato, que puede provocar pérdida de señal durante la detección de los productos amplificados.

El plasma debe provenir de sangre recogida en tubos con EDTA y debe tratarse de la forma siguiente:

La sangre debe centrifugarse lo antes posible (el día de la recolección, si es posible) a 1200 x g durante diez minutos a +20 °C y debe decantarse bajo una campana de seguridad biológica en criotubos de hasta 2 mL (200 µL como mínimo).

Si las muestras no se procesan a la llegada, se pueden almacenar:

- 72 horas a +18 °C/+25 °C
- 8 días a +2 °C/+8 °C
- 4 meses a -15 °C/-31 °C o ≤-60 °C con un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación.

8. Protocolo de extracción de muestras

ATENCIÓN: Antes de comenzar el proceso de extracción, compruebe que las muestras descongeladas y el reactivo IC2 estén homogeneizados.

8.1. Tratamientos previos necesarios antes de la extracción

8.1.1. Sangre total

Homogeneice la muestra invirtiéndola repetidamente antes de cargarla en el sistema de extracción automático.

8.2. Protocolos de extracción validados con el kit

Se debe realizar el mantenimiento de estos instrumentos de extracción regularmente y por personal cualificado, conforme a las recomendaciones del fabricante.

Instrumentos	Kit	Muestra de la prueba	Tipo de muestra ⁽¹⁾	Protocolo	Volumen de elución
EMAG®	Reactivos de NUCLEISENS® easyMAG®	Muestra de 200 µL + 10 µL IC2 ⁽⁶⁾	Sangre total	B01/B50 ⁽²⁾	50 µL
			Plasma	B10/B30/B40 ⁽²⁾	
NUCLEISENS® easyMAG®	Reactivos de NUCLEISENS® easyMAG®	Muestra de 200 µL + 10 µL IC2 ⁽⁵⁾	Sangre total	"Extracción de sangre total viral" protocolo	50 µL
		Muestra de 200 µL + 10 µL IC2	Plasma	Específico B con 140 µL de sílice	
MagNA Pure 96	DNA and Viral NA Small Volume kit	Muestra de 200 µL + 10 µL IC2	Sangre total Plasma	Específico B con 50 µL de sílice	100 µL
QIAAsymphony SP	QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit	Muestra de 200 µL + IC2 ^{(3) (6)}	Sangre total	VirusBlood200_DSP	90 µL (60 µL disponibles)
	Mini Kit QIAAsymphony DSP Virus/Patógeno	Muestra de 200 µL + IC2 ^{(4) (6)}	Plasma	CellFree200_DSP	90 µL (60 µL disponibles)

⁽¹⁾ Consulte la sección *TRATAMIENTOS PREVIOS NECESARIOS ANTES DE LA EXTRACCIÓN*, si corresponde.

⁽²⁾ Consulte el código del método de extracción en el Manual de usuario del método de extracción EMAG®.

⁽³⁾ Si se utiliza el instrumento QIAAsymphony SP con sangre total, es posible preparar en el momento una premezcla que contenga IC2 (ARGENE® BIOMÉRIEUX) y tampón ATE (Qiagen). Para una muestra, mezcle 50,5 µL de tampón ATE + 9,5 µL IC2.

⁽⁴⁾ Si se utiliza el instrumento QIAAsymphony SP con plasma sanguíneo, es posible preparar extemporáneamente una premezcla de IC2 (ARGENE® BIOMÉRIEUX), portador de RNA (Qiagen) y tampón AVE (Qiagen). Para una muestra, mezcle 108,5 µL de tampón AVE + 2,5 µL de portador de ARN + 9 µL IC2.

⁽⁵⁾ Se debe preparar en el momento una premezcla compuesta por IC2, tampón de lisis y sílice, y añadirse a las muestras previamente repartidas en pocillos que contienen 2 mL de tampón de lisis. Para n muestras, mezcle 600 µL de tampón de lisis x (n+1) + 10 µL IC2 x (n+1) + 140 µL sílice x (n+1). Añada 740 µL de la mezcla a cada muestra. Para obtener más información, consulte la hoja de trabajo "Worksheet easyMAG® Viral Whole Blood extraction protocol" de BIOMÉRIEUX. La hoja de trabajo easyMAG® está disponible bajo petición.

⁽⁶⁾ **Atención:** Para sistemas automáticos, tenga en cuenta el volumen muerto durante la serie de la prueba (muestra y IC2) en función del tubo que se utilice. Si se utiliza un sistema automático de pipeteo, es posible reducir el número de reacciones posibles que incluyan IC a causa de las limitaciones impuestas por la automatización (por ej., volumen muerto). En el caso de EMAG®, se pueden extraer 46 muestras como mínimo con un 1 tubo de 1 mL de control interno.

Es necesario almacenar los eluidos conforme a las recomendaciones del fabricante del instrumento. En el caso de los instrumentos de BIOMÉRIEUX, esta información figura en el manual del usuario del instrumento.

9. Protocolo de detección/cuantificación en tiempo real

Nota: Para simplificar las instrucciones, el dispositivo dedicado a contener la mezcla de reacción de amplificación se denomina "tube".

- Los productos que se van a amplificar se corresponden con los productos de elución de muestras obtenidas siguiendo los métodos de extracción validados para el kit.

9.1. Programación de termocicladores

- Independientemente del instrumento de PCR en tiempo real empleado, el programa de amplificación consiste en lo siguiente.

Programa ADN

				Adquisición de fluorescencia				
Fases	Duración	Temperatura	Ciclos	LightCycler 480 (System II)	Applied Biosystems validados	Rotor-Gene Q	CFX96 CFX Opus 96	
Los aumentos y disminuciones de temperatura se establecen por defecto en 20 °C/segundo o en el 100 %								
Activación de polimerasa Taq		15 min	95 °C	1	-	-	-	-
Amplificación	Desnaturalización	10 s	95 °C	45	-	-	-	-
	Hibridación Elongación	40 s	60 °C		FAM (465-510) VIC/HEX/ Yellow555 (533-580)	FAM VIC	Green Yellow	FAM HEX
					Fin de hibridación			

Programa de ADN/ARN

				Adquisición de fluorescencia			
Fases	Duración	Temperatura	Ciclos	LightCycler 480 (System II)	Applied Biosystems validados	Rotor-Gene Q	CFX96 CFX Opus 96
Los aumentos y disminuciones de temperatura se establecen por defecto en 20 °C/segundo o en el 100 %							
Transcripción inversa	5 min	50 °C	1	-	-	-	-
Activación de polimerasa Taq	15 min	95 °C	1	-	-	-	-
Amplificación	Desnaturalización	10 s	45	-	-	-	-
	Hibridación	40 s		FAM (465-510) VIC/HEX/ Yellow555 (533-580)	FAM VIC	Green- Yellow	FAM HEX
	Elongación	25 s		Fin de hibridación			

Nota: En LightCycler 480, añadir una fase de enfriamiento: 30 s/40 °C/1 ciclo al final de la PCR.

Nota: En LightCycler 480, hay dos sistemas ópticos: solo "System II" es compatible con el uso del kit. El "System II" integra en su software una compensación de color automática.

Nota: En Applied Biosystems, seleccione "**NONE**" en "**PASSIVE REFERENCE**".

Nota: En Rotor-Gene Q, calibre la señal haciendo clic en "**GAIN OPTIMIZATION**".

Están disponibles pautas de programación bajo petición. Póngase en contacto con el representante local de bioMérieux.

9.2. Preparación de la amplificación

Asegúrese de que el bloque enfriador se ha descontaminado (por ejemplo, mediante exposición a luz ultravioleta durante 30 minutos).

En la sala reservada a la amplificación

- Antes de cada utilización:
 - Los reactivos deben descongelarse totalmente a **+18 °C/+25 °C** antes de iniciar la prueba.
 - Después de descongelarlos, los reactivos deben permanecer sobre un bloque frío (+2 °C/+8 °C).
 - La configuración de la placa/tira de PCR debe realizarse en un enfriador de PCR (+2 °C/+8 °C). Si se almacena a -19 °C/-31 °C, el enfriador de PCR debe ponerse a temperatura ambiente 10-20 minutos antes de su uso para evitar la condensación.
 - Homogeneice el **QS** y el **SC** (usando un agitador tipo vórtex durante 5-10 segundos) y centrifugue brevemente.
 - Homogeneizar los demás reactivos (mediante un mezclador tipo vórtex durante 2-5 segundos) y centrifugar brevemente.

ATENCIÓN: En caso de pipeteo manual y para evitar todo lo posible la contaminación, cierre los tubos cuando se haya completado la distribución.

ATENCIÓN: Es necesario volver a poner todos los reactivos (premezcla de amplificación (R33), estándares de cuantificación (QS), control de sensibilidad (SC)) a **-15 °C/-31 °C** inmediatamente después de usarlos.

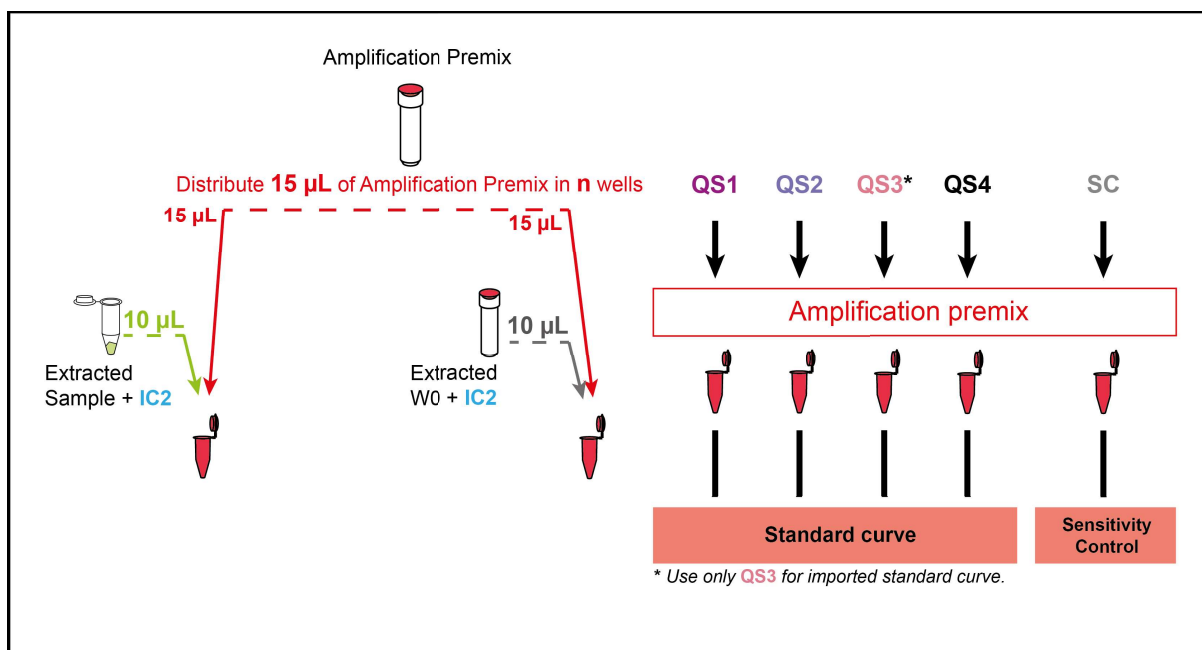
Preparar n tubos:

1	tubo	por muestra probada.
4	tubos	para la curva estándar creada.
O bien 1	tubo	para la curva patrón importada (QS3).
1	tubo	para el control de sensibilidad (SC) (<i>Opcional</i>).
1	tubo	para control de extracción + inhibición de referencia, lo cual también sirve como control negativo de extracción + amplificación (IC2W0).

Nota: Con los instrumentos de amplificación CFX96 y CFX Opus 96 utilizar las placas transparentes con tapones ópticos.

Nota: Para el instrumento de amplificación LightCycler 480 System II, utilice placas blancas LightCycler 480 Multiwell Plate 96.

Nota: Para el instrumento de amplificación Rotor-Gene Q, utilice "Strip Tubes and Caps, 0.1 mL".



- Extraiga y expulse 15 µL de la premezcla de amplificación específica del patógeno objetivo y distribuya 15 µL de ella en cada tubo.
- Al añadir la muestra, extraer y expulsar para homogeneizar la mezcla de reacción (salvo con Rotor-Gene Q).

Es necesario seguir el orden de distribución siguiente durante los procedimientos manuales:

1. Añadir 10 µL de **IC2W0** extraído en el tubo correspondiente.
2. Añada 10 µL de cada muestra extraída en cada tubo correspondiente.
3. Añada 10 µL de control de sensibilidad (**SC**) en el tubo correspondiente (*Opcional*).
4. Añada 10 µL de estándar (de **QS4** a **QS1**, o **QS3** en caso de importación de curva estándar) en cada tubo correspondiente.
5. Centrifugue los tubos con el dispositivo correspondiente, si corresponde, antes de transferirlos al termociclador.
6. Ejecute el programa de amplificación que se describe en la sección **PROGRAMACIÓN DE TERMOCICLADORES**.
7. Identifique las muestras y los controles.
8. Para la cuantificación de la diana, introduzca los valores estándar siguientes en términos de copias/mL conforme al protocolo de extracción y la proporción siguiente: volumen extraído de muestra/volumen de elución.

	Cuantificación		
	Extracción de 200 µL Elución en 50 µL (copias/mL)	Extracción de 200 µL Elución en 100 µL (copias/mL)	Extracción de 200 µL Elución en 90 µL (copias/mL)
QS1	1 250 000	2 500 000	2 250 000
QS2	125 000	250 000	225 000
QS3	12 500	25 000	22 500
QS4	1250	2500	2250

10. Análisis de los resultados

Están disponibles pautas de programación bajo petición. Póngase en contacto con el representante local de bioMérieux.

530 nm = el canal de lectura "FAM" o "Green" u otro, dependiendo de las plataformas de PCR en tiempo real. Para simplificar las instrucciones, solo se utiliza el término "**530 nm**".

560 nm = corresponde al canal de lectura "VIC", "Hex", "YELLOW" u otro, en función de las plataformas de PCR en tiempo real. Para simplificar las instrucciones, solo se utiliza el término "**560 nm**".

Ct = Umbral de ciclo para la mayoría de las plataformas de PCR en tiempo real o CP (Crossing Point) para la gama de instrumentos LightCycler.

10.1. Análisis de datos con LightCycler 480 (System II)

- Active la compensación automática de LC480 **FAM - HEX**.
- La diana viral se analiza en el modo **ABSOLUTE QUANTIFICATION** a **530 nm (FAM)**.
- Los controles de extracción + inhibición se analizan en el modo **ABSOLUTE QUANTIFICATION** a **560 nm (HEX)**.
- Para cada muestra positiva se calcula un valor de **CROSSING POINT (CP)** a **530 nm**.
- El análisis de los controles de extracción + inhibición se efectúa comparando el valor CP calculado para cada control de extracción + inhibición (**IC2sample**) con el valor CP obtenido con el control de extracción + inhibición de referencia (**IC2W0**) a **560 nm (HEX)**.

Nota: Es posible crear subconjuntos (**SUBSETS**) de cada parámetro analizado (p. ej.: **CMV**, **IC2 CMV**, etc.). En este caso, seleccione el subconjunto correspondiente.

Para análisis cuantitativos:

1. Utilice el método **FIT POINTS** para determinar el estado (positivo/negativo) de las muestras y los controles.
2. Conserve el método **FIT POINTS** o use el método **2ND DERIVATIVE MAX** para determinar la concentración de las muestras y controles.

Análisis mediante el ajuste de puntos:

El análisis mediante **FIT POINTS** consta de tres fases: **FASE 1: CYCLE RANGE**; **FASE 2: NOISE BAND**; **FASE 3: ANALYSIS**.

En la **FASE 1**, calcular la colocación del umbral (por encima del ruido de fondo y en la fase exponencial de cada curva de amplificación, que generalmente corresponde al 5-10 % de la fluorescencia final de la muestra). En la **FASE 2**, notificar el valor estimado de modo que la línea horizontal elimine el ruido de base y atraviese todas las curvas al principio de su fase exponencial. A continuación, en la **FASE 3**, notificar el valor obtenido en el paso anterior para colocar la línea umbral.

Mueva la línea umbral para cada diana.

Análisis utilizando la segunda derivada:

El análisis mediante el método **2ND DERIVATIVE MAX** calcula automáticamente los CP.

Nota:

- Se recomienda conservar el método de análisis seleccionado para realizar el seguimiento de pacientes.
- Compruebe el **QS3** tal como se define en la sección **VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**.
- Se recomienda monitorizar los CP y la eficacia de los intervalos de estándares calculados utilizando el método **2ND DERIVATIVE MAX**. Si se observa alguna discrepancia entre los CP calculados y el punto de inflexión de la curva o las curvas no parecen ser no-sigmoidales, se deberá utilizar el método **FIT POINTS** para realizar el análisis.

10.2. Análisis de resultados en los equipos de Applied Biosystems validados

- Compruebe que se haya seleccionado **NONE** en el campo **PASSIVE REFERENCE**, puesto que la premezcla no contiene ningún fluorocromo de referencia pasiva.
- La diana vírica se analiza después de seleccionar el detector/notificador **FAM** en el campo **DETECTOR/REPORTER**.
- Los controles de extracción + inhibición (**IC2sample** e **IC2W0**) se analizan después de seleccionar el detector/notificador **VIC** en el campo **DETECTOR/REPORTER**.

Nota: Es posible crear detectores/dianas para cada parámetro analizado (p. ej., **CMV**, **IC2 CMV**, etc.). Para hacerlo, cree un nuevo detector/notificador seleccionando **FAM** como **REPORTER** y **NONE O NFQ-MGB** como **QUENCHER**. A continuación, seleccione el detector/diana correspondiente.

- El análisis de los controles de extracción + inhibición se efectúa comparando el Ct calculado para cada control de extracción + inhibición (**IC2sample**) con el Ct obtenido con el control de extracción + inhibición de referencia (**IC2W0**) a **560 nm**.
- Para cada muestra positiva se calcula un Ct. Las muestras o los controles negativos definidos como **UNDETERMINED** se muestran en la columna **Ct**.
- En modo de visualización lineal (desactive el método automático), mueva manualmente la línea umbral de tal modo que:
 - esté por encima del ruido de línea de base
 - esté en la fase exponencial de cada curva de amplificación, que generalmente corresponde al 5-10 % de la fluorescencia final de la muestra.

Nota:

- Mueva la línea umbral para cada diana.
- Compruebe el **QS3** tal como se define en la sección **VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**.

10.3. Análisis de los resultados en Rotor-Gene Q

- La diana vírica se analiza en modo **CYCLING A GREEN** a **530 nm**.
- Los controles de extracción + inhibición se analizan en el modo **CYCLING A YELLOW** a **560 nm**.
- Para cada muestra positiva, se calcula un valor de **CYCLE THRESHOLD** (Ct) a **530 nm (verde)**.
- El análisis de los controles de extracción + inhibición se efectúa comparando el valor Ct calculado para cada control de extracción + inhibición (**IC2sample**) con el Ct obtenido con el control de extracción + inhibición de referencia (**IC2W0**) a **560 nm (amarillo)**.

Nota: Es posible crear páginas de análisis (**PAGE**) para cada parámetro analizado. En este caso, seleccione la página correspondiente.

- Seleccione la opción **DYNAMIC TUBES**.
- Si el nivel de fluorescencia de la línea de base no es constante, seleccione la opción **SLOPE CORRECT**.
- Si los primeros ciclos no son representativos (caída de la señal de fluorescencia, variaciones aleatorias de la fluorescencia, etc.), seleccionar la opción **IGNORE FIRST** para eliminarlos.

Nota: Las opciones **SLOPE CORRECT** e **IGNORE FIRST** no son obligatorias y son acumulativas.

- En modo **LINEAR SCALE**, mueva manualmente la línea umbral de modo que:
 - esté por encima del ruido de línea de base
 - esté en la fase exponencial de cada curva de amplificación, que generalmente corresponde al 5-10 % de la fluorescencia final de la muestra.

Nota:

- Mueva la línea umbral para cada diana.
- Compruebe el **QS3** tal como se define en la sección **VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**.

10.4. Análisis de datos sobre CFX96 y CFX Opus 96

- La diana viral se analiza en la pestaña **QUANTITATION** dejando marcado únicamente el botón **FAM**.
- Los controles de extracción + inhibición se analizan en la pestaña **QUANTITATION** dejando marcado únicamente el botón **HEX**.
- El análisis de los controles de extracción + inhibición se efectúa comparando el Ct calculado para cada control de extracción + inhibición (**IC2sample**) con el Ct obtenido con el control de extracción + inhibición de referencia (**IC2W0**) a **560 nm**.
Opcional: Seleccione una premezcla en el menú desplegable **FLUOROPHORE**, si se ha creado anteriormente.

- En modo **SINGLE THRESHOLD**, mueva manualmente la línea umbral de modo que:
 - esté por encima del ruido de línea de base
 - esté en la fase exponencial de cada curva de amplificación, que generalmente corresponde al 5-10 % de la fluorescencia final de la muestra.
- Se calcula un Ct de cada muestra positiva. Las muestras negativas o los controles se indican con **N/A** en la columna Ct.

Nota:

- Mueva la línea umbral para cada diana.
- Compruebe el **QS3** tal como se define en la sección **VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**.

11. Validación e interpretación de los resultados

11.1. Validación de la serie de PCR

ATENCIÓN: La serie solo es válida si se cumplen todas las condiciones que se especifican a continuación. Si no es el caso, consulte la sección **SOLUCIÓN DE PROBLEMAS**.

Ct = Umbral de ciclo para la mayoría de las plataformas de PCR en tiempo real o CP (Crossing Point) para la gama de instrumentos LightCycler.

- 1.ª CONDICIÓN: **IC2W0** no debe ofrecer señal (Ct) a **530 nm**.
- 2.ª CONDICIÓN: **IC2W0** debe ofrecer una señal (Ct) menor o igual que **32** ciclos a **560 nm**.
- 3.ª CONDICIÓN: El valor de Ct de **QS3** en **530 nm**, así como la pendiente o la eficacia requerida para el intervalo estándar, deben estar comprendidos entre los valores que figuran en la siguiente tabla.

Instrumentos	Ct QS3 TTV (530 nm)	Detección Cuantitativa	
		Pendiente/Eficacia necesaria	
		Intervalo estándar analizado en cada serie	Intervalo estándar procesado en la importación posterior
LightCycler 480 (System II)	28,0-33,0 ciclos	1,8 < Eficacia < 2,1	1,90 < Eficacia < 2,05
Rotor-Gene Q		0,8 < Eficacia < 1,1	0,90 < Eficacia < 1,05
Applied Biosystems validados		-3,917 < Pendiente < -3,103	No aplicable
CFX96, CFX Opus 96		80 % < Eficacia < 110 %	

⇒ Si se cumplen todas estas condiciones, la serie es válida y es posible interpretar los resultados.

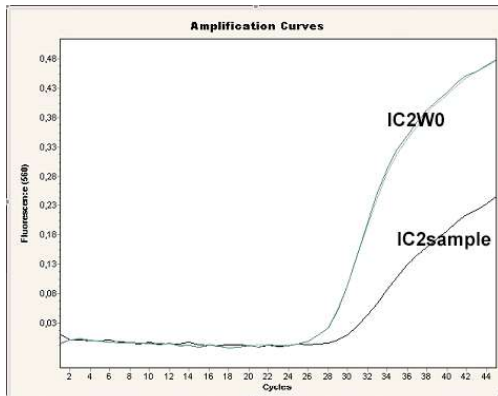
11.2. Interpretación de los resultados

- Cada muestra deberá analizarse de forma individual.
- Se muestra un valor Ct a **530 nm** para todas las muestras positivas.
- La ausencia de Ct en **530 nm** corresponde a un patógeno no detectado en la muestra o a una muestra inhibida o mal extraída.
- No obstante, en todos los casos es necesario controlar la ausencia de inhibición y el buen desarrollo de la etapa de extracción a **560 nm**, de acuerdo con los elementos descritos más adelante.
- Una carga viral elevada en la muestra puede dar lugar a la inhibición del control interno y producir una señal reducida o ausente a **560 nm**.

Control de extracción + inhibición (IC2sample)	Ct [IC2sample] ≤ Ct [IC2W0] + 3 ciclos**		Ct [IC2sample] > Ct [IC2W0] + 3 ciclos	
	Muestra NO INHIBIDA y EXTRAÍDA CORRECTAMENTE		Muestra INHIBIDA y/o MAL EXTRAÍDA	
Muestra	Ct calculado	CT no calculado	Ct calculado	CT no calculado
Interpretación cuantitativa TTV	Diana detectada Cuantificación validada*	Diana no detectada	Diana detectada Es necesario repetir la cuantificación	Resultado no válido

*Dentro del intervalo indicado de cuantificación. Fuera de este intervalo, es necesario interpretar el resultado como una cuantificación mayor/menor que los límites superior/inferior del intervalo indicado.

** Si la pendiente de la curva genera una caída en la fluorescencia final $\geq 50\%$ en comparación con la fluorescencia final de IC2W0 (consulte la figura siguiente), esto representa una inhibición. Vuelva a probar la muestra.



Importante:

- Para interpretar los resultados, se recomienda que el resultado de cuantificación se exprese como base logarítmica 10 ($\log_{10}$).
- En el contexto del seguimiento de pacientes, se reconoce comúnmente que una diferencia de menos de $0,5 \log_{10}$ entre dos resultados de cuantificación expresados en $\log_{10}$ no se considera significativo.
- Para resultados expresados en $\log_{10}$ (copias/mL de muestra), esta interpretación es aplicable solo si las dos cuantificaciones se realizan con el mismo tipo de muestra, con el mismo método y los mismos instrumentos de extracción y amplificación.
- Es **imprescindible** comparar los resultados obtenidos con este kit con otros resultados de pruebas clínicas y biológicas para definir el estado de cada paciente.

12. Prestaciones

ATENCIÓN: Las prestaciones descritas se han validado y están garantizadas cuando se utilizan las combinaciones de sistema/dispositivo de amplificación que se describen en esta sección.

12.1. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit TTV R-GENE® se determinó sobre diluciones seriadas de TTV6 (plásmido) en sangre total y plasma, y de sangre total clínica TTV positiva (previamente cuantificada en copias/mL), con 20 réplicas cada una.

La concentración más baja con una tasa de aciertos del 95 % se consideró el límite estimado de detección (LoD), que se confirmó en 20 réplicas de la concentración 250 copias/mL.

Se realizaron pruebas de confirmación adicionales en las siguientes especies: TTV1, TTV7, TTV8, TTV10, TTV24, TTV27 y TTV29 (plásmidos a 250 copias/mL en sangre total) y en una muestra de plasma clínico positiva diluida en matriz de plasma TTV negativa. En todos los casos, se informó una tasa de detección del 100 % (20/20).

Las extracciones se realizaron en EMAG® y la amplificación en Applied Biosystems 7500 Fast.

Como resultado, el límite de detección declarado es 250 copias/mL ($2,4 \log_{10}$ copias/mL) en sangre total y plasma.

12.2. Precisión

Los estudios de precisión se realizaron utilizando el kit TTV R-GENE® mediante un estudio de repetibilidad (variación intraserie) y un estudio de reproducibilidad (variación intralaboratorio) en un panel de muestras de sangre total. Cada panel de muestras se probó con 2 lotes de reactivos durante 6 días, con 3 días por lote, 1 serie por día y 3 réplicas por serie, para un total de 18 réplicas por concentración. La extracción se realizó en EMAG® y la amplificación en Applied Biosystems 7500 Fast Dx.

Las tablas siguientes muestran los valores medios de Ct o las cuantificaciones en $\log_{10}$ copias/mL obtenidas para las 18 pruebas repetidas para cada muestra positiva en el límite inferior de cuantificación (LLOQ) y en el límite superior de cuantificación (ULOQ). Se determinaron la desviación estándar y el coeficiente de variación de la repetibilidad y la reproducibilidad.

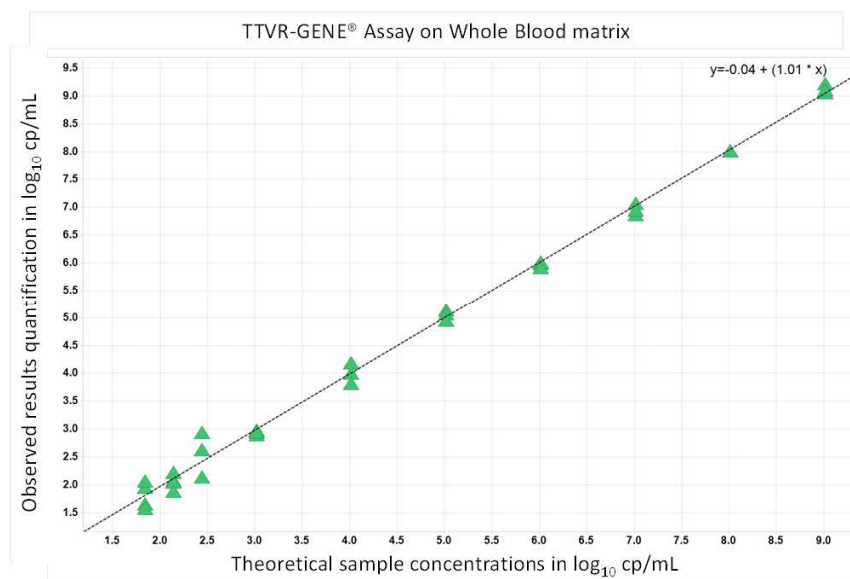
Muestra de entrada	Valor medio en log ₁₀ copias/mL	Fuente de variabilidad	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
LoD (= LLoQ)	2,2	Reproducibilidad	0,29	12,9
		Repetibilidad	0,19	8,7
ULoQ	9,0	Reproducibilidad	0,16	1,7
		Repetibilidad	0,04	0,5

⇒ Estos valores demuestran la buena reproducibilidad y repetibilidad del kit. Estos resultados también son válidos para plasma.

12.3. Linealidad

Se realizó una serie de diluciones de muestras clínicas de sangre total positivas para TTV en sangre total, con tres réplicas por concentración. Las extracciones se realizaron en EMAG® y la amplificación en Applied Biosystems 7500 Fast.

Las cifras siguientes presentan los resultados del estudio:



Para las matrices de sangre total y plasma: **la linealidad varía** de 70 a 1,0E+09 copias/mL (es decir, de 1,8 log₁₀ a 9,0 log₁₀ copias/mL). Estos resultados también son válidos para plasma.

12.4. Intervalo de cuantificación

El intervalo de cuantificación de la prueba TTV R-GENE® es de 250 a 1,0E+09 copias/mL (es decir, de 2,4 log₁₀ a 9,0 log₁₀ copias/mL) en sangre total y plasma.

12.5. Especificidad analítica

12.5.1. Inclusividad

Para el estudio de inclusividad, se determinó la especificidad del reconocimiento de los cebadores y las sondas seleccionadas para la detección de la TTV del kit TTV R-GENE® en sangre total como el peor caso para plasma.

Ocho especies diferentes de TTV (TTV1, TTV6, TTV7, TTV8, TTV10, TTV24, TTV27, TTV29), seleccionadas como representativas de familias de subtipos, se probaron por triplicado para todo el rango de cuantificación (a 1,0E+09 copias/mL correspondientes al límite superior de cuantificación 1,0E+06 copias/mL correspondiente a la mitad del rango de cuantificación y 1,0E+03 copias/mL correspondientes a 4xLoD) en la plataforma Applied Biosystems 7500 Fast después de la extracción con EMAG®.

Los resultados obtenidos en esas especies demuestran que se puede utilizar el kit TTV R-GENE® para detectar y cuantificar TTV.

12.5.2. Exclusividad e interferencia biológica

La especificidad del reconocimiento de los cebadores y las sondas seleccionados para la detección específica de TTV se demostró mediante el análisis in silico de secuencias (muestras virales, bacterianas y humanas) en los bancos de datos y experimentalmente sobre los 32 patógenos con probabilidad razonable de encontrarse en la sangre total y en el plasma.

La extracción se realizó en EMAG® y la amplificación se realizó en Applied Biosystems 7500 Fast.

Se añadieron los patógenos que se enumeran a continuación en altas concentraciones:

- en plasma, caracterizado como negativo en TTV (estudio de exclusividad).
- en plasma en el cual se había añadido plásmido TTV6 con una concentración de 1,0E+03 copias/mL (estudio de interferencias biológicas).

Virus: CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, HSV1, HSV2, VZV, BK Polyomavirus, JC Polyomavirus, Adenoviruses (AdV 3, 4, 5, 8, 11, 12 and 40), Hepatitis A, B y C, HIV-1 (RNA).

Bacterias: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,

Levaduras: *Candida albicans*, *Cryptococcus Neoformans*.

Ninguno de los 32 patógenos incluidos en pruebas a altas concentraciones fue detectado con el ensayo TTV R-GENE®.

Ninguno de los 32 patógenos probados a altas concentraciones tuvo ningún efecto sobre el rendimiento del ensayo TTV R-GENE®.

Nota: Estas pruebas han demostrado ausencia de secuencia de origen humano.

Además, las 12 especies de TTMV y las 15 especies de TTMDV (materiales de gBlock previamente cuantificados en copias/mL) se probaron a 1,0E+6 copias/mL por triplicado de amplificación en el instrumento Applied Biosystems 7500 Fast.

Algunas de las especies de TTMV y TTMDV probadas a 1.0E+6 copias/mL se detectaron con la prueba TTV R-GENE®.

12.5.3. Sustancias interferentes

Nota: Según estudios realizados en productos ARGENE®, no se espera interferencia con las siguientes sustancias:

Imunosupresores: Azatioprina, Ciclosporina, Micofenolato mofetilo, Tacrolimus, Sirolimus.

Antibióticos: Sulfametoxazol, Trimetoprim, Piperacilina, Tazobactam sódico, Clavulanato de potasio, Ticarcilina disódica, Cefotetán, Vancomicina.

Medicamentos contra el cáncer: Everolimus.

Corticosteroides: Prednisona.

Antifúngicos: Fluconazol.

Antivirales: Ganciclovir, Valganciclovir, Ribavirina, Cidofovir, Aciclovir, Foscavir.

12.6. Estudio de rendimiento clínico

Las características de rendimiento clínico del kit TTV R-GENE® se establecieron en un centro interno (Grenoble, Francia) y en un centro externo (Valencia, España). Se evaluaron en sangre total y plasma mediante un estudio de comparación de métodos con un método de PCR interno (Maggi, *et al.* TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J. Virol.* 2003;77(4):2418-2425), para demostrar la capacidad de la prueba para realizar el seguimiento de pacientes con carga viral de TTV y para realizar la cuantificación del virus TTV.

También se analizó la variabilidad intra e interindividual a lo largo del tiempo para medir la capacidad de la prueba para ayudar a evaluar el estado inmunitario.

En total, las características de rendimiento clínico del kit TTV R-GENE® se establecieron en 1660 muestras retrospectivas congeladas de:

- 59 pacientes con alo-HSCT (plasma) recogidos y analizados en el laboratorio de microbiología de la UHC de Valencia (España),
- 45 pacientes con alo-HSTC (sangre total) recogidos en la URHC de Brest (Francia) y en la UHC de Limoges (Francia), analizados en el centro interno de bioMérieux (Grenoble, Francia),
- 44 pacientes renales con SOT (plasma) recogidos en los Países Bajos, analizados en el centro interno de bioMérieux (Grenoble, Francia),
- 30 pacientes renales con SOT y 32 pacientes pulmonares con SOT (sangre total) recogidos en los hospicios civiles de Lyon (Francia) y analizados en el centro interno de bioMérieux (Grenoble, Francia),

- 31 sujetos sanos (plasma) recogidos en un biobanco alemán y analizados en el laboratorio de microbiología de la UHC de Valencia (España).

Cada paciente fue seguido durante un periodo de hasta 18 meses (este periodo de seguimiento varía de un paciente a otro).

Estas muestras fueron extraídas con EMAG® y amplificadas en Applied Biosystems 7500 Fast Dx con el kit TTV R-GENE® y en Applied Biosystems 7500 o 7500 Fast con el método de PCR interno.

Los resultados se presentan en los siguientes párrafos para cada combinación de tipo de población (pacientes con SOT y HSCT y sujetos sanos) y tipo de muestra (sangre total y plasma) por separado.

12.6.1. Monitorización de pacientes

La cinética de la carga viral de TTV (en log₁₀ cp/mL) comunicada con el kit TTV R-GENE® se comparó con el reportado con el método de PCR interno para demostrar la capacidad de la prueba para realizar un seguimiento de la carga viral a lo largo del tiempo para cada población.

Los resultados obtenidos para un subconjunto de pacientes (8 por cohorte) se presentan a continuación:

• Muestras de plasma de HSCT

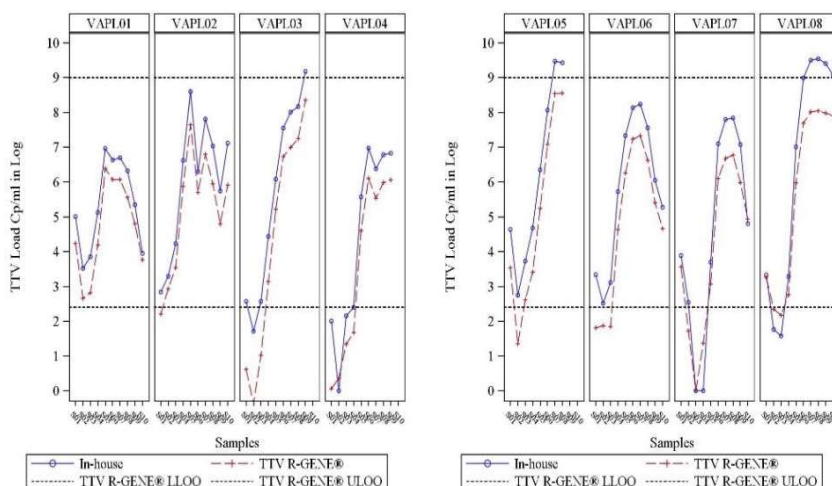


Figura 1: Monitorización de la carga viral de TTV de pacientes con HSCT en plasma a lo largo del tiempo (alrededor de seis meses)

• Muestras de sangre total de HSCT

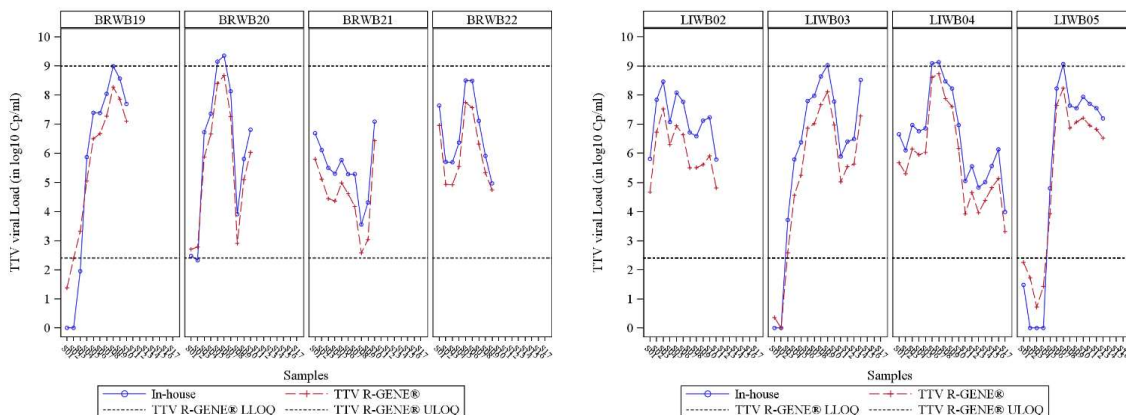


Figura 2: Monitorización de la carga viral de TTV de los pacientes con HSCT en sangre total a lo largo del tiempo (alrededor de un año)

• **Muestras de plasma de SOT**

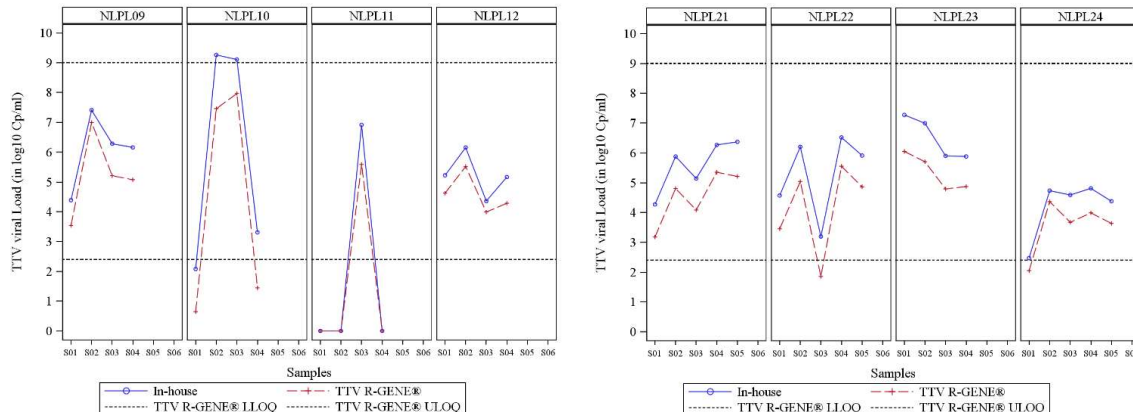


Figura 3: Monitorización de la carga viral de TTV de pacientes con SOT en plasma a lo largo del tiempo (alrededor de seis meses)

• **Muestras de sangre total de SOT**

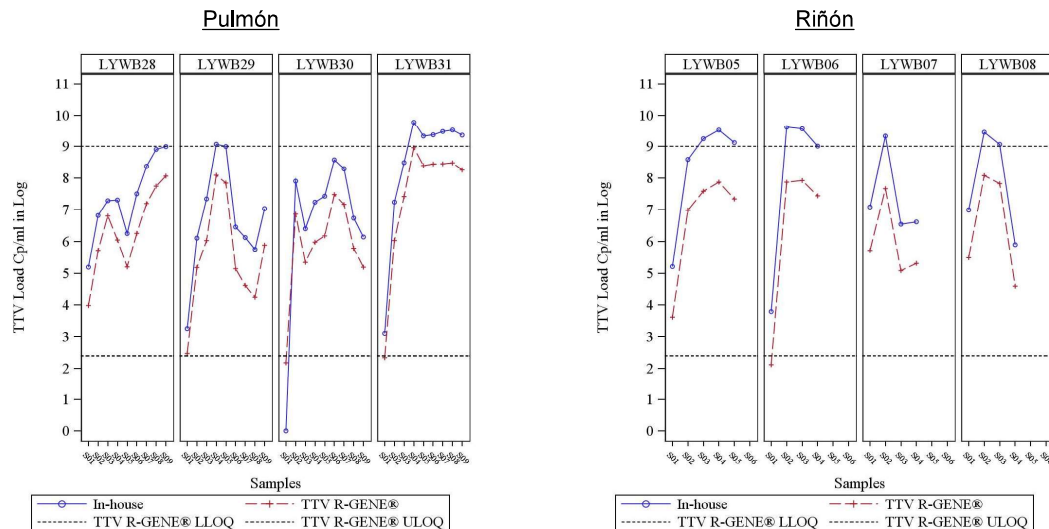


Figura 4: Monitorización de la carga viral de TTV de los pacientes con SOT en sangre total a lo largo del tiempo (alrededor de un año)

Para cada población y tipo de muestra, la cinética de la carga viral de TTV obtenida con el kit TTV R-GENE® es comparable con la obtenida con la PCR interna.

12.6.2. Diferencia clínica

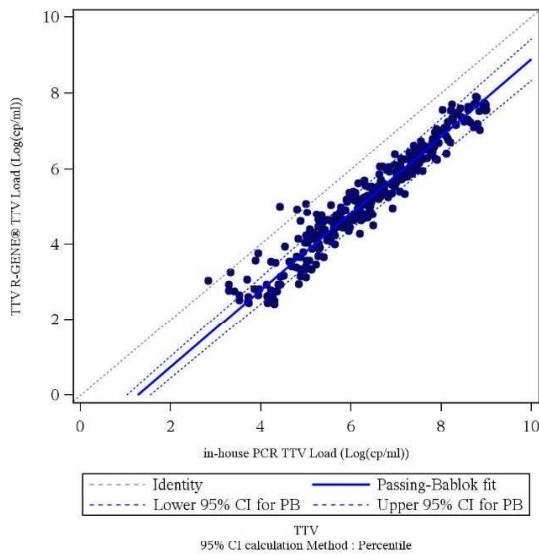
Se realizó estudio de métodos de comparación entre el kit TTV R-GENE® y la PCR interna sobre los valores de carga viral de TTV en log₁₀ cp/mL según las recomendaciones de CLSI EP09-A3.

La capacidad del kit TTV R-GENE® para realizar la cuantificación de la carga viral del TTV se evaluó mediante la valoración de la diferencia clínica (diferencia media) entre ambos métodos y, hasta el momento, para asegurar que esta diferencia es constante a lo largo del rango de medición (LLOQ: 250 cp/mL - ULOQ: 10⁹ cp/mL).

Los resultados obtenidos para cada cohorte se presentan a continuación:

• **Muestras de plasma de HSCT**

De las 406 muestras analizadas para esta cohorte, los resultados obtenidos de las 311 muestras positivas en el rango de medición declarado se presentan a continuación:



Ecuación de regresión lineal de Passing-Bablok:

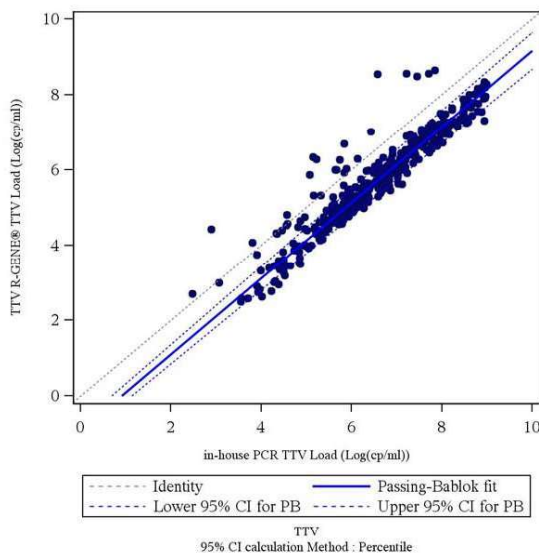
$$Y = 1,0190x - 1,2946$$

Coefficiente de correlación: $r = 0,9628$

La media de las diferencias entre ambos métodos es $-1,1 \log_{10}$ cp/mL en el rango de medición indicado para el kit TTV R-GENE®.

• Muestras de sangre total de HSCT

De las 491 muestras analizadas para esta cohorte, los resultados obtenidos de las 379 muestras positivas en el rango de medición declarado se presentan a continuación:



Ecuación de regresión lineal de Passing-Bablok:

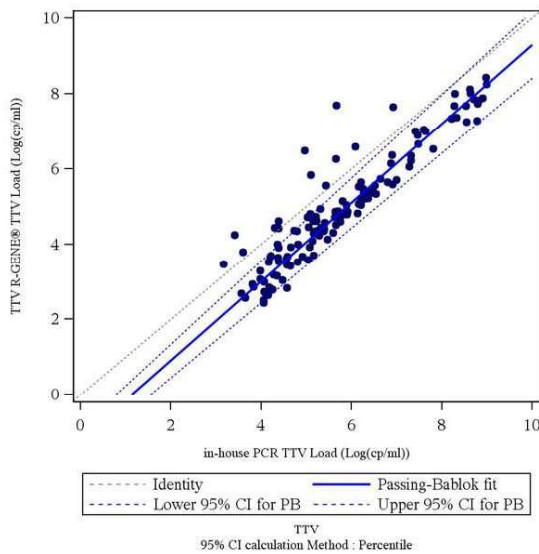
$$Y = 1,0084x - 0,9208$$

Coefficiente de correlación: $r = 0,9369$

La media de las diferencias entre ambos métodos es $-0,8 \log_{10}$ cp/mL en el rango de medición indicado para el kit TTV R-GENE®.

• Muestras de plasma de SOT

De las 193 muestras analizadas para esta cohorte, los resultados obtenidos de las 130 muestras positivas en el rango de medición declarado se presentan a continuación:



Ecuación de regresión lineal de Passing-Bablok:

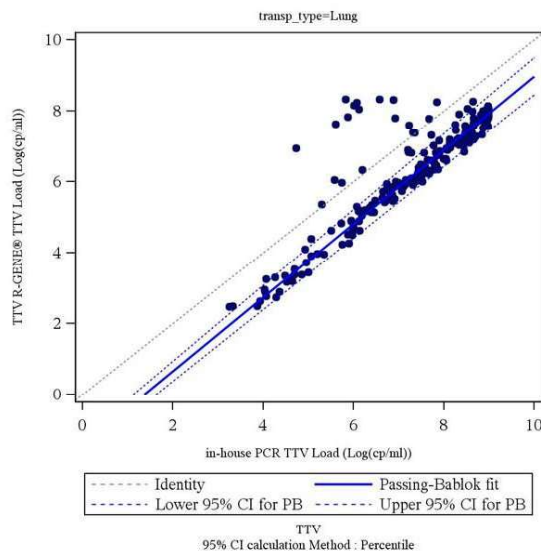
$$Y = 1,0471x - 1,1820$$

Coefficiente de correlación: $r = 0,9238$

La media de las diferencias entre ambos métodos es $-0,8 \log_{10} \text{ cp/mL}$ en el rango de medición indicado para el kit TTV R-GENE®.

- **Muestras de sangre total de SOT**

De los 446 muestras analizadas para esta cohorte, los resultados obtenidos de las 289 muestras positivas (92 riñón + 197 pulmón) en el rango de medición declarado se presentan a continuación:



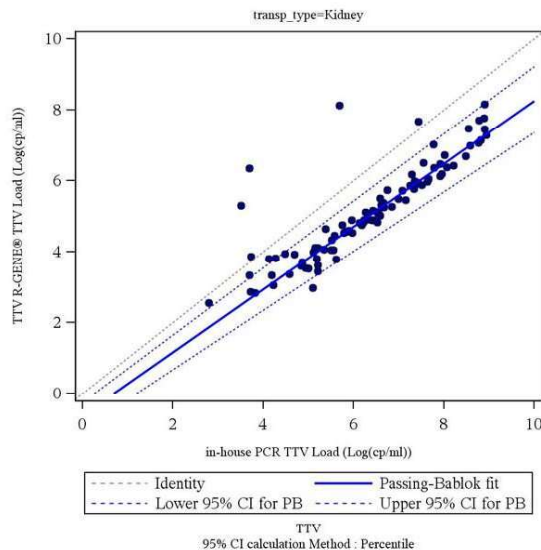
Muestras de sangre total de SOT - Pulmón

Ecuación de regresión lineal de Passing-Bablok:

$$Y = 1,0379x - 1,4185$$

Coefficiente de correlación: $r = 0,8624$

La media de las diferencias entre ambos métodos es $-0,9 \log_{10}$ cp/mL en el rango de medición indicado para el kit TTV R-GENE®.



Muestras de sangre total de SOT - Riñón

Ecuación de regresión lineal de Passing-Bablok:

$$Y = 0,8855x - 0,6075$$

Coefficiente de correlación: $r = 0,8625$

La media de las diferencias entre ambos métodos es $-1,2 \log_{10}$ cp/mL en el rango de medición indicado para el kit TTV R-GENE®.

Para cada población y tipo de muestras, la dispersión de los valores, la ecuación de la línea de regresión de Passing & Bablok y el coeficiente de correlación muestran una buena correlación entre el kit TTV R-GENE® y la PCR interna en todo el rango de medición.

Durante el estudio del ensayo clínico, observamos para algunas muestras diferencias cuantitativas de la carga viral del TTV entre ambos métodos de PCR (ARGENE® e interno). Estas muestras mostraron una carga viral positiva del virus Torque Teno Mini (TTMV). El kit TTV R-GENE® detecta la presencia de algunas especies de TTMV debido a la similitud genómica entre el virus Torque Teno Mini (TTMV) y el virus Torque Teno (TTV).

12.6.3. Comparación intra e interindividual a lo largo del tiempo (TTV como ayuda para evaluar el estado inmunitario)

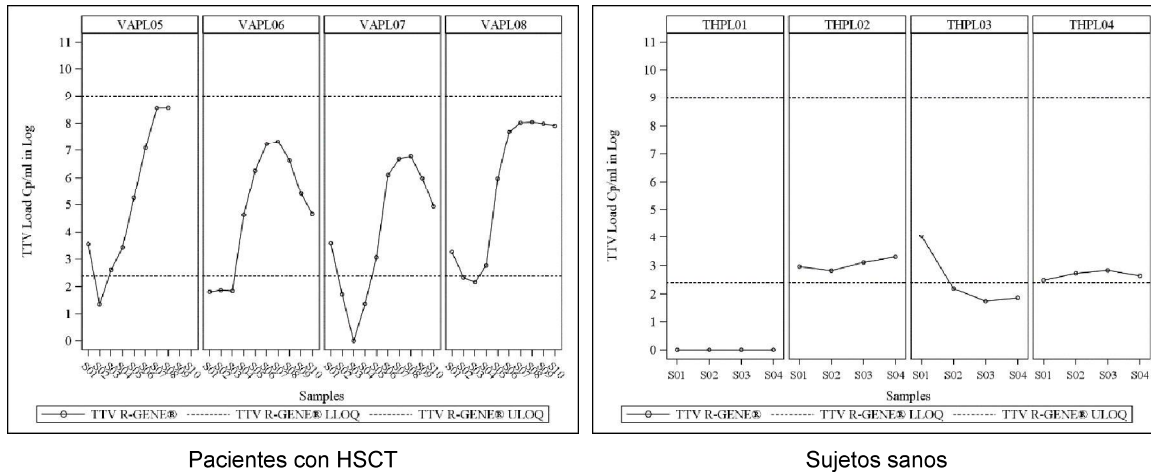
La capacidad de la carga viral de TTV medida con el kit TTV R-GENE® para ayudar a valorar el estado inmunitario se evaluó mediante un análisis de variabilidad intra e interindividual.

Los resultados obtenidos para pacientes con HSCT y SOT en plasma se presentan a continuación:

• HSCT

Se comparó la cinética del seguimiento de pacientes con HSCT y sujetos sanos.

Los resultados de 4 personas de cada cohorte se presentan a continuación como ejemplos:

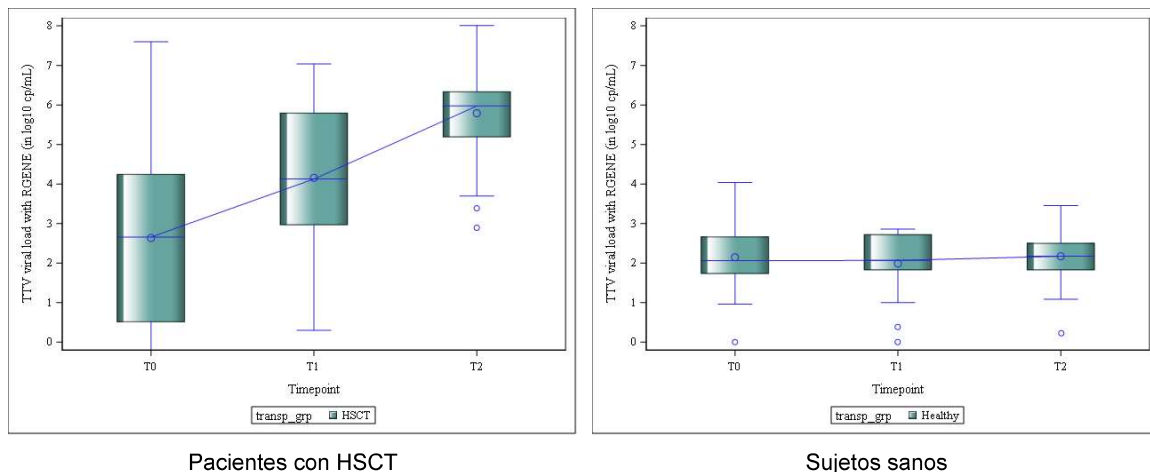


Los pacientes con HSCT fueron seguidos durante un promedio de 168 días y los sujetos sanos durante 158 días.

Se seleccionaron puntos temporales comunes de cohortes de pacientes con HSCT y de sujetos sanos para comparar la evolución de la carga viral del TTV:

- T0 = Línea de base (corresponde a la fecha del injerto para los pacientes de HSCT o a los días inmediatamente anteriores a la fecha del injerto, y corresponde a la primera medición del TTV para los sujetos sanos)
- T1 = Línea de base + 45 días (± 15 días)
- T2 = Línea de base + 100 días (± 20 días)

Los resultados obtenidos se presentan a continuación:



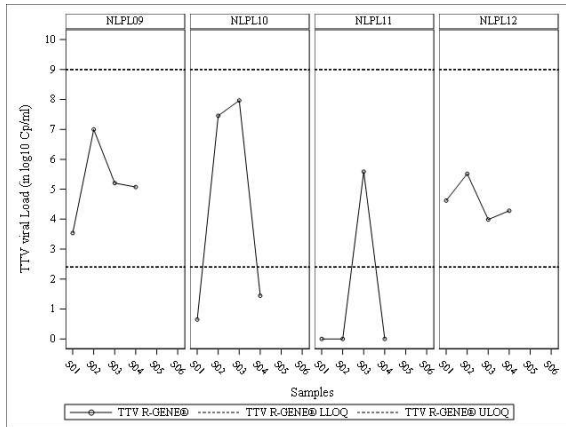
La media de las diferencias en el valor absoluto de la carga viral de TTV para sujetos sanos entre T0 y T1 y entre T0 y T2 es 0,4 $\log_{10}$ cp/mL. Para los pacientes trasplantados, la media de las diferencias en el valor absoluto de la carga viral de TTV varía de 2,3 $\log_{10}$ cp/mL entre T0 y T1 y 3,2 $\log_{10}$ cp/mL entre T0 y T2.

La evolución de la carga de TTV desde la línea de base es significativamente mayor para los pacientes que se han sometido a un trasplante de células madre hematopoyéticas en comparación con los sujetos sanos, ya sea en T1 o T2.

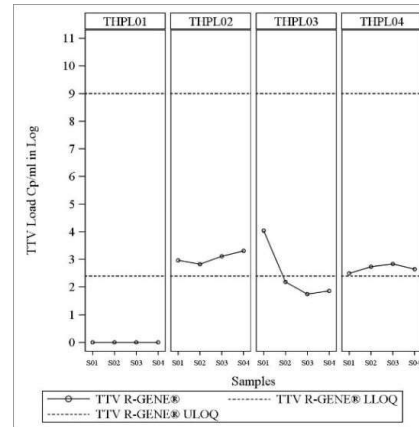
• SOT

Se comparó la cinética del seguimiento de pacientes con SOT y sujetos sanos.

Los resultados de 4 personas de cada cohorte se presentan a continuación como ejemplos:



Pacientes con SOT



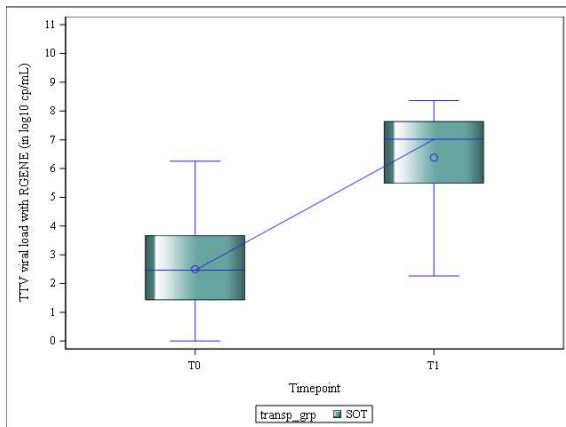
Sujetos sanos

Los pacientes con SOT fueron seguidos durante un promedio de 357 días y los sujetos sanos durante 158 días.

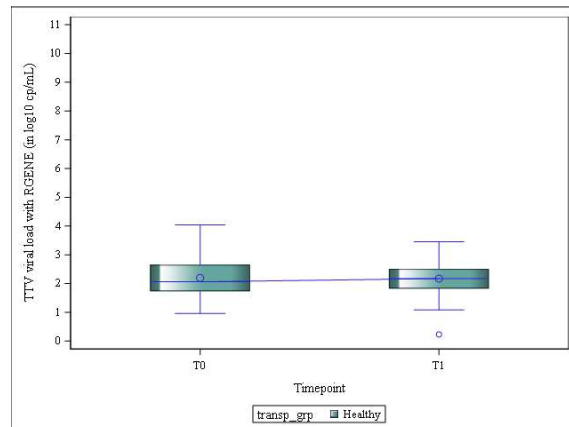
Se seleccionaron puntos temporales comunes de cohortes de pacientes con SOT y de sujetos sanos para comparar la evolución de la carga viral del TTV:

- T0 = Línea de base (corresponde a la fecha del injerto para los pacientes de SOT o a los días inmediatamente anteriores a la fecha del injerto, y corresponde a la primera medición del TTV para los sujetos sanos)
- T1 = Línea de base + 100 días (± 20 días)

Los resultados obtenidos se presentan a continuación:



Pacientes con SOT



Sujetos sanos

La media de las diferencias en el valor absoluto de la carga viral de TTV para sujetos sanos entre T0 y T1 es 0,4 $\log_{10}$ cp/mL. Para los pacientes trasplantados, la media de las diferencias en el valor absoluto de la carga viral de TTV varía de 3,9 $\log_{10}$ cp/mL entre T0 y T1.

La evolución de la carga de TTV en T1 desde la línea de base es significativamente mayor para los pacientes que se han sometido a un trasplante de órganos sólidos en comparación con los sujetos sanos.

13. Solución de problemas

13.1. Patógeno no detectado o cuantificación infravalorada en muestras positivas

Causas posibles	Soluciones
Alteración de la premezcla de la amplificación.	• Siga las instrucciones del apartado <i>CONTENIDO DEL KIT Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO</i>. Las premezclas no deben descongelarse más del número de veces indicado en esta sección. • Compruebe que las premezclas de amplificación, los estándares de cuantificación y el control de sensibilidad se han vuelto a poner a una temperatura de -15 °C/-31 °C inmediatamente después de cada uso. • Compruebe que las premezclas de amplificación, los estándares de cuantificación y el control de sensibilidad hayan sido descongelados a +18 °C/+25 °C. • Utilice un bloque frío (+2 °C/+8 °C) a la hora de preparar y dispensar las premezclas.
Problema con las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de muestras en el laboratorio.	• Siga las instrucciones de la sección <i>PREPARACIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS</i>, donde se definen las condiciones óptimas (temperatura, tiempo) del transporte y el almacenamiento. • Está prohibido utilizar tubos con heparina para el análisis de muestras de sangre con kits ARGENE®. Utilizar solamente tubos con EDTA. • Los resultados de los tubos de recogida de sangre pueden variar de un fabricante a otro en función de los aditivos y materiales empleados. • Compruebe el periodo transcurrido entre la recogida de la muestra y su análisis.
Problema con las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad de los kits ARGENE®.	• Siga las instrucciones del apartado <i>CONTENIDO DEL KIT Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO</i>. Es necesario almacenar los kits ARGENE® a una temperatura entre -15 °C y -31 °C y protegidos de la luz.
Problema de extracción.	• Comprobar que las muestras hayan sido correctamente homogeneizadas antes de proceder con la extracción. • Comprobar el material y los protocolos utilizados para la extracción de las muestras. El rendimiento del kit solo está validado para las extracciones que se describen en la sección <i>PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS</i>. • Efectúe siempre las tareas de mantenimiento preventivo de los dispositivos para extracción automatizada conforme a las recomendaciones del fabricante.
Error en la distribución de reactivos y muestras.	• Comprobar el calibrado de las pipetas. • Comprobar que los volúmenes de los reactivos y de las muestras sean los correctos. • Compruebe que los reactivos y las muestras estén totalmente homogeneizados antes de dispensarlos en tubos.
Error de programación.	• Compruebe todos los parámetros de programación introducidos (canal de detección, modo, número de ciclos, temperatura, tiempos, volumen de reacción). Hay hojas de programación disponibles bajo petición. Póngase en contacto con el representante local de bioMérieux. • Revisar todos los pasos relativos a la introducción de las muestras. • Para las detecciones cuantitativas, compruebe las concentraciones registradas para los estándares de cuantificación.

Causas posibles	Soluciones
Problema de amplificación.	- Comprobar la eficiencia térmica del instrumento de PCR según el procedimiento recomendado por el fabricante. - Realice siempre un mantenimiento preventivo del aparato de PCR en tiempo real respetando las recomendaciones del fabricante. - Compruebe que los tubos estén cerrados y el anillo de fijación del carrusel Rotor-Gene Q esté correctamente bloqueado. - Si utiliza placas, compruebe la colocación y la adherencia de la cinta de sellado. - Compruebe que los desechables utilizados sean los recomendados en la sección <i>PROTOCOLO DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL</i>.
Error en el análisis de los datos.	- Compruebe el ajuste de la línea de umbral. - Si va a utilizar Rotor-Gene Q para la amplificación, en caso de duda (curvas "deslizantes"), utilice datos en bruto. Hay hojas de programación disponibles bajo petición. Póngase en contacto con el representante local de bioMérieux. - Si el análisis se basa en la importación de un intervalo, compruebe que el intervalo importado sea válido: - Al crear la curva patrón, compruebe que se cumplan todos los criterios necesarios para la importación posterior de la curva (consulte la sección <i>VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</i>). - Solo es posible importar la curva patrón mediante QS3 si se cumplen dos condiciones: - Si los kits ARGENE® tienen el mismo número de lote. - Si la curva patrón tiene menos de tres meses de antigüedad.
Error en la interpretación de los resultados.	- Compruebe que se hayan cumplido TODOS los criterios de validación (consulte la sección <i>VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS</i>). - Con Applied Biosystems: - Compruebe que se haya tenido en cuenta la ausencia de fluorocromos de referencia (se debe haber seleccionado NONE en el campo PASSIVE REFERENCE). Nota: Si utiliza simultáneamente kits que contengan y no contengan ROX, realice los dos tipos de análisis (con y sin referencia pasiva) que sean adecuados para cada situación/kit. - Compruebe que los resultados obtenidos se hayan corregido mediante un archivo de compensación de color presente en el instrumento LightCycler 480. - Compare el resultado del control de extracción + inhibición (ICsample) para la muestra considerada sospechosa con el resultado del control de extracción + inhibición de referencia (ICW0) (consulte la sección <i>VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS</i>). Si es necesario, diluya la muestra.

13.2. Patógeno detectado en muestras caracterizadas como negativas o cuantificación sobrevalorada del patógeno

Causas posibles	Soluciones
Contaminación durante el experimento.	- Siga todas las recomendaciones del apartado <i>PRECAUCIONES DE UTILIZACIÓN</i>. - Descontamine los bloques fríos con, por ejemplo, luz UV. - Respete todas las recomendaciones del fabricante para el mantenimiento de los instrumentos de extracción y amplificación. - Solo el personal cualificado debe manejar los kits ARGENE® y el material desechable.
Error en la distribución de reactivos y muestras.	- Comprobar el calibrado de las pipetas. - Compruebe que se distribuyan los volúmenes correctos. - Compruebe que los reactivos y las muestras estén totalmente homogeneizados antes de dispensarlos en tubos.
Error de programación.	- Compruebe todos los parámetros de programación introducidos (canal de detección, modo, número de ciclos, temperatura, tiempos, volumen de reacción). Hay hojas de programación disponibles bajo petición. Póngase en contacto con el representante local de bioMérieux. - Revisar todos los pasos relativos a la introducción de las muestras. - Para las detecciones cuantitativas, compruebe las concentraciones registradas para los estándares de cuantificación.
Error en el análisis de los datos.	- Compruebe el ajuste de la línea de umbral. - Si va a utilizar Rotor-Gene Q para la amplificación, en caso de duda (curvas "deslizantes"), utilice datos en bruto. Hay hojas de programación disponibles bajo petición. Póngase en contacto con el representante local de bioMérieux. - Si el análisis se basa en la importación de un intervalo, compruebe que el intervalo importado sea válido: - Al crear la curva patrón, compruebe que se cumplan todos los criterios necesarios para la importación posterior de la curva (consulte la sección <i>VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</i>). - Solo es posible importar la curva patrón mediante QS3 si se cumplen dos condiciones: - Si los kits ARGENE® tienen el mismo número de lote. - Si la curva patrón tiene menos de tres meses de antigüedad.

Causas posibles	Soluciones
Error en la interpretación de los resultados.	• Compruebe que se hayan cumplido TODOs los criterios de validación (consulte la sección VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS). • Con Applied Biosystems: ◦ Compruebe que se haya tenido en cuenta la ausencia de fluorocromos de referencia (se debe haber seleccionado NONE en el campo PASSIVE REFERENCE). Nota: Si utiliza simultáneamente kits que contengan y no contengan ROX, realice los dos tipos de análisis (con y sin referencia pasiva) que sean adecuados para cada situación/kit. • Compruebe que los resultados obtenidos se hayan corregido mediante un archivo de compensación de color (FAM y HEX) presente en el instrumento LightCycler 480. • Compare el resultado del control de extracción + inhibición (ICsample) para la muestra considerada sospechosa con el resultado del control de extracción + inhibición de referencia (ICW0) (consulte la sección VALIDACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS). Si es necesario, diluya la muestra. • Si la cuantificación está por encima del límite superior, diluya la muestra para obtener un resultado dentro del intervalo de cuantificación.

13.3. Todas las muestras están inhibidas

Causas posibles	Soluciones
Problema de extracción.	• Comprobar que las muestras hayan sido correctamente homogeneizadas antes de proceder con la extracción. • Comprobar el material y los protocolos utilizados para la extracción de las muestras. • El rendimiento del kit solo está validado para las extracciones que se describen en la sección PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS. • Efectúe siempre las tareas de mantenimiento preventivo de los dispositivos para extracción automatizada conforme a las recomendaciones del fabricante.
El ICW0 no procede de la misma serie de extracción.	• Compruebe que el IC extraído con ICW0 sea del mismo lote que el IC extraído con la muestra analizada. • Cada serie de extracción deberá incluir su propio ICW0.

14. Bibliografía

- Están disponibles pautas de programación bajo petición. Póngase en contacto con el representante local de bioMérieux.
- Protocolo detallado "Worksheet easyMAG® Viral Whole Blood extraction protocol" de BIOMÉRIEUX.

Publicaciones:

1. Doberer K, Schiemann M, Strassl R, Haupenthal F, Dermuth F, Görzer I, Eskandary F, Reindl-Schwaighofer R, Kikić Ž, Puchhammer-Stöckl E, Böhmig GA, Bond G. Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection

- in kidney transplant recipients-A prospective observational trial. *Am J Transplant*. 2020 Aug;20(8):2081-2090. doi: 10.1111/ajt.15810. Epub 2020 Mar 8.
2. Pradier A, Masouridi-Levrat S, Bosshard C, Dantin C, Vu DL, Zanella MC, Boely E, Tapparel C, Kaiser L, Chalandon Y, Simonetta F, Roosnek E. Torque Teno Virus as a Potential Biomarker for Complications and Survival After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020 May 27;11:998. doi: 10.3389/fimmu.2020.00998. eCollection 2020.
 3. Focosi D, Spezia PG, Macera L, Salvadori S, Navarro D, Lanza M, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jan 20:S1198-743X(20)30036-7. doi: 10.1016/j.cmi.2020.01.011.
 4. Gore EJ, Gomes-Neto AW, Wang L, Bakker SJL, Niesters HGM, de Joode AAE, Verschuuren EAM, Westra J, Leer-Buter CV. Torquetenovirus Serum Load and Long-Term Outcomes in Renal Transplant Recipients. *J Clin Med*. 2020 Feb 6;9(2):440. doi: 10.3390/jcm9020440.
 5. Peker BO, Daloğlu AE, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Parkan ÖM, Akbaş H, Kintrup GT, Mutlu D, Küpesiz OA, Çolak D. Investigation of Torque Teno Virus (TTV) DNA as an immunological and virological marker in pediatric hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients. *Microb Pathog*. 2020 Jul 21;149:104397. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104397.
 6. Reza Hosseini O, Drabe CH, Sørensen SS, Rasmussen A, Perch M, Ostrowski SR, Nielsen SD. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2019 Jul;33(3):137-144.
 7. Solis M, Velay A, Gantner P, Bausson J, Filipputti A, Freitag R, Moulin B, Caillard S, Fafi-Kremer S. Torquetenovirus viremia for early prediction of graft rejection after kidney transplantation. *J Infect*. 2019 Jul;79(1):56-60.
 8. Strassl R, Doberer K, Rasoul-Rockenschaub S, Herkner H, Görzer I, Kläger JP, Schmidt R, Haslacher H, Schiemann M, Eskandary FA, Kikić Ž, Reindl-Schwaighofer R, Puchhammer-Stöckl E, Böhmig GA, Bond G. Torque Teno Virus for Risk Stratification of Acute Biopsy-Proven Alloreactivity in Kidney Transplant Recipients. *J Infect Dis*. 2019 May 24;219(12):1934-1939.
 9. Focosi D, Maggi F. Torque teno virus monitoring in transplantation: The quest for standardization. *Am J Transplant*. 2019 May;19(5):1599-1601.
 10. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Ruiz-Merlò T, Parra P, López-Medrano F, San Juan R, Polanco N, Andrés A, Navarro D, Aguado JM. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2019 Apr;19(4):1139-1149.
 11. Albert E, Solano C, Giménez E, Focosi D, Pérez A, Macera L, Piñana JL, Mateo EM, Boluda JCH, Maggi F, Navarro D. Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol*. 2019 Apr;208(2):253-258.
 12. Frye BC, Bierbaum S, Falcón V, Köhler TC, Gasplmayr M, Hettich I, Dürk T, Idzko M, Zissel G, Hengel H, Müller-Quernheim J. Kinetics of Torque Teno Virus-DNA Plasma Load Predict Rejection in Lung Transplant Recipients. *Transplantation*. 2019 Apr;103(4):815-822.
 13. Macera L, Spezia PG, Medici C, Rofi E, Del Re M, Focosi D, Mazzetti P, Navarro D, Antonelli G, Danesi R, Pistello M, Maggi F. Comparative evaluation of molecular methods for the quantitative measure of torquetenovirus viremia, the new surrogate marker of immune competence. *J Med Virol*. 2019 Apr 19.
 14. Ruiz P, Martínez-Picola M, Santana M, Muñoz J, Pérez-Del-Pulgar S, Koutsoudakis G, Sastre L, Colmenero J, Crespo G, Navasa M. Torque Teno Virus Is Associated With the State of Immune Suppression Early After Liver Transplantation. *Liver Transpl*. 2019 Feb;25(2):302-310.
 15. Maggi F, Focosi D, Statzu M, Bianco G, Costa C, Macera L, Spezia PG, Medici C, Albert E, Navarro D, Scagnolari C, Pistello M, Cavallo R, Antonelli G. Early Post-Transplant Torquetenovirus Viremia Predicts Cytomegalovirus Reactivations In Solid Organ Transplant Recipients. *Sci Rep*. 2018 Oct 19;8(1):15490.
 16. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, Kikić Ž, Gualdoni GA, Vossen MG, Rasoul-Rockenschaub S, Herkner H, Böhmig GA, Bond G. Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *J Infect Dis*. 2018 Sep 8;218(8):1191-1199.
 17. Kotton CN. Torque Teno Virus: Predictor of Infection After Solid Organ Transplant? *J Infect Dis*. 2018 Sep 8;218(8):1185-1187.
 18. Albert E, Torres I, Talaya A, Giménez E, Piñana JL, Hernández-Boluda JC, Focosi D, Macera L, Maggi F, Solano C, Navarro D. Kinetics of torque teno virus DNA load in saliva and plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2018 Sep;90(9):1438-1443.
 19. Kulifaj D, Durgueil-Larivière B, Meynier F, Munteanu E, Pichon N, Dubé M, Joannes M, Essig M, Hantz S, Barranger C, Alain S. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J Clin Virol*. 2018 Aug;105:118-127.

[Handwritten signature]
GABRIEL DEL CANTO
DNI: 27941903
A. PARRAS

20. Wohlfarth P, Leiner M, Schoergenhofer C, Hopfinger G, Goerzer I, Puchhammer-Stoeckl E, Rabitsch W. Torquetenovirus Dynamics and Immune Marker Properties in Patients Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Prospective Longitudinal Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Jan;24(1):194-199.
21. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Jul;22(7):589-93.
22. Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihăescu G. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch Virol*. 2015 Apr;160(4):893-908.

15. Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Límite de temperatura
	Fecha de caducidad
	Código de lote
	Consulte las instrucciones de uso
	Conservar protegido de la luz

16. Garantía limitada

bioMérieux garantiza el rendimiento del producto para el uso previsto declarado siempre que todos los procedimientos para el uso, el almacenamiento y la manipulación, la vida útil (en su caso) y las precauciones se sigan estrictamente como se detalla en las instrucciones de uso.

A excepción de lo expresamente establecido anteriormente, bioMérieux por la presente renuncia a todas las garantías, incluyendo cualquier garantía implícita de comerciabilidad y adecuación para un propósito o uso particular, y se exime de toda responsabilidad, ya sea directa, indirecta o consecuente, de cualquier uso del reactivo, software, instrumento y desechables (el "Sistema") distinto a lo que se indica en las instrucciones de uso.

17. Histórico de revisiones

Categoría de tipo de cambio

N/A	No aplica (primera modificación)
Corrección	Corrección de anomalías en la documentación
Cambio técnico	Adición, revisión y/o eliminación de información relativa al producto
Administrativo	Implementación de cambios no técnicos notables para el usuario

Nota: Los cambios menores de errores tipográficos, gramaticales y de formato no aparecen incluidos en el historial de revisiones.

Fecha de publicación	Versión	Tipo de cambio	Resumen de cambios
2021-04	053321-01	N/A	No aplica (primera modificación)
2022-02	053321-02	Cambio técnico	Amplificación y detección en tiempo real / Trazabilidad metrológica / Programación de termocicladores / Preparación de la amplificación / Análisis de datos sobre CFX96 y CFX Opus 96 / Validación de la serie de PCR
		Corrección	Estudio de rendimiento clínico
		Administrativo	Cumplimiento del Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro

BIOMÉRIEUX, el logotipo de BIOMÉRIEUX, ARGENE, easyMAG, EMAG, NUCLISENS y R-GENE son marcas utilizadas, depositadas y/o registradas pertenecientes a BIOMÉRIEUX o a cada una de sus filiales, o a cada una de sus sociedades.

Los demás nombres o marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

Por la presente, BIOMÉRIEUX no otorga ninguna patente general u otra licencia de ningún tipo.

Para los usuarios de la Unión Europea (Reglamento (UE) 2017/746) y de los países con requisitos similares: Si ocurriera un incidente grave durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, informe al fabricante o a su representante autorizado, así como a su autoridad nacional.

Ubicación del SSP (Summary of Safety and Performance (Resumen de seguridad y rendimiento)) después del lanzamiento de la Base de datos europea sobre dispositivos médicos/Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

ARGENE

ARGENE® TTV R-GENE®

REF 423414

IVD **CE** 0459

 90



-31°C  -15°C

 2024-10-10

LOT 1009667720

 2022-12-01

IC2 1 x 1 mL
R33 3 x 450 µL
W0 2 x 1.8 mL
QS1 1 x 300 µL
QS2 1 x 300 µL
QS3 1 x 300 µL

2171550
2182380
2165450
2174220
2174240
2174250

QS4 1 x 300 µL
SC 1 x 300 µL

2174260
2174270

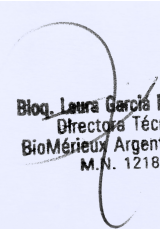
 (01)03573026611309
(17)241010
(10)1009667720

 bioMérieux SA
376, Chemin de l'Orme
69280 Marcy-l'Etoile - France

 053321-02
resourcecenter.biomerieux.com

052801-01


GABRIEL DELGADO
DNI 27941903
APOSEADO


Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE® W0

Water
(Molecular Grade)
1.8 mL

2022-07-10

LOT 1858040

-31°C
-15°C
bioMérieux SA

052803_01



Handwritten signature
GABRIEL DE LENA
DNI 27941903
A. PARRAS

Handwritten signature
Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE®
REF 423414 SC
TTV Sensitivity control
300 µL 1 copy/µL
2022-07-10
LOT 1858090
IVD -15°C
-31°C
062805-01
bioMérieux SA

[Signature]
GABRIEL DE LENA
DNI 27941903
A. PARRAS

[Signature]
Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE®
REF 423414 R33
TTV and IC2 Amplification Premix
450 µL
2022-07-10
LOT 1858100
IVD -31°C
-15°C
062806-01
bioMérieux SA

[Signature]
GABRIEL DE LEON
DNI 27941903
A. PARRAS

[Signature]
Bla. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE®
REF 423414 QS4
TTV Quantification Standard 4
300 µL 5 copies/µL
2022-07-10
LOT 1858080
IVD -15°C
-31°C
052805-01
bioMérieux SA

[Signature]
GABRIEL DE LEON
DNI 27941903
A. PARRAS

[Signature]
Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE®

REF 423414 QS3

TTV Quantification Standard 3
300 µL 50 copies/µL

2022-07-10

LOT 1858070

IVD -15°C
-31°C



052305-01

bioMérieux SA

Handwritten signature
GABRIEL DE LENA
DNI 27941903
A. PARRAS

Handwritten signature
Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE®
REF 423414 QS2
TTV Quantification Standard 2
300 µL 500 copies/µL
2022-07-10
LOT 1858060
IVD -15°C
-31°C
052805-01
bioMérieux SA

[Signature]
GABRIEL DE LEON
DNI 27941903
A. PARRAS

[Signature]
Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE®
REF 423414 QS1
TTV Quantification Standard 1
300 µL 5,000 copies/µL
2022-07-10
LOT 1058050
IVD -15°C
-31°C
052805-01
bioMérieux SA

[Signature]
GABRIEL DE LENA
DNI 27941903
A. PARRAS

[Signature]
Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE®
REF 423414 SC
TTV Sensitivity control
300 µL 1 copy/µL
2022-07-10
LOT 1858090
IVD -15°C
-31°C
062806-01
bioMérieux SA

[Signature]
GABRIEL DE LEON
DNI 27941903
A. PARRAS

[Signature]
Biol. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

ARGENE® IC2
Internal Control 2
1 mL
2022-07-10
LOT 1858030
-31°C -15°C
bioMérieux SA
042803-01

[Signature]
GABRIEL DE LENA
DNI 27941903
A. PARRAS

[Signature]
Bla. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187

Sobrerótulo 423414 ARGENE® TTV R-GENE®:

Lote:

Vencimiento:

Establecimiento Importador:

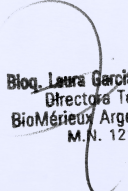
bioMérieux Argentina S.A. Nicolás Repetto 3676 7°Piso. CP 1636. Olivos.

Directora Técnica: Bioq. Laura García del Busto. MN: 12.187.

Autorizado por ANMAT: PM-1149-313.

Tel: (54-11) 5555-6800. E-mail: Consultas.AR@biomerieux.com


GABRIEL DE LEON
D.N. 27941903
A. P. B. R. A. D. S.


Bioq. Laura García Del Busto
Directora Técnica
BioMérieux Argentina S.A.
M.N. 12187



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
Año de la Grandeza Argentina

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Rótulo y manual de instrucciones - 70392

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 40 pagina/s.