




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

NOTICE of CHANGE dated 26/04/2023

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«HCV ELITe MGB[®] Kit» Ref. RTK601ING

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

- *Extension of use on the ELITe BeGenius instrument.*
- *Description of IC cut off value already adopted in the Assay protocol of the product (section "Diagnostic specificity")*

PLEASE NOTE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIE REVIEW VON DIESER IFU IST KOMPATIBLE MIT DER VORIGE VERSION VON DEM TEST-KIT



HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 4
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 4
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 4
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 5
ELITE INGENIUS®	página 7
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 7
PROCEDIMENTO	página 8
ELITE BEGENIUS®	página 16
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 16
PROCEDIMENTO	página 17
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITE INGENIUS® e ELITE BEGENIUS®	página 22
REFERÊNCIAS	página 37
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 37
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 38
SÍMBOLOS	página 41
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 42
ANEXO: GUIA DE INICIAÇÃO RÁPIDA	página A

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **HCV ELITE MGB® Kit** é um ensaio quantitativo de transcrição reversa e amplificação de ácidos nucleicos para a **deteção e quantificação do ARN** do vírus da Hepatite C (**HCV**) em amostras de ARN extraídas de amostras clínicas.

O ensaio é capaz de detetar o ARN do HCV pertencente aos genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

O ensaio é validado em associação com os sistemas **ELITE InGenius®** e **ELITE BeGenius®** a partir de amostras de plasma humano colhido em EDTA ou em ACD e amostras de soro.

O produto está previsto para utilização como auxiliar na gestão de indivíduos infetados com HCV e sujeitos a terapia antiviral, em conjunto com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais.

Este produto não se destina a ser usado como teste de rastreio da presença de HCV no sangue ou em produtos sanguíneos nem como um teste de diagnóstico para confirmar a presença de infeção por HCV.

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

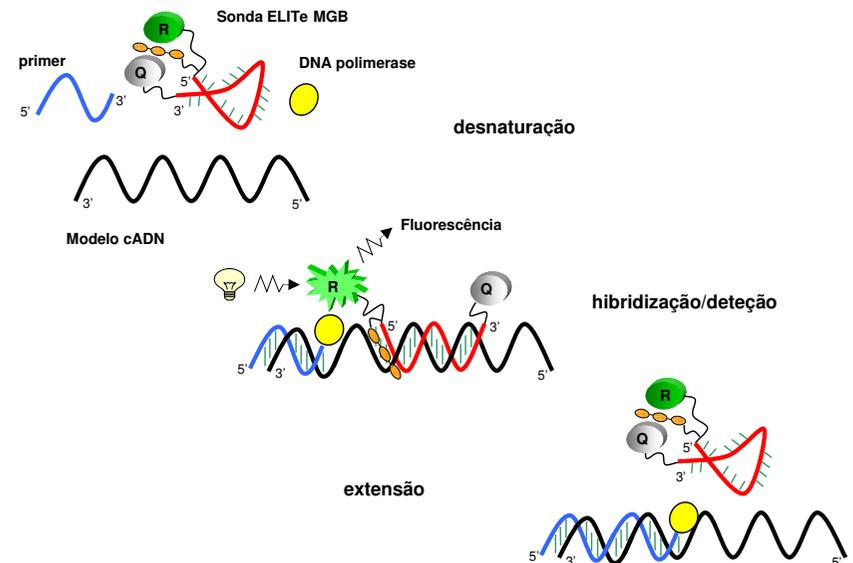
PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste na transcrição reversa e na reação de amplificação em tempo real (método de um passo) realizadas com o **ELITE InGenius** e and **ELITE BeGenius**, sistemas automáticos e integrados para extração, transcrição reversa, amplificação e deteção de ácidos nucleicos e interpretação de resultados.

Começando pelo ARN extraído pelo **ELITE InGenius** da amostra a ser testada, a HCV PCR Mix completa realiza uma reação de transcrição reversa e amplificação específica para a região 5' UTR do HCV e para uma região do ARN genómico do fago MS2 (Controlo Interno exógeno da extração e inibição).

A sonda específica do HCV com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada por fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do HCV. A sonda específica do Controlo Interno com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada por fluoróforo AP525, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do Controlo Interno. À medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta, a emissão de fluorescência aumenta e é medida e registada pelo instrumento. O processamento dos dados determina a presença e o título do ARN do HCV na amostra.

Na imagem seguinte é resumidamente mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia ELITE MGB.



HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

DESCRIÇÃO DO PRODUTOO produto **Kit HCV ELiTe MGB** fornece os seguintes componentes:

- Kit HCV ELiTe MGB**

Este componente fornece os seguintes dois subcomponentes:

- **“Mistura HCV PCR”**, uma mistura otimizada e estabilizada de oligonucleótidos e reagentes para transcrição reversa e amplificação em tempo real, pré-aliquotada em **quatro tubos de teste** (tampa BRANCA). Cada tubo contém **600 µL** de solução, suficiente para **24 testes** (processamento de, pelo menos, 5 amostras por sessão) em associação com o **ELiTe InGenius** e o **ELiTe BeGenius**.

Os primários e a sonda para o HCV (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado por fluoróforo FAM e extinto por uma fração não fluorescente Eclipse) são específicos da região 5' UTR do HCV. O sinal do HCV é detetado pelo Canal 1 (HCV) do **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius**.Os primários e a sonda para o Controlo Interno (estabilizado pelo grupo MGB®, etiquetado por fluoróforo AP525 e extinto por uma fração não fluorescente Eclipse) são específicos para uma região do ARN genómico fago **MS2**. O sinal do Controlo Interno é detetado pelo Canal 2 (CI) do sistema **ELiTe InGenius** e o **ELiTe BeGenius**.

A mistura de reação fornece também o tampão, cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleotídicos e a enzima de polimerase de ADN com capacidade de arranque a quente.

- **“RT EnzymeMix”**, uma mistura otimizada e estabilizada de enzimas para transcrição reversa, pré-aliquotada em **dois tubos de teste** (tampa com inserção PRETA). Cada tubo contém **20 µL** de solução, suficiente para **48 testes** (processamento de, pelo menos, 5 amostras por sessão) em associação com o **ELiTe InGenius** e o **ELiTe BeGenius**.

Os dois subcomponentes são suficientes para **96 testes em associação** com os sistemas **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius**, com recurso, respetivamente, a 20 µL e 0,3 µL para reação.

- HCV ELiTe Standard**

Este componente fornece os subcomponentes **“HCV Q-PCR Standard”**, quatro soluções estabilizadas de ADN de plasmídeo a um **título conhecido**, cada aliqotada **num tubo de testes pronto a usar**. Cada tubo contém **160 µL** de solução, suficiente para **2 sessões**. O ADN de plasmídeo contém a região 5' UTR do HCV. A deteção e quantificação do ADN do HCV como resultado da análise pelo componente do **HCV ELiTe MGB Mix** em associação com os instrumentos **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** permite calcular a curva de standard do sistema (lote do produto e instrumento) para quantificação de HCV.A concentração de ADN de plasmídeo em cópias/mL foi determinada por medição da absorção por espectrofotómetro. Esta concentração de ADN de plasmídeo estava relacionada com a "6.^a Norma internacional da OMS para HCV" (NIBSC, RU, código 18/184) por um fator de conversão para permitir o cálculo da concentração em Unidades internacionais/mL (IU/mL).O componente é suficiente para **2 sessões de análise separadas em associação com o ELiTe InGenius** e o **ELiTe BeGenius**, com recurso a 20 µL por reação.

- HCV - ELiTe Positive Control**

Este componente fornece o subcomponente **“Controlo positivo HCV”**, uma solução estabilizada de ADN de plasmídeo a um **título conhecido**, aliqotada em **dois tubos de teste prontos a usar**. Cada tubo de teste contém **160 µL** de solução, suficiente para **4 sessões**. O ADN de plasmídeo contém a região 5' UTR do HCV. A deteção e quantificação do ADN alvo, como resultado da análise com o componente do **HCV ELiTe MGB Mix** em associação com os instrumentos **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** permite validar o sistema (lote do produto e instrumento) para deteção e quantificação de HCV.O componente é suficiente para **8 sessões de análise separadas em associação com o ELiTe InGenius** e o **ELiTe BeGenius**, com recurso a 20 µL por reação.

- Controlo interno do HCV**

Este componente fornece o subcomponente **“CPE HCV”**, uma solução estabilizada de ARN genómico de MS2, aliqotada em **oito tubos de teste prontos a usar**. Cada tubo contém **160 µL** de solução, suficiente para **12 testes** (processamento de, pelo menos, 2 amostras por sessão). O ARN genómico de MS2 é utilizado como modelo de Controlo Interno exógeno. A deteção do cADN de MS2, como resultado da análise com o componente do **HCV ELiTe MGB Mix** em associação com os instrumentos **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** permite validar os resultados de amostras negativas para HCV.**HCV ELiTe MGB® Kit**

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

O componente é suficiente para **96 testes em associação com o ELiTe InGenius** e o **ELiTe BeGenius**, com recurso a 10 µL para extração.**MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO**

Componente	Subcomponente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
HCV ELiTe MGB Mix ref. RTS601ING	HCV PCR Mix ref. RTS601ING	mistura de reagentes para transcrição reversa e amplificação em tempo real no tubo com tampa BRANCA	4 x 600 µL	-
	RT EnzymeMix ref. RTS003-RT	Transcriptase reversa no tubo com tampa com inserção PRETA	2 x 20 µL	-
HCV ELiTe Standard ref. STD601ING	HCV Q-PCR Standard 10 ⁵ ref. STD601ING-5	solução de plasmídeo no tubo com tampa VERMELHA	1 x 160 µL	-
	HCV Q-PCR Standard 10 ⁴ ref. STD601ING-4	solução de plasmídeo no tubo com tampa AZUL	1 x 160 µL	
	HCV Q-PCR Standard 10 ³ ref. STD601ING-3	solução de plasmídeo no tubo com tampa VERDE	1 x 160 µL	
	HCV Q-PCR Standard 10 ² ref. STD601ING-2	solução de plasmídeo no tubo com tampa AMARELA	1 x 160 µL	
HCV - ELiTe Positive Control ref. CTR601ING	HCV Positive Control ref. CTR601ING	Solução de plasmídeo no tubo com tampa PRETA	2 x 160 µL	-
HCV Internal Control ref. CPE601ING	HCV CPE ref. CPE601ING	Solução de ADNs de plasmídeo e ARN genómico de MS2 no tubo com tampa NEUTRA	8 x 160 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Exaustor de fluxo de ar laminar.
- Luvas sem pó de nitrilo descartáveis ou material semelhante.
- Misturador de vórtice.
- Microcentrifugadora de bancada (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas e pontas estéreis com filtro de aerossol ou pontas de deslocação positiva estéreis (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubo Sarstedt de 2,0 mL contornado e de tampa de rosca (Sarstedt Ref. 72.694.005).
- Água de qualidade para biologia molecular.

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOSOs reagentes para extração do ARN das amostras a serem analisadas e os consumíveis **não** estão incluídos neste produto.Para a extração de ácidos nucleicos automática, transcrição reversa, amplificação em tempo real e interpretação dos resultados das amostras a serem analisadas, são necessários o instrumento **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** (ELiTechGroup S.p.A., EG SpA, ref. INT030) e os seguintes **protocolos de ensaio** específicos (EG SpA):

- parâmetros para amplificação de calibradores «**HCV ELiTe_STD**»,
- parâmetros para amplificação de Positive Control «**HCV ELiTe_PC**»,
- parâmetros para amplificação de Negative Control «**HCV ELiTe_PC**»,
- parâmetros para amostras de Plasma a serem analisadas «**HCV ELiTe_PL_600_50**»,
- parâmetros para amostras de Soro a serem analisadas «**HCV ELiTe_Se_600_50**»

Com o instrumento «**ELiTe InGenius**» são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração «**ELiTe InGenius® SP 1000**» (EG SpA, ref. INT033SP1000),

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

- consumíveis para extração «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (EG SpA, ref.ª INT032CS),
- cartuchos de amplificação «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (EG SpA, ref.ª INT035PCR),
- pontas «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, EUA, ref.ª TF-350-L-R-S),
- caixas «**ELITe InGenius® Waste Box**» (EG SpA, ref.ª F2102-000).

Para a extração de ácidos nucleicos e a análise da amostra com o «**ELITe BeGenius**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT040) são necessários os seguintes **protocolos de ensaio** (ELITechGroup S.p.A.):

- parâmetros para amplificação de calibradores «**HCV ELITe_Be_STD**»,
- parâmetros para amplificação de Positive Control «**HCV ELITe_Be_PC**»,
- parâmetros para amplificação de Negative Control «**HCV ELITe_Be_NC**»,
- parâmetros para amostras de Plasma a serem analisadas «**HCV ELITe_Be_PL_600_50**»,
- parâmetros para amostras de Soro a serem analisadas «**HCV ELITe_Be_Se_600_50**».

Com o instrumento **ELITe BeGenius** são necessários os seguintes produtos genéricos:

- cartuchos de extração «**ELITe InGenius® SP 1000**» (EG SpA, ref.ª INT033SP1000),
- consumíveis para extração «**ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (EG SpA, ref.ª INT032CS),
- cartuchos de amplificação «**ELITe InGenius® PCR Cassette**» (EG SpA, ref.ª INT035PCR),
- pontas «**1000 µL Filter Tips Tecan**» (Tecan, Switzerland, ref. 30180118),
- caixas «**ELITe InGenius® Waste Box**» (EG SpA, ref.ª F2102-000).

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido exclusivamente para utilização *in vitro*.

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% ou em autoclave durante uma hora a 121 °C antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os resíduos devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Use vestuário e luvas de proteção adequados e proteja os olhos e o rosto.

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique produtos cosméticos nas áreas de trabalho.

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

Elimine os reagentes remanescentes e os desperdícios em conformidade com os regulamentos em vigor.

Leia atentamente todas as instruções fornecidas com o produto antes de efetuar o ensaio.

Durante a realização do ensaio, siga as instruções fornecidas com o produto.

Não utilize o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelo fabricante.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

São necessárias batas de laboratório, luvas e ferramentas para preparação da sessão de trabalho.

As amostras devem ser adequadas e, se possível, exclusivas para este tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas sob uma câmara de fluxo laminar. As pipetas usadas no manuseamento de amostras devem ser usadas exclusivamente para este fim específico. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a sessão devem ser preparados de forma a que possam ser usados numa único dia. As pipetas usadas no manuseamento dos reagentes devem ser usadas exclusivamente para este fim. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. As pontas usadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos de extração devem ser manuseados de modo a reduzir, tanto quanto possível, a dispersão para o ambiente, para evitar a possibilidade de contaminação.

As Cassetes PCR devem ser manuseadas de modo a evitar a difusão do produto de amplificação para o ambiente e a contaminação da amostra e do reagente.

Avisos e precauções específicos para os componentes**• Kit HCV ELITe MGB**

A **Mistura PCR do HCV** deve ser guardada a uma temperatura inferior a -20 °C num local escuro.

O **HCV PCR Mix** deve ser utilizado no prazo de um mês após a primeira abertura do tubo.

A **Mistura HCV PCR** pode ser congelada e descongelada para um máximo de **cinco sessões**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

O **RT EnzymeMix** deve ser conservado a uma temperatura inferior a -20 °C.

A **RT EnzymeMix** deve ser utilizada no prazo de um mês após a primeira abertura do tubo.

A **RT EnzymeMix** não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos durante cada utilização.

A **RT EnzymeMix** não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante **mais de 10 minutos**: utilizações adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

• HCV ELITe Standard

O **HCV Q-PCR Standard** deve ser guardado a uma temperatura inferior a -20 °C.

O **HCV Q-PCR Standard** deve ser utilizado no prazo de um mês após a primeira abertura do tubo.

O **HCV Q-PCR Standard** pode ser congelado e descongelado um máximo de **duas vezes**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar uma perda no título.

O **HCV Q-PCR Standard** pode ser mantido na área de extração do **ELITe InGenius** ou do **ELITe BeGenius** em até **duas sessões de trabalho independentes de duas horas cada** (modo de execução "PCR Only").

• HCV - ELITe Positive Control

O **Controlo positivo HCV** deve ser guardado a uma temperatura inferior a -20 °C.

O **HCV Positive Control** deve ser utilizado no prazo de um mês após a primeira abertura do tubo.

O **Controlo positivo HCV** pode ser congelado e descongelado um máximo de **quatro vezes**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

O **HCV Positive Control** pode ser mantido na área de extração dos instrumentos **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius** em até **quatro sessões de trabalho independentes de três horas cada** (modo de execução "Extraction+PCR Only").

• Controlo interno do HCV

O **HCV CPE** deve ser guardado a uma temperatura inferior a -20 °C.

O **HCV CPE** deve ser utilizado no prazo de um mês após a primeira abertura do tubo.

O **HCV CPE** pode ser congelado e descongelado um máximo de **doze vezes**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

O HCV CPE pode ser integrado nos instrumentos **ELiTe InGenius** ou **ELiTe BeGenius** em até seis sessões de trabalho independentes de três horas cada (modo de execução "Extraction + PCR").

ELiTe InGenius

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Plasma colhido em EDTA ou ACD

As amostras de plasma para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA ou ACD, identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais e transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (+18/+25 °C) durante um período máximo de 24 horas ou a +2/+8 °C durante um período máximo de 3 dias. Caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a -20 °C durante um período máximo de 1 mês ou a -70 °C durante 6 meses.

Recomenda-se a separação das amostras em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: A extração de ARN de plasma colhido em EDTA ou ACD é realizada com o sistema **ELiTe InGenius** e com o **Software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), utilizando o Protocolo de ensai **HCV ELiTe_PL_600_50**. Este protocolo processa 600 µL de amostra, a começar a partir do tubo secundário, adiciona 10 µL por extração do **HCV CPE** (Controlo interno) e elui os ácidos nucleicos em 50 µL. O tubo primário não pode ser usado em associação com o Protocolo de ensaio.

Os ácidos nucleicos purificados podem ser guardados a -20 °C durante um mês.

Soro

As amostras de soro, destinadas à extração de ARN, devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais e transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (~+25 °C) durante um período máximo de três dias ou a +2/+8 °C durante um período máximo de cinco dias. Caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a ~-20 °C durante um período máximo de um mês ou a ~-70 °C durante 6 meses.

Recomenda-se a separação das amostras em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: A extração de ARN de soro é realizada com o sistema **ELiTe InGenius** e com o **Software ELiTe InGenius** versão 1.3 (ou versões equivalentes mais recentes), utilizando o Protocolo de ensaio **HCV ELiTe_Se_600_50**. Este protocolo processa 600 µL de amostra, adiciona 10 µL por extração do **HCV CPE** (Internal Control) e elui os ácidos nucleicos em 50 µL. O tubo primário não pode ser usado em associação com o Protocolo de ensaio.

Os ácidos nucleicos purificados podem ser guardados a -20 °C durante um mês.

Outras amostras

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas, como sangue total ou LCR.

Substâncias interferentes

Os dados disponíveis relativos à inibição causada por fármacos e outras substâncias são comunicados no parágrafo "Potenciais substâncias interferentes" do capítulo "Características de desempenho".

Não use Plasma colhido em heparina para evitar a inibição da reação de amplificação e resultados inválidos frequentes.

Não use Plasma hemolítico para evitar a inibição da reação de amplificação e resultados inválidos frequentes.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Controlos de amplificação

Antes de analisar qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar a curva de calibração e os controlos de amplificação para cada lote do reagente de amplificação:

- como conjunto calibrador, use os quatro níveis de concentração do componente **HCV ELiTe Standard** fornecido com este kit, em associação com o Protocolo do ensaio **HCV ELiTe_STD**,
- como Controlo positivo da amplificação, use o componente **HCV - Controlo positivo ELiTe** fornecido com este kit, em associação com o Protocolo do ensaio **HCV ELiTe_PC**,
- como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio **HCV ELiTe_NC**.

Nota: O sistema **ELiTe InGenius** requer resultados aprovados e válidos da curva de calibração e dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados. As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após **60 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards em associação com o lote do reagente de amplificação.

Os resultados do controlo da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar após **15 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Positive e Negative Controls em associação com o lote do reagente de amplificação.

Para além disso, os calibradores e os controlos da amplificação devem ser novamente executados quando:

- for iniciado um novo lote de reagentes de amplificação,
- os resultados da análise de Controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação,
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento **ELiTe InGenius**.

Controlos da qualidade

É recomendada a validação planeada do procedimento de extração e amplificação. Podem ser usadas amostras testadas ou material de referência certificado. Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do **Kit HCV ELiTe MGB** com o sistema **ELiTe InGenius** consiste em três passos:

- verificação da prontidão do sistema,
- preparação da sessão,
- revisão e exportação de resultados.

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELiTe InGenius** e selecionar o modo de início de sessão "**CLOSED**" (Fechado),
 - verifique se os Calibradores (**HCV Q-PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote da **HCV PCR Mix** a ser utilizada. Caso não haja calibradores válidos para o lote de **HCV PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito abaixo, verifique se os controlos da amplificação (**HCV Positive Control**, **HCV Negative Control**) são aprovados e válidos (Estado) para o lote de **HCV PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos válidos disponíveis para o lote da **HCV PCR Mix**, execute os controlos conforme descrito de seguida. Pode verificar esta situação no menu "Control" na página inicial; escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELiTechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os **ELiTe MGB Kits** e o instrumento **ELiTe InGenius** com as matrizes indicadas.
- Os protocolos de ensaio disponíveis para teste da amostra com o produto **HCV ELiTe MGB Kit** estão descritos na tabela seguinte:

HCV ELITe MGB® Kit
reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Protocolo de ensaio para o HCV ELITe MGB Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
HCV ELITe_PL_600_50	Plasma	Positivo/ cópias/mL/ IU/mL/ Negativo	Volume de entrada da extração: 600 µL Volume de eluição da extração: 50 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1,7 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Protocolo de ensaio para o HCV ELITe MGB Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
HCV ELITe_Se_600_50	Soro	Positivo/ cópias/mL/ IU/mL/ Negativo	Volume de entrada da extração: 600 µL Volume de eluição da extração: 50 µL Internal Control: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1,7 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

UI, unidades internacionais

Se o protocolo do ensaio que precisar não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup da sua localidade.

Preparação da sessão

O HCV ELITe MGB Kit pode ser usado no ELITe InGenius para realizar:

- Execução integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo (PCR Only) (apenas PCR).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O sistema ELITe InGenius pode ser ligado ao "Servidor de informações laboratoriais" (LIS), que permite carregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de iniciar a sessão, é obrigatório fazer o seguinte:

- Descongele os tubos da HCV PCR Mix (tampa BRANCA) durante 30 minutos necessários à temperatura ambiente (~+25 °C). Cada tubo é suficiente para 24 reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture por meio de vórtice durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo.

Nota: Descongele a Mistura PCR do HCV num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Remova os tubos de RT EnzymeMix (tampa com inserção PRETA). Cada tubo é suficiente para configurar até 48 testes. Agite suavemente os tubos, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo.

Nota: A RT EnzymeMix não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos.

- Prepare um tubo de 2 mL com tampa de rosca (Sarstedt Ref. 72.694.005, não incluído no kit) para a mistura de reação completa e marque-o de forma reconhecível com um marcador permanente,

HCV ELITe MGB® Kit
reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

- Calcule os volumes dos dois subcomponentes que são necessários para a preparação da **mistura de reação completa** com base no número de amostras a serem analisadas, tal como descrito na tabela seguinte.

Nota: Para calcular os volumes dos dois subcomponentes a serem usados para a preparação da **mistura de reação completa**, é necessário definir o número de amostras (N) a serem testadas na sessão e seguir a tabela seguinte.

Número de amostras (N)	Mistura PCR do HCV	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

- Prepare a **mistura de reação completa** adicionando ao tubo de 2 mL dedicado os volumes calculados dos dois componentes.
- Misture por **meio de vórtice a baixa velocidade** durante 10 segundos três vezes, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

Nota: A **mistura de reação completa** deve ser usada em 7 horas se for mantida no bloco refrigerado. A mistura de reação completa **não pode** ser guardada para reutilização.

Nota: A **mistura da reação completa** é sensível à luz, não a exponha à luz direta.

Estão descritos nos parágrafos seguintes os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

A. Execução integrada

Para configurar uma execução integrada com extração e amplificação da amostra, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

- Descongele à temperatura ambiente (~+25 °C) os tubos de teste contendo as amostras a serem analisadas e manuseie de acordo com as diretrizes laboratoriais e de acordo com o parágrafo "Amostras e controlos". Lembre-se de que são necessários 600 µL de amostra para a análise.
- Descongele os tubos HCV CPE para a sessão à temperatura ambiente (~+25 °C). Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
- Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
- Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 1000 µL (mesmo que seja usado 600 µL da amostra) e que o "Extracted Elute Volume" é de 50 µL.
- Para cada Rastreo de interesse preencha a "SampleID" (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
- Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HCV ELITe_PL_600_50).
- Certifique-se de que o "Protocol" apresentado é: "Extract + PCR".
- Selecione a posição de carregamento da amostra "Extraction Tube" na coluna "Sample Position". Selecione "Next" para continuar a preparação. Para a análise, 600 µL da amostra devem ser transferidos para o "Extraction Tube". Qualquer volume em excesso será deixado no "Extraction Tube" pelo ELITe InGenius.
- Carregue a **mistura de reação completa** e o HCV CPE no "Bloco de inventário" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade da **Mistura de PCR HCV** e do HCV CPE. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
- Carregue as **PCR Cassettes**, os cartuchos de extração ELITe InGenius SP 1000, todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas, seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o sistema **ELiTe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no "Elution Tube" deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as **PCR Cassettes** com os produtos de amplificação, os cartuchos de extração e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzirem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B. Execução de amplificação (apenas PCR)

Para preparar a execução de amplificação a iniciar a partir de ARN extraído, realize os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele à temperatura ambiente (~+25 °C) os tubos de teste que contêm as amostras de ácido nucleico extraído a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
3. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Extraction Input Volume" é de 1000 µL (mesmo que tenham sido utilizados 600 µL da amostra) e que o "Extracted Elute Volume" é de 50 µL.
4. Para cada Rastreo de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
5. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HCV ELiTe_PL_600_50).
6. Selecione "PCR Only" (apenas PCR) na coluna "Protocol".
7. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna "Sample Position" é "Elution Tube (bottom row)". Selecione "Next" para continuar a preparação.
8. **Carregue a mistura de reação completa no "Bloco de inventário" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade da Mistura de PCR HCV.** Selecione "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as **PCR Cassettes** e as amostras de ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o sistema **ELiTe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no "Elution tube" deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, as **PCR Cassettes** com os produtos de amplificação e outros consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzirem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

C. Execução de calibração

Para configurar a execução de Calibração com Q-PCR Standards, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele os tubos **HCV Q-PCR Standard** (Cal1: HCV Q-PCR Standards 10², Cal2: HCV Q-PCR Standards 10³, Cal3: HCV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HCV Q-PCR Standards 10⁵) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para preparar 4 reações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home".
3. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 1000 µL (mesmo que sejam utilizados 600 µL da amostra) e que o "Volume de eluição extraído" é de 50 µL.
4. **No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio "HCV ELiTe_STD" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade do HCV Q-PCR Standard.** Selecione "Next" para continuar a preparação.
5. **Carregue a mistura de reação completa no "Bloco de inventário" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade da Mistura de PCR HCV.** Selecione "Next" para continuar a preparação.
6. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
7. Carregue as **Cassettes PCR**, os tubos **HCV Q-PCR Standard** seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
8. Feche a porta do instrumento.
9. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o sistema **ELiTe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução, os restantes **HCV Q-PCR Standards** devem ser removidos do instrumento, tapados e guardados a -20 °C.

Nota: Os **HCV Q-PCR Standards** podem ser usados para 2 sessões de trabalho independentes de 2 horas cada.

Nota: No final da execução, as **PCR Cassettes** com os produtos de reação e outros consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem produzirem contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

D. Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo

Para preparar a execução de amplificação para o Positive Control e Negative Control, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

1. Descongele os tubos de **HCV Positive Control** à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 4 reações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. **Como controlo negativo, transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um "Tubo de eluição", fornecido com o Conjunto de consumíveis ELiTe InGenius SP 200.**
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o "Volume de entrada de extração" é de 1000 µL (mesmo que sejam utilizados 600 µL da amostra) e que o "Volume de eluição extraído" é de 50 µL.

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

5. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay".
6. Para o controlo positivo, selecione o Protocolo de ensaio "HCV ELITe_PC" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade do **Controlo positivo HCV**.
7. Para o controlo negativo, selecione o Protocolo do ensaio "HCV ELITe_NC" na coluna "Ensaio" e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular. Selecione "Next" para continuar a preparação.
8. **Carregue a mistura de reação completa no "Bloco de inventário" selecionado pela seguinte instrução da GUI e preencha o número do lote e a data de validade da Mistura de PCR HCV.** Selecione "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) selecionada seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue as Cassetes PCR, o tubo **Controlo positivo HCV** e o tubo de controlo negativo seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o sistema **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução o restante **Controlo positivo HCV** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. O restante **controlo negativo** deve ser eliminado.

Nota: O **Controlo positivo HCV** pode ser usado para 4 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada.

Nota: No final da execução as Cassetes PCR com os produtos de reação e outros consumíveis devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

O ELITe InGenius monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do controlo interno para cada reação e aplique automaticamente os parâmetros do protocolo de ensaio para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Standard/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou "Track Report"). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: O sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao "Laboratory Information Server" (Servidor de informação do laboratório - LIS) através do qual é possível enviar os resultados da sessão de trabalho para o centro de dados do laboratório. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

O sistema **ELITe InGenius** gera os resultados com o produto **HCV ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento.

A. Validação da Curva de calibração

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados do PCR para o HCV ("HCV" de canal) das reações do calibrador com os parâmetros do protocolo de ensaio "**HCV ELITe_STD**". A Ct resultante versus a concentração produz a curva da calibração.

A curva de calibração, específica do lote de reagente de PCR, é guardada na base de dados (Calibração). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI. As curvas da calibração expiram **após 60 dias**.

Antes de analisar as amostras, deve ser gerada e aprovada uma curva da calibração para o lote de reagente de PCR utilizado. As curvas de calibração com "Approved" (Estado) são mostradas na janela

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

"Calibration" do software ELITe InGenius.

Nota: se a Curva de calibração não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Calibration". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e têm de ser repetidas as reações do calibrador. Além disso, se as amostras foram incluídas na execução, estas não são quantificadas e também têm de ser repetidas para a geração de resultados quantitativos.

Nota: se a curva de calibração for executada em conjunto com amostras e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

B. Validação dos resultados do Controlo Positivo e Controlo Negativo da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pela sonda para HCV (Canal "HCV") nas reações de amplificação de Positive Control e Negative Control são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolo de ensaio "**HCV ELITe_PC**" e "**HCV ELITe_NC**".

Os resultados do Positive Control e Negative Control, específicos para o lote do alvo de PCR usado, são registados na base de dados (Controls). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI. Os resultados do Positive Control e do Negative Control expiram após 15 dias.

O ELITe InGenius software processa os resultados do positive control e do negative control e gera os "Control Charts". São necessários quatro resultados de Positive Control e Negative Control, de quatro execuções diferentes, para preparar o "Control Chart". Após isso, os resultados do Positive Control e Negative Control são usados para a monitorização dos desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual do utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: se o resultado do Positive Control ou do Negative Control não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem "Failed" no ecrã "Controls". Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de Positive Control e Negative Control têm de ser repetidas.

Nota: se um Positive Control ou Negative Control for executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado for inválido, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

C. Validação dos resultados da amostra

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas para HCV (Canal "HCV") e pela sonda de Controlo interno (Canal "CI") nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolos de ensaio "**HCV ELITe_PL_600_50**" e "**HCV ELITe_Se_600_50**". Os resultados são mostrados no módulo "Result Display".

A execução da amostra pode ser aprovada quando forem cumpridas as três condições reportadas na tabela abaixo.

1) Curva de calibração	Estado
HCV Q-PCR Standards	APROVADO
2) Positive Control	Estado
HCV Positive Control	APROVADO
3) Negative Control	Estado
HCV Negative Control	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo algoritmo **ELITe InGenius software** usando os parâmetros do protocolo de ensaio.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
HCV: ARN detetado, quantidade igual a XXX cópias/mL ou IU/mL.	Foi detetado ARN HCV na amostra dentro do intervalo de medição do ensaio, quantidade como mostrado.
HCV: ARN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL ou IU/mL.	Foi detetado ARN HCV na amostra abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio.
HCV: ARN detetado, quantidade além de ULoQ cópias/mL ou IU/mL.	Foi detetado ARN HCV na amostra além do limite superior de quantificação do ensaio.
HCV: ARN não detetado ou inferior a LoD cópias/mL ou IU/mL.	Não foi detetado ARN HCV na amostra. A amostra é negativa para ARN HCV ou a sua concentração está abaixo do Limite de detecção do ensaio.
Inválido - Voltar a testar a amostra.	Resultado do ensaio não válido devido a falha do Controle Interno (extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

As amostras reportadas como "Invalid - Retest Sample" não são adequadas para a interpretação dos resultados. Neste caso, o ARN do Controle Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de transcrição reversa e de amplificação ou extração (degradação ou perda do ARN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos. Se subsistir volume da eluição suficiente, o eluato pode ser novamente testado (tal como está ou diluído) através de uma execução da amplificação no modo "PCR Only" (apenas PCR). Se o segundo resultado for inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova amostra utilizando o modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

As amostras reportadas como "ARN HCV não detetado ou inferior ao LoD" são adequadas para análise mas não foi possível detetar ARN de HCV. Neste caso pode ser negativo se estiver presente ARN de HCV a uma concentração abaixo do limite de detecção do ensaio (ver "Características de desempenho").

Amostras reportadas como "HCV: ARN detetado, quantidade abaixo do LIdQ" não são adequadas para quantificação. A concentração de ARN de HCV detetada na amostra é inferior ao nível a que pode ser quantificada com precisão. Se a amostra tiver sido diluída antes da extração ou PCR, pode ser novamente testada sem diluição (consulte "Características de desempenho").

As amostras reportadas como "DNA Detected, quantity beyond ULoQ" não são adequadas para quantificação. A concentração de ARN de HCV detetada na amostra é superior ao nível a que pode ser quantificada com precisão. A amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada para oferecer resultados dentro do intervalo linear do ensaio.

Nota: Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e os outros resultados de testes laboratoriais relativos ao doente.

Os resultados da execução da amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Result Display) por pessoal qualificado como "Administrator" ou "Analyst", seguindo as instruções na GUI. A partir da janela "Result Display" é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como "Sample Report" e "Track Report".

Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser visualizados ou exportados como "Sample Report" e "Track Report".

O "Sample Report" apresenta os detalhes dos resultados pela amostra selecionada (SID).

O "Track Report" apresenta os detalhes do resultado pelo Rastreo selecionado.

O "Sample Report" e o "Track Report" podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

ELiTe BeGenius**AMOSTRAS E CONTROLOS****Amostras**

Este produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Plasma colhido em EDTA ou ACD

As amostras de plasma para extração de ácido nucleico devem ser colhidas em EDTA ou ACD, identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais e transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (+18 / ~+25 °C) durante um período máximo de três dias ou a +2/+8 °C durante um período máximo de cinco dias. Caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a ~-20 °C durante um período máximo de um mês ou a ~-70 °C durante 6 meses.

Recomenda-se a separação das amostras em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: A extração de ARN de plasma colhido em EDTA ou ACD é realizada com o sistema **ELiTe BeGenius** e com o **Software ELiTe BeGenius** versão 2.1.0 (ou versões equivalentes mais recentes), utilizando o Protocolo de ensaio **HCV ELiTe Be_PL_600_50**. Este protocolo processa 600 µL de amostra, adiciona 10 µL por extração do **HCV CPE** (Internal Control) e elui os ácidos nucleicos em 50 µL.

Os ácidos nucleicos purificados podem ser guardados a ~-20 °C durante um mês.

Soro

As amostras de soro, destinadas à extração de ARN, devem ser colhidas e identificadas de acordo com as diretrizes laboratoriais e transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (~+25 °C) durante um período máximo de três dias ou a +2/+8 °C durante um período máximo de cinco dias. Caso contrário, devem ser congeladas e armazenadas a ~-20 °C durante um período máximo de um mês ou a ~-70 °C durante 6 meses.

Recomenda-se a separação das amostras em alíquotas antes da congelação, para evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação. Quando utilizar amostras congeladas, descongele as mesmas apenas imediatamente antes da extração, para evitar uma possível degradação do ácido nucleico.

Nota: A extração de ARN de soro é realizada com o sistema **ELiTe BeGenius** e o **Software ELiTe BeGenius** versão 2.1.0 (ou versões equivalentes mais recentes), utilizando o Protocolo de ensaio **HCV ELiTe Be_Se_600_50**. Este protocolo processa 600 µL de amostra, adiciona 10 µL por extração do **HCV CPE** (Internal Control) e elui os ácidos nucleicos em 50 µL. O tubo primário não pode ser usado em associação com o Protocolo de ensaio.

Os ácidos nucleicos purificados podem ser guardados a -20 °C durante um mês.

Outras amostras

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas, como sangue total ou LCR.

Substâncias interferentes

Os dados disponíveis relativos à inibição causada por fármacos e outras substâncias são comunicados no parágrafo "Potenciais substâncias interferentes" do capítulo "Características de desempenho".

Não use Plasma colhido em heparina para evitar a inibição da reação de amplificação e resultados inválidos frequentes.

Controlos de amplificação

Antes de analisar qualquer amostra, é obrigatório criar e aprovar a curva de calibração e os controlos de amplificação para cada lote do reagente de amplificação:

- como conjunto calibrador, use os quatro níveis de concentração do produto **HCV ELiTe Standard** fornecido com este kit, em associação com o Protocolo do ensaio **HCV ELiTe_Be_STD**,

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

- como positive control da amplificação, use o produto **HCV - ELITE Positive Control** fornecido com este kit, em associação com o Protocolo do ensaio **HCV ELITE_Be_PC**,
- como negative control da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio **HCV ELITE_Be_NC**.

Nota: O sistema **ELITE BeGenius** requer resultados aprovados e válidos da curva de calibração e dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados. As curvas da calibração, aprovadas e guardadas na base de dados, irão expirar após **60 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Q-PCR Standards em associação com o lote do reagente de amplificação.

Os resultados do controlo da amplificação, aprovados e guardados na base de dados, irão expirar após **15 dias**. Na data de fim da validade será necessário fazer uma nova execução dos Positive e Negative Controls em associação com o lote do reagente de amplificação.

Para além disso, os calibradores e os controlos da amplificação devem ser novamente executados quando:

- for iniciado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade (ver o parágrafo seguinte) se encontrarem fora da especificação
- for realizado qualquer serviço de manutenção significativo no instrumento **ELITE BeGenius**.

Controlos da qualidade

É recomendada a validação planeada do procedimento de extração e amplificação. Podem ser usadas amostras testadas ou material de referência certificado. Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

PROCEDIMENTO

O uso do **HCV ELITE MGB Kit** com o **ELITE BeGenius** consiste em três passos:

- Verificação da prontidão do sistema,
- Preparação da sessão,
- Revisão e exportação de resultados.

Verificação da prontidão do sistema

Antes de iniciar a sessão, e através da consulta da documentação do instrumento, é necessário:

- ligar o **ELITE BeGenius** e selecionar o modo de início de sessão "**CLOSED**" (Fechado),
- verificar se os Calibradores (**HCV Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote da **HCV PCR Mix** a ser utilizada. Caso não haja calibradores para o lote de **HCV PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito de seguida,
- verificar se os controlos da amplificação (**HCV Positive Control**, **HCV Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **HCV PCR Mix** a ser utilizado. Se não houver controlos de amplificação válidos disponíveis para o lote da **HCV PCR Mix**, execute os controlos descritos de seguida, escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os protocolos de ensaio fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITE MGB e o instrumento ELITE BeGenius e a matriz citada.
- Os protocolos de ensaio disponíveis para teste da amostra com o produto **HCV ELITE MGB Kit** estão descritos na tabela seguinte:

Protocolo de ensaio para o HCV ELITE MGB Kit e o ELITE InGenius

Nome	Matriz	Relatório	Características
HCV ELITE_Be_PL_600_50	Plasma	Positivo / IU/mL / cópias/mL / Negativo	Volume de entrada da extração: 600 µL Volume de eluição da extração: 50 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1,7 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Protocolo de ensaio para o HCV ELITE MGB Kit e o ELITE InGenius

Nome	Matriz	Relatório	Características
HCV ELITE_Be_Se_600_50	Soro	Positivo / IU/mL / cópias/mL / Negativo	Volume de entrada da extração: 600 µL Volume de eluição da extração: 50 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1,7 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

UI, unidades internacionais

Se o protocolo do ensaio que precisar não estiver carregado no sistema, contacte o Serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup da sua localidade.

Preparação da sessão

O **HCV ELITE MGB Kit** pode ser usado com o **ELITE BeGenius** para realizar:

- Execução integrada (Extract + PCR) (Extração + PCR),
- Execução de amplificação (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução da calibração (PCR Only) (apenas PCR),
- Execução de amplificação para Controlo Positivo e Controlo Negativo (PCR Only) (apenas PCR).

Todos os parâmetros requeridos estão incluídos no protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente carregados quando o protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O sistema **ELITE BeGenius** pode ser ligado ao "Servidor de informações de localização" (LIS), que permite carregar a informação da sessão. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de iniciar a sessão, é obrigatório fazer o seguinte:

- Descongele os tubos da **HCV PCR Mix** (tampa BRANCA) durante 30 minutos necessários à temperatura ambiente (~+25 °C). Cada tubo é suficiente para **24** reações em condições otimizadas (2 ou mais testes por sessão). Misture por meio de vórtice durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo.

Nota: Descongele a **Mistura PCR do HCV** num local escuro, pois este reagente é sensível à luz.

- Retire a **RT EnzymeMix** necessária (tampa com inserção PRETA) Cada tubo tem suficiente para configurar **48 testes**. Agite suavemente os tubos, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo,

Nota: A **RT EnzymeMix** não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos.

- Prepare um tubo de 2 mL com tampa de rosca (Sarstedt Ref. 72.694.005, não incluído no kit) para a **mistura de reação completa** e marque-o de forma reconhecível com um marcador permanente,
- Calcule os volumes dos dois subcomponentes que são necessários para a preparação da **mistura de reação completa** com base no número de amostras a serem analisadas, tal como descrito na tabela seguinte.

Nota: Para calcular os volumes dos dois subcomponentes a serem usados para a preparação da **mistura de reação completa**, é necessário definir o número de amostras (N) a serem testadas na sessão e seguir a tabela seguinte.

Número de amostras (N)	Mistura PCR do HCV	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4,4 µL

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

5. Prepare a **mistura de reação completa** adicionando ao tubo de 2 mL dedicado os volumes calculados dos dois componentes.
6. Misture por **meio de vórtice a baixa velocidade** durante 10 segundos três vezes, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo.

Nota: A **mistura de reação completa** deve ser usada em 7 horas se for mantida no bloco refrigerado. A mistura de reação completa **não pode** ser guardada para reutilização.

Nota: A **mistura da reação completa** é sensível à luz, não a exponha à luz direta.

Estão descritos nos parágrafos seguintes os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

A. Execução integrada

Para configurar uma execução integrada com extração e amplificação da amostra, execute os passos seguintes de acordo com a GUI:

1. Descongele à temperatura ambiente (+18/25 °C) os tubos de teste contendo as amostras a serem analisadas e manuseie de acordo com as diretrizes laboratoriais e de acordo com o parágrafo "Amostras e controles". Lembre-se de que são necessários 600 µL de amostra para a análise.
2. Descongele os tubos **HCV CPE** à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "Extract + PCR".
6. Carregue as amostras nos Racks 5 e 4 (comece sempre com o Rack 5).
7. Insira o suporte na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.

Nota: Se forem carregados tubos secundários, assinale "Tubo de 2 mL". Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a ID da amostra.

8. Verifique o Volume de entrada de extração (600 µL) e o Volume de eluição extraído (50 µL).
9. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (isto é, HCV ELITE_Be_PL_600_50). Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Se usado, repita os passos 7 a 9 para o Rack 4.
11. Carregue os tubos de eluato nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).

Nota: Os tubos de eluição podem ser etiquetas para melhorar a rastreabilidade.

12. Insira o suporte na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.
13. Se usado, repita os passos 11 a 12 para o Rack 2.
14. Carregue a **CPE** e a **mistura de reação completa** no Rack 1.
15. Insira o Rack 1 na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.
16. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
17. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
18. Carregue o Cesto com os cartuchos de extração "ELITE InGenius SP 1000" e os consumíveis de extração necessários seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
19. Feche a porta do instrumento.
20. Pressione "Start" para iniciar a execução.

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Quando a sessão é concluída, o **ELITE BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados, e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, a "PCR Cassette" com os produtos de reação e os consumíveis deve ser removida do instrumento e eliminada sem produzir contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida na "Cooler Unit" até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

B. Execução da amplificação

Para preparar a execução da amplificação a partir de ARN extraído, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele à temperatura ambiente (~+25 °C) os tubos de teste que contêm as amostras de ácido nucleico extraído a serem analisadas. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
3. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4. Selecione o "run mode": "PCR Only".
5. Carregue as amostras nos Racks 3 e 2 (comece sempre com o Rack 3).
6. Insira o suporte na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.
7. Mesmo que não seja efetuada a extração, verifique o Volume de entrada de extração (600 µL) e o Volume de eluição extraído (50 µL).
8. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., HCV ELITE_Be_PL_600_50). Selecione "Next" para continuar a preparação.
9. Se usado, repita os passos 5 a 8 para o Rack 2.
10. Carregue a **mistura de reação completa** no Rack 1.
11. Insira o Rack 1 na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.
12. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
13. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
14. Feche a porta do instrumento.
15. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITE BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados, e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante Amostra extraída pode ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução, a "PCR Cassette" com os produtos de reação deve ser removida do instrumento e eliminada sem produzir contaminações ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida na "Cooler Unit" até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

C. Execução de calibração

Para preparar a execução da calibração, com os Q-PCR Standards, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

1. Descongele os tubos **HCV Q-PCR Standard** (Cal1: HCV Q-PCR Standards 10², Cal2: HCV Q-PCR Standards 10³, Cal3: HCV Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: HCV Q-PCR Standards 10⁵) à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para preparar 2 reações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
3. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4. Selecione o "run mode": "PCR Only".
5. Carregue os tubos do Calibrador no Rack 3.
6. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (HCV ELITe_Be_STD). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
7. Carregue a **mistura de reação completa** no Rack 2.
8. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITe BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados, e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução, os restantes Calibradores podem ser removidos do instrumento, tapados e guardados a -20 °C. Evite derramar os Q-PCR Standards.

Nota: Os **HCV Q-PCR Standards** podem ser usados para 2 sessões de trabalho independentes de 2 horas cada.

Nota: No final da execução, a "PCR Cassette" com os produtos de reação deve ser removida do instrumento e eliminada sem produzir contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

D. Execução de Positive Control e Negative Control

Para preparar a execução do Positive Control e Negative Control da amplificação, efetue os passos a seguir em conformidade com a GUI:

1. Descongele os tubos de **HCV Positive Control** à temperatura ambiente (~+25 °C) durante 30 minutos para a sessão. Cada tubo é suficiente para preparar 4 reações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Transfira pelo menos 50 µL da água de qualidade para biologia molecular (como Negative Control) para as sessões num tubo Eluição, fornecido com o ELITe InGenius SP Consumable Set.
3. Selecione "Perform Run" a partir do ecrã "Home screen".
4. Retire os Suportes 1, 2 e 3 da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
5. Selecione o "run mode": "PCR Only".
6. Carregue os tubos de Positive Control e Negative Control no Rack 3.
7. Selecione o protocolo de ensaio a ser usado na coluna "Assay" (por ex., (HCV ELITe_Be_PC e HCV ELITe_Be_NC). Clique no botão "Next" para continuar a preparação.
8. Carregue a **mistura de reação completa** no Rack 2.

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

9. Insira o Rack 2 na "Cooler Unit". Selecione "Next" para continuar a preparação.
10. Carregue e verifique os Suportes de pontas na "Inventory Area" (Área de inventário) seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
11. Carregue o Cesto com "PCR Cassette" na Área de inventário seguindo as instruções na GUI. Selecione "Next" para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione "Start" para iniciar a execução.

Quando a sessão é concluída, o **ELITe BeGenius** permite ao utilizador ver, aprovar, guardar os resultados, e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução, o restante Positive Control pode ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C. Evite derramar os Positive Controls. O restante Negative Control deve ser eliminado.

Nota: O **Controlo positivo HCV** pode ser usado para 4 sessões de trabalho independentes de 3 horas cada.

Nota: No final da execução, as "PCR Cassettes" com os produtos de reação e outros consumíveis devem ser removidos do instrumento e eliminados sem produzir contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: A **mistura de reação completa** pode ser mantida no bloco refrigerado até 2 sessões de trabalho de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão de trabalho (7 horas no total). Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos antes de iniciar a sessão seguinte.

Revisão e aprovação de resultados

O ELITe BeGenius monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do controlo interno para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do protocolo de ensaio para gerar curvas de PCR que são então interpretadas sob a forma de resultados.

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã "Results Display". Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Calibrador/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios ("Sample Report" ou "Track Report"). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

O sistema **ELITe BeGenius** gera os resultados utilizando o HCV ELITe MGB Kit através do seguinte procedimento:

- A. Validação da Curva de calibração,
- B. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação,
- C. Validação dos resultados da amostra,
- D. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

Nota: Consulte os mesmos capítulos do **ELITe InGenius** para obter mais informações.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO ELITe InGenius e ELITe BeGenius**Limite de deteção (LdD)**

O Limite de deteção (LoD) do Kit HCV ELITe MGB foi definido em associação com amostras de plasma e o sistema ELITe InGenius.

O LoD foi definido através de testes a um painel de Plasma negativo para HCV colhido em ACD reforçado com material de referência certificado HCV (6.ª Norma internacional da OMS, NIBSC) a um título conhecido. Foram preparados seis níveis de diluições, desde 100 IU/mL até 6 IU/mL. Cada nível de diluição foi processado em 24 réplicas no sistema ELITe InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR). O LoD foi calculado por análise de regressão Probit dos dados com a concentração a corresponder a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Limite de detecção (IU/mL) para plasma colhido em amostras de ACD e o ELITe InGenius			
Alvo	LoD	intervalo de confiança de 95%	
		Limite inferior	Limite superior
HCV	26	19	48

O LoD como cópias/mL para Plasma colhido em ACD foi calculado através da aplicação do fator de conversão específico (2,4 IU/cópia). A sensibilidade analítica como cópias/mL está reportada a seguir.

Limite de detecção (cópias/mL) para plasma colhido em amostras de ACD e o ELITe InGenius			
Alvo	LoD	intervalo de confiança de 95%	
		Limite inferior	Limite superior
HCV	11	8	20

O valor LoD calculado foi verificado através de testes a 30 réplicas de Plasma colhido em ACD, 30 réplicas de Plasma colhido em EDTA e 30 réplicas de soro reforçadas por material de referência certificado HCV (6.ª Norma internacional da OMS, NIBSC) a uma concentração reivindicada. O LoD é confirmado se, pelo menos, 27 em 30 réplicas derem resultado positivo em conformidade com a norma CLSI EP17-A.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Verificação do limite de detecção de plasma e soro e ELITe InGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Plasma colhido em ACD	26 IU/mL	HCV	30	29	1
Plasma colhido em EDTA	26 IU/mL	HCV	30	27	3
Soro	26 IU/mL	HCV	30	27	3

O valor de LoD para o alvo HCV foi confirmado a 26 IU/mL para Plasma colhido em ACD, Plasma colhido em EDTA e Soro.

O valor LoD calculado foi verificado em associação com o **ELITe BeGenius** através de testes a 30 réplicas de Plasma colhido em ACD, 30 réplicas de Plasma colhido em EDTA e 30 réplicas de soro reforçadas por material de referência certificado de HCV (6.ª Norma internacional da OMS, NIBSC) à concentração declarada. O LoD é confirmado se pelo menos 27 em 30 réplicas derem resultado positivo em conformidade com K. Linnet et al. 2004.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Verificação do limite de detecção de plasma, soro e o ELITe BeGenius					
Amostra	Título	Alvo	N	Positivo	Negativo
Plasma colhido em EDTA	26 IU/mL	HCV	30	30	0
Plasma colhido em ACD	26 IU/mL	HCV	30	27	3
Soro	26 IU/mL	HCV	30	27	3

O valor de LoD para o alvo HCV foi confirmado a 26 IU/mL para Plasma colhido em ACD, Plasma colhido em EDTA e Soro.

Equivalência da matriz: Plasma EDTA versus Plasma ACD e Soro

A Equivalência de desempenhos do Kit HCV ELITe MGB foi verificada utilizando amostras de Plasma colhido em ACD, Plasma colhido em EDTA e Soro em associação com o sistema ELITe InGenius.

Foi realizado um teste em 30 amostras de Plasma colhido em EDTA e 30 amostras de Plasma colhido em ACD a partir dos mesmos 30 dadores diferentes (amostras emparelhadas), com teste negativo para HCV por um imunoenensaio com marcação CE IVD. As amostras foram testadas no sistema ELITe InGenius no modo "Extract + PCR". Foi avaliada a percentagem do acordo negativo. A percentagem do Coeficiente de Variabilidade (%CV) dos valores de Ct do Controlo interno foi calculada para avaliar a equivalência das duas matrizes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Amostra	N	Positivo	Negativo	% de acordo negativo	%CV do Ct do CI	%CV do Ct do CI (controlo interno) completo
Plasma colhido em EDTA	30	0	30	100%	0,89	0,95
Plasma colhido em ACD	30	0	30		1,02	

O mesmo teste foi realizado em 30 amostras de Plasma colhido em EDTA e 30 amostras de Soro a partir dos mesmos 30 dadores diferentes (amostras emparelhadas), com teste negativo para HCV por um imunoenensaio com marcação CE IVD.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostra	N	Positivo	Negativo	% de acordo negativo	%CV do Ct do CI	%CV do Ct do CI (controlo interno) completo
Plasma colhido em EDTA	30	0	30	100%	0,90	1,11
Soro	30	0	30		1,28	

Foi realizado um teste em 30 amostras de Plasma colhido em EDTA e 30 amostras de Plasma colhido em ACD a partir dos mesmos 30 dadores diferentes (amostras emparelhadas), com teste negativo para HCV por um imunoenensaio com marcação CE IVD e reforçado com material de referência certificado (6.ª Norma internacional HCV da OMS, NIBSC) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL). As amostras foram testadas no sistema ELITe InGenius no modo "Extract + PCR". Foi avaliada a percentagem do acordo positivo. A percentagem do Coeficiente de Variabilidade (%CV) dos valores de Ct do alvo HCV foi calculada para avaliar a equivalência das duas matrizes.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostra	N	Positivo	Negativo	% do acordo positivo	%CV do Ct do HCV	%CV do Ct do HCV completo	Tendências (Log IU/mL)
Plasma colhido em EDTA	30	30	0	100%	1,96	1,79	0,0190
Plasma colhido em ACD	30	30	0		1,60		

Foi realizado o mesmo teste em 30 amostras de Plasma colhido em EDTA e 30 amostras de Soro a partir dos mesmos 30 dadores diferentes (amostras emparelhadas), com teste negativo para HCV por um imunoenensaio com marcação CE IVD e reforçado com material de referência certificado (6.ª Norma internacional HCV da OMS, NIBSC) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL).

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostra	N	Positivo	Negativo	% do acordo positivo	%CV do Ct do HCV	%CV do Ct do HCV completo	Tendências (Log IU/mL)
Plasma colhido em EDTA	30	30	0	100%	1,84	1,81	0,0636
Soro	30	30	0		1,77		

Nestes testes, as 30 amostras emparelhadas de Plasma colhido em EDTA e de Plasma colhido em ACD e das 30 amostras emparelhadas de Plasma colhido em EDTA e de Soro demonstraram um desempenho equivalente quando analisadas pelo Kit HCV ELITe MGB em associação com o sistema ELITe InGenius.

Foram realizados testes adicionais sobre a equivalência das matrizes durante o estudo de Intervalo de medição linear.

Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear do Kit HCV ELITe MGB foi determinado em associação com amostras de Plasma e o sistema ELITe InGenius.

O Intervalo de medição linear foi determinado com recurso a um painel de material de referência HCV a um título conhecido (Painel AcroMatrix™ HCV-S) em Plasma colhido em EDTA. O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de 2,5x10⁷ IU/mL a 1,5x10¹ IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas no sistema **ELITe InGenius** no modo "Extract + PCR".

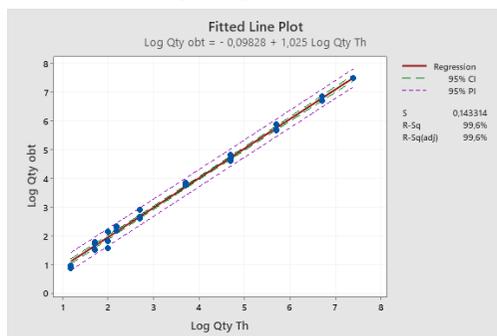
HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

A análise dos dados obtidos, realizada por regressão polinômica e regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,996.

Os resultados são comunicados na figura seguinte.



O Limite inferior de quantificação (LLoQ) foi definido à concentração LoD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio standard = registro 0,2787 IU/mL) e exatos (Bias = registro 0,3641 IU/mL) dentro do registro $\pm 0,5$ IU/mL: 26 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio standard = registro 0,0089 IU/mL) e exatos (Bias = registro 0,0794 IU/mL) dentro do registro $\pm 0,5$ IU/mL: 25.000.001 IU/mL.

O intervalo de medição linear como cópia/mL para Plasma EDTA é calculado através da aplicação do fator de conversão específico (2,4 IU/cópia).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITE InGenius	
Limite inferior	Limite superior
26 IU/mL	25.000.001 IU/mL
11 cópias/mL	10.416.667 cópias/mL

Nota: Os desempenhos do produto em associação com plasma em EDTA, plasma em ACD e soro foram demonstrados como sendo equivalentes.

O intervalo de medição linear do HCV ELITE MGB Kit foi verificado em associação com amostras de plasma e o sistema **ELITE BeGenius** usando um painel de diluições de material de referência de HCV (AcroMetrix™ HCV-S Panel AcroMetrix) em amostras negativas para HCV de plasma colhido em ACD. O painel era constituído por dez pontos de diluição a partir de $2,5 \times 10^7$ IU/mL até 15 IU/mL. Cada amostra do painel foi testada em 3 réplicas no sistema **ELITE BeGenius** no modo "Extract + PCR".

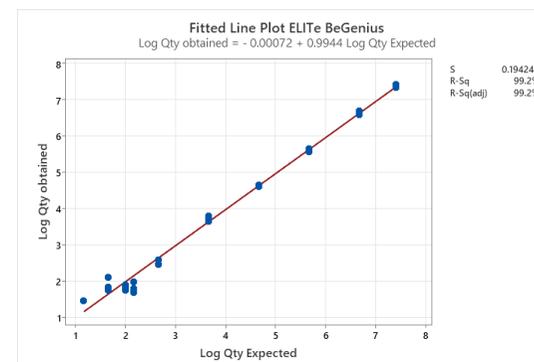
A análise dos dados obtidos, realizada por regressão polinômica e regressão linear, demonstrou que o ensaio mostra uma resposta linear para todas as diluições com um coeficiente de correlação quadrado (R2) igual a 0,992.

Os resultados são comunicados na figura seguinte.

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING



O Limite inferior de quantificação (LIdQ) foi definido à concentração do LdD que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio standard = 0,3762 Log IU/mL) e exatos (Bias = 0,3583 Log IU/mL) dentro de $\pm 0,5$ Log IU/mL: 26 IU/mL.

O Limite superior de quantificação (ULoQ) foi definido à concentração mais alta que fornece resultados quantitativos precisos (Desvio standard = registro 0,0405 IU/mL) e exatos (Bias = registro 0,0064 IU/mL) dentro do registro $\pm 0,5$ IU/mL: $2,5 \times 10^7$ IU / mL.

O intervalo de medição linear como cópia/mL para Plasma ACD é calculado através da aplicação do fator de conversão específico (2,4 IU/cópia).

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Intervalo de medição linear para amostras de plasma e o ELITE BeGenius	
Limite inferior	Limite superior
26 IU/mL	25.000.001 IU/mL
11 cópias/mL	10.416.667 cópias/mL

Nota: Os desempenhos do produto em associação com plasma em EDTA, plasma em ACD e soro foram demonstrados como sendo equivalentes.

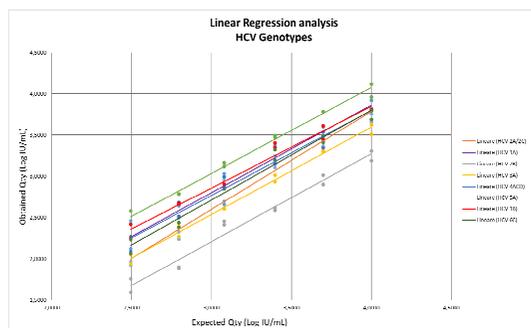
A linearidade de quantificação foi verificada pela análise de Plasma negativo colhido em EDTA reforçado por material de referência HCV (SeraCare) para genótipos HCV principais (1, 2, 3, 4, 5, 6). Cada genótipo HCV foi testado num painel de 6 níveis de diluição. Cada nível de diluição foi testado em 2 réplicas no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

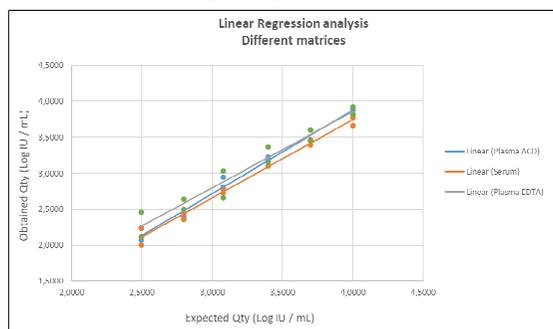
Os resultados são comunicados na figura seguinte.



A linearidade do ensaio foi confirmada para os genótipos HCV principais (1, 2, 3, 4, 5, 6): o valor R2 variou de 0,950 a 0,992 e os resultados quantitativos encontram-se dentro de $\pm 0,5$ Registro IU/mL com exceção do genótipo HCV 2b que foi subvalorizado a cerca de 0,8 Registro IU/mL em comparação com o valor teórico. No entanto, esta amostra também foi subvalorizada por "cobas® HCV para uso em sistemas 6800" (Roche Diagnostics).

A linearidade de quantificação foi verificada através da análise de Plasma negativo colhido em ACD e Soro reforçado com material de referência HCV OMS (NIBSC). Cada matriz foi testada num painel de 6 níveis de diluição. Cada nível de diluição foi testado em 2 réplicas no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR). Os resultados de teste correspondentes com Plasma colhido em EDTA foram comunicados como referência.

Os resultados são comunicados na figura seguinte.



A linearidade do ensaio foi confirmada para Plasma colhido em ACD e Soro, fornecendo um R2 respetivamente de 0,9838 e 0,9870 e os resultados quantitativos dentro de $\pm 0,5$ Registro IU/mL.

Inclusividade: Eficiência de deteção e eficiência de quantificação em diferentes genótipos

A eficiência de deteção de diferentes genótipos de HCV foi avaliada por comparação *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos.

A análise das regiões escolhidas para a hibridização dos primários e da sonda no alinhamento das sequências da região 5' UTR do HCV disponível na base de dados demonstrou a conservação da sequência e a ausência de faltas de correspondência significativas nos genótipos HCV (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Por isso, é esperada uma amplificação e deteção eficientes para todos os genótipos HCV.

A inclusividade do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação em diferentes genótipos, foi verificada através de testes a três painéis de materiais de referência:

- "Painel de desempenho do genótipo de ARN de HCV AccuTrak" (Seracare), um painel de validação de 8 membros de recolha diversificada de genótipos de HCV 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

- Painel de avaliação do genótipo de HCV 01 (Qnostics).
- Material de referência não OMS 4.º Painel de genótipo de ARN de HCV para Técnicas de amplificação de ácido nucleico (NIBSC).

Cada amostra do painel foi diluída a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL) em amostras negativas de Plasma colhido em ACD e testadas no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Painel de desempenho do genótipo de ARN de HCV AccuTrak				
Genótipo	Teórico IU/mL	Pos./Rep.	Ct médio	Média IU/mL
HCV 1A	78	3 / 3	37,16	74
HCV 1B	78	3 / 3	37,74	48
HCV 2A/2C	78	3 / 3	37,64	56
HCV 2B	78	3 / 3	38,14	36
HCV 3A	78	3 / 3	39,70	14
HCV 4ACD	78	3 / 3	38,18	38
HCV 5A	78	3 / 3	37,20	67
HCV 6C	78	3 / 3	38,07	39

Painel de avaliação do genótipo de HCV				
Genótipo	Teórico IU/mL	Pos./Rep.	Ct médio	Média IU/mL
HCV 1a	78	3 / 3	36,22	133
HCV 1b	78	3 / 3	34,11	615
HCV 2b	78	3 / 3	38,24	33
HCV 3a	78	3 / 3	35,46	225
HCV 4a	78	3 / 3	36,09	144
HCV 5a	78	3 / 3	37,22	69
HCV 6a	78	3 / 3	37,56	56

Material de referência não OMS 4.º Painel de genótipo de ARN de HCV				
Genótipo	Teórico IU/mL	Pos./Rep.	Ct médio	Média IU/mL
HCV 1a	78	3 / 3	38,27	40
HCV 1b	78	3 / 3	37,12	160
HCV 2i	78	3 / 3	38,01	71
HCV 3a	78	3 / 3	39,49	19
HCV 4r	78	3 / 3	40,08	18
HCV 5a	78	3 / 3	38,92	39
HCV 6i	78	2 / 3	38,24	8

Todas as amostras dos três painéis foram corretamente detetadas. No "Material de referência não OMS 4.º Painel de genótipo de ARN de HCV" (NIBSC) uma das três réplicas do genótipo de HCV 6i não foi detetada. A maioria das amostras foram igualmente quantificadas dentro do título teórico $\pm 0,5$ Registro IU/mL (25 – 247 IU/mL) pelo HCV ELiTe MGB® Kit em associação com o instrumento ELiTe InGenius. No "Material de referência não OMS 4.º Painel de genótipo de ARN de HCV" (NIBSC) o genótipo de HCV 6i também foi subvalorizado. No entanto, este genótipo foi corretamente detetado e quantificado nos outros dois painéis.

Marcadores potencialmente interferentes: reatividade cruzada

A potencial reatividade cruzada com outros organismos que podem ser encontrados em amostras clínicas de Plasma e Soro foi avaliada pela comparação *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos.

As regiões escolhidas para a hibridização dos primários e a sonda foram verificadas no alinhamento das sequências de outros organismos disponíveis nas bases de dados. A análise das regiões de hibridização revelou a ausência de homologias significativas com os organismos não pretendidos.

A ausência de reatividade cruzada com outros organismos que podem ser encontrados nas amostras clínicas de Plasma e Soro também foi verificada através de testes a um painel de materiais de referência certificados.

As amostras de ADN ou ARN genómico de diferentes marcadores potencialmente interferentes (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix) foram analisadas a uma elevada concentração (pelo menos 10^5 cópias/reacção) em três réplicas em associação com o sistema ELiTe InGenius no modo "PCR Only"

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

(apenas PCR). O ADN ou ARN genômico de cada organismo foram adicionados com 80 000 cópias de Controlo interno por reação para imitar a amostra clínica extraída.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

ID da amostra	Pos./Rep. HCV	Resultado
HIV1	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HIV2	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HTLV1	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HTLV2	0 / 3	Sem reatividade cruzada
CMV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
EBV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HAV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HBV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HEV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HSV1	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HSV2	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HHV6	0 / 3	Sem reatividade cruzada
VZV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Flu A	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Flu B	0 / 3	Sem reatividade cruzada
RSV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
ADV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
WNV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
DV3	0 / 3	Sem reatividade cruzada
EV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
PVB19	0 / 3	Sem reatividade cruzada
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 / 3	Sem reatividade cruzada
<i>Candida albicans</i>	0 / 3	Sem reatividade cruzada

Nenhum dos marcadores potencialmente interferentes testados revelou reatividade cruzada para o alvo HCV utilizando o HCV ELITE MGB® Kit.

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Marcadores potencialmente interferentes: Interferência

A ausência de interferência por outros organismos que podem ser encontrados nas amostras clínicas de Plasma também foi verificada através de testes ao painel de materiais de referência certificados.

As amostras de ADN ou ARN genômico de diferentes marcadores potencialmente interferentes (ATCC, NIBSC, ZeptoMetrix) foram reforçadas a uma elevada concentração (pelo menos 10⁵ cópias/reação) por material de referência de ARN de HCV (form 6th WHO International Standard, NIBSC) a uma baixa concentração (cerca de 10 cópias/reação). As amostras foram analisadas em três réplicas em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "PCR Only" (apenas PCR). A cada amostra foram adicionados 80.000 cópias de Controlo interno por reação para imitar a amostra clínica extraída. Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

ID da amostra	Pos./Rep. HCV	Resultado
HIV1	3 / 3	Sem interferência
HIV2	3 / 3	Sem interferência
HTLV1	3 / 3	Sem interferência
HTLV2	3 / 3	Sem interferência
CMV	3 / 3	Sem interferência
EBV	3 / 3	Sem interferência
HAV	3 / 3	Sem interferência
HBV	3 / 3	Sem interferência
HEV	3 / 3	Sem interferência
HSV1	3 / 3	Sem interferência
HSV2	3 / 3	Sem interferência
HHV6	3 / 3	Sem interferência
VZV	3 / 3	Sem interferência
Flu A	3 / 3	Sem interferência
Flu B	3 / 3	Sem interferência
RSV	3 / 3	Sem interferência
ADV	3 / 3	Sem interferência
WNV	3 / 3	Sem interferência
DV3	3 / 3	Sem interferência
EV	3 / 3	Sem interferência
PVB19	3 / 3	Sem interferência
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 / 3	Sem interferência
<i>Candida albicans</i>	3 / 3	Sem interferência

A presença dos organismos potencialmente interferentes testados demonstrou a ausência de inibição da amplificação do alvo HCV utilizando o HCV ELITE MGB® Kit.

Substâncias potencialmente interferentes

O efeito de substâncias potencialmente interferentes foi avaliado através da análise do painel "Painel de inibição AcroMetrix®" (Thermo Fisher Scientific Inc.) contendo substâncias endógenas, resultantes de hemólise, icterícia e lipemia, e substâncias exógenas, EDTA e Heparina.

As amostras do painel de inibição foram reforçadas com material de referência certificado HCV (6.^a Norma internacional HCV da OMS, NIBSC) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL).

Além disso, foram testadas outras 7 substâncias potencialmente interferentes a uma concentração relevante: Ganciclovir, Azitromicina, Glecaprevir, Ribavirina, Sofosbuvir, Pibrentasvir, Velpatasvir.

As substâncias foram adicionadas individualmente ao plasma negativo de HCV colhido em ACD reforçadas com material de referência certificado HCV (NIBSC) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL).

As amostras foram processadas em três réplicas no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR". Os valores Ct (amostras de referência e teste) do alvo HCV e do Controlo Interno foram usados para calcular a percentagem do Coeficiente de Variabilidade (%CV) para avaliar a possível interferência.

Os resultados são comunicados nas tabelas seguintes.

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Amostra	Pos./Rep. HCV	%CV do Ct do HCV	%CV do Ct do CI	Resultado
Bilirubina	3 / 3	1,12	0,91	Sem interferência
Triglicéridos	3 / 3	2,20	0,83	Sem interferência
Hemoglobina	1 / 3	N.A.	10,80	Interferência
Heparina	0 / 3	N.A.	7,68	Interferência
EDTA	3 / 3	1,36	1,28	Sem interferência
Ganciclovir	3 / 3	1,94	0,94	Sem interferência
Azitromicina	3 / 3	2,22	1,69	Sem interferência
Sofosbuvir	3 / 3	2,03	0,93	Sem interferência
Pibrentasvir	3 / 3	2,81	0,92	Sem interferência
Glecaprevir	3 / 3	2,00	1,09	Sem interferência
Ribavirina	3 / 3	1,72	1,03	Sem interferência
Velpatasvir	3 / 3	2,01	0,84	Sem interferência
Referência	3 / 3	1,12	0,91	Sem interferência

A maioria das substâncias testadas não interfere com a amplificação de HCV ou do Controle Interno. A percentagem %CV dos valores Ct foi inferior a 2,5%.

A heparina e hemoglobina a uma elevada concentração (3,4 – 4,6 g/dL) foram confirmadas como inibidoras da amplificação do HCV mas, graças ao valor-limite de Ct do controle interno (CI Ct < 31), as amostras têm, na maioria dos casos, um resultado "inválido" e não um "falso negativo".

Ausência de contaminação cruzada

A ausência de contaminação cruzada foi testada através da análise dos resultados de cinco sessões, em que as amostras de plasma negativas para ARN de HCV foram alternadas com amostras de plasma reforçadas por material de referência certificado HCV (ZeptoMetrix) a uma concentração de 1x10⁶ IU/mL.

Foram testadas cinco séries de amostras, alternando seis amostras positivas com seis amostras negativas, no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Amostras	N	Negativo	Positivo
Positivo	30	0	30
Negativo	30	30	0

Nenhuma das amostras negativas para HCV testadas deu resultados falsos positivos. Neste teste, não foi detetada contaminação cruzada intra-sessão e entre sessões.

Taxa de falha geral do sistema

A taxa de falha geral do sistema, que origina resultados falsos negativos, foi verificada em associação com o **ELITE InGenius**, através da análise de um painel de amostras reforçadas para ARN de HCV a baixo título.

100 amostras diferentes de plasma colhido em EDTA, 30 amostras diferentes de Plasma colhido em ACD e 30 amostras diferentes de Soro, com teste negativo para ARN do HCV foram reforçadas com material de referência certificado (OMS) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL). As amostras foram testadas no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Negativo	Positivo	IU/mL HCV médio
Plasma colhido em EDTA	100	0	100	55
Plasma colhido em ACD	30	0	30	62
Soro	30	0	30	52

Nenhuma das amostras positivas para HCV testadas deu resultados falsos negativos. Neste teste, a taxa de falha geral do sistema foi igual a 0%.

A taxa de falha geral do sistema, que origina resultados falsos negativos, foi verificada em associação com o **ELITE BeGenius** através de um painel de amostras reforçadas para ARN de HCV a

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

baixo título.

100 amostras diferentes de plasma colhido em EDTA testaram negativo para ARN de HCV foram reforçadas com material de referência certificado (WHO) a uma concentração de 3 x LdD (cerca de 78 IU/mL). As amostras foram testadas no sistema ELITE BeGenius no modo "Extract + PCR".

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Negativo	Positivo	IU/mL HCV médio
Plasma colhido em EDTA reforçado com HCV	100	0	100	77

Nenhuma das amostras positivas para HCV testadas deu resultados falsos negativos. Neste teste, a taxa de falha geral do sistema foi igual a 0%.

Repetibilidade

A Capacidade de repetição dos resultados obtidos pelo produto HCV ELITE MGB Kit em associação com o sistema ELITE InGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de plasma. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado HCV (OMS) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL) e de 10 x LoD (cerca de 260 IU/mL).

A repetibilidade foi obtida através da análise de amostras de painel em quatro réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote de produto, em dois dias diferentes. Foram usados três lotes de produtos no mesmo instrumento pelo mesmo operador. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os valores da Ct do alvo e do Internal Control foram usados para calcular a %CV para avaliar a Repetibilidade como imprecisão.

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Amostra	Repetibilidade intra-sessão							
	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	Indet.	-	-	24 / 24	28,41	0,36	1,27
3x o LoD	8 / 8	38,02	0,83	2,19				
10x o LoD	8 / 8	35,91	0,59	1,65				

Amostra	Repetibilidade inter-sessão							
	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	Indet.	-	-	48 / 48	28,47	0,38	1,33
3x o LoD	16 / 16	37,89	0,84	2,21				
10x o LoD	16 / 16	35,95	0,47	1,32				

Amostra	Repetibilidade interlote							
	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 48	Indet.	-	-	144 / 144	28,52	0,46	1,61
3x o LoD	48 / 48	38,25	0,36	0,95				
10x o LoD	48 / 48	36,56	0,55	1,51				

No teste da Capacidade de repetição, o ensaio detetou o HCV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 2,19% para HCV e 1,61% para o Controlo Interno.

A repetibilidade dos resultados obtidos pelo produto HCV ELITE MGB Kit em associação com o sistema **ELITE BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de plasma. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de HCV (6th WHO International Standard, NIBSC) a uma concentração de 3 x LdD (cerca de 78 IU/mL) e de 10 x LdD (cerca de 260 IU/mL).

A repetibilidade foi obtida através da análise de amostras de painel em quatro réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote de produto, em dois dias diferentes. Foram usados três lotes de produtos no mesmo instrumento pelo mesmo operador. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELITE InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os valores da Ct do alvo e do Internal Control foram usados para calcular a %CV para avaliar a

HCV ELiTe MGB® Kit
reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Repetibilidade como imprecisão.

Nas tabelas seguintes é apresentado um resumo dos resultados.

Repetibilidade intra-sessão								
Amostra	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 8	Indet.	-	-	24 / 24	28,09	0,28	0,99
3x o LoD	8 / 8	37,65	0,50	1,33				
10x o LoD	8 / 8	35,97	0,43	1,19				

Repetibilidade inter-sessão								
Amostra	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 16	Indet.	-	-	48 / 48	28,05	0,29	1,03
3x o LoD	16 / 16	37,80	0,72	1,91				
10x o LoD	16 / 16	35,93	0,47	1,30				

No teste de Repetibilidade, o ensaio detetou o alvo de HCV como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HCV e o Controlo Interno.

Reprodutibilidade

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto HCV ELiTe MGB Kit em associação com o sistema ELiTe InGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de plasma. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado HCV (OMS) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL) e de 10 x LoD (cerca de 260 IU/mL).

A Capacidade de reprodução foi obtida através da análise de amostras de painel em quatro réplicas, numa execução por dia, em dois dias por local. Foram usados três lotes diferentes do produto em três locais diferentes com três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Os valores de Ct do alvo e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a reprodutibilidade como imprecisão.

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Reprodutibilidade entre locais								
Amostra	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 24	Indet.	-	-	72 / 72	28,18	0,59	2,09
3x o LoD	24 / 24	36,84	0,59	1,60				
10x o LoD	24 / 24	34,94	0,42	1,20				

No teste da Capacidade de reprodução, o ensaio detetou o HCV alvo como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 1,6% para HCV e 2,09% para o Controlo Interno.

A reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo produto HCV ELiTe MGB Kit em associação com o sistema **ELiTe BeGenius** foi testada através da análise de um painel de amostras de plasma. O painel incluiu uma amostra negativa e duas amostras reforçadas com material de referência certificado de HCV (6.ª Norma internacional da OMS, NIBSC) a uma concentração de 3 x LoD (cerca de 78 IU/mL) e de 10 x LoD (cerca de 260 IU/mL).

A reprodutibilidade foi obtida através da análise de amostras de painel em quatro réplicas, numa execução por dia, em dois dias por instrumento. Foram usados três lotes diferentes do produto com três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELiTe BeGenius® no modo "Extract + PCR".

Os valores de Ct do alvo e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a reprodutibilidade como imprecisão.

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

HCV ELiTe MGB® Kit
reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Reprodutibilidade inter-instrumento								
Amostra	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 24	Indet.	-	-	72 / 72	28,57	0,5529	1,94
3 x LoD	23 / 23	37,99	0,6797	1,79				
10 x LoD	24 / 24	36,54	0,6210	1,70				

Capacidade de reprodução entre lotes								
Amostra	HCV				Controlo Interno			
	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV
Negativo	0 / 24	Indet.	-	-	72 / 72	28,43	0,41	1,45
3x o LoD	24 / 24	37,95	0,75	1,97				
10x o LoD	24 / 24	36,35	0,62	1,71				

No teste de Reprodutibilidade, o ensaio detetou o alvo de HCV como esperado e mostrou valores de Ct com %CV abaixo de 5% para HCV e o Controlo Interno.

Fator de conversão para unidades internacionais

O fator de conversão, para exprimir os resultados quantitativos em Unidades internacionais (IU)/mL a partir de cópias/mL, foi calculado com recurso a um painel de quatro diluições (Registo 0,5 entre diluições) do material de referência calibrado certificado "6.ª Norma internacional HCV da OMS (NIBSC) no plasma colhido em EDTA com teste negativo para ARN de HCV.

Cada ponto do painel foi testado em 27 réplicas com três lotes de produto diferentes, em três instrumentos diferentes, em três dias diferentes. As amostras foram processadas em posições aleatórias no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR" (Extração + PCR).

O fator de conversão foi calculado pela análise da diferença de concentração logarítmica entre o título de referência em IU/mL e os resultados obtidos em cópias/mL e é igual a 2,4 IU/cópia.

Na tabela seguinte é apresentado um resumo dos resultados.

Fator de conversão para unidades internacionais, Fc = 2,4 IU/cópia						
IU/mL	Amostra			Resultado		
	IU/mL de Registo	N	Média c. / mL	Média IU / mL	Média Registo IU / mL	Log diferença (ref. - teste)
31623	4,5000	27	13233	31254	4,4807	+0,0193
10000	4,0000	27	4482	10595	4,0133	-0,0133
3162	3,5000	27	1414	3342	3,5091	-0,0091
1000	3,0000	27	439	1036	2,9969	+0,0031

Como a equivalência entre o plasma colhido em EDTA, Plasma ACD e Soro foi demonstrada (consulte Equivalência da matriz e Intervalo de medição linear), o fator de conversão pode ser aplicado às três matrizes.

O fator de conversão, para exprimir os resultados quantitativos em Unidades internacionais (IU)/mL a partir de cópias/mL, foi verificado nos sistemas **ELiTe BeGenius** e **ELiTe InGenius** com recurso a um painel de diluições (0,5 Log entre diluições) do material de referência calibrado certificado ("6.ª Norma internacional da OMS, NIBSC) em plasma colhido em EDTA testado negativo para ARN de HCV. O painel era constituído por cinco pontos de diluição a partir de cerca de 4,5 Log IU/mL a 2,5 Log IU/mL. Cada ponto do painel foi testado em 4 réplicas.

A precisão da quantificação do alvo, como um desvio padrão de Log IU/mL, foi menor que 0,5 Log.

A precisão da quantificação do alvo, como uma diferença entre as concentrações teóricas e medidas em Log IU/mL, foi menor que 0,5 Log.

Estes resultados confirmaram o fator de conversão calculado para amostras de plasma com o **ELiTe InGenius**.

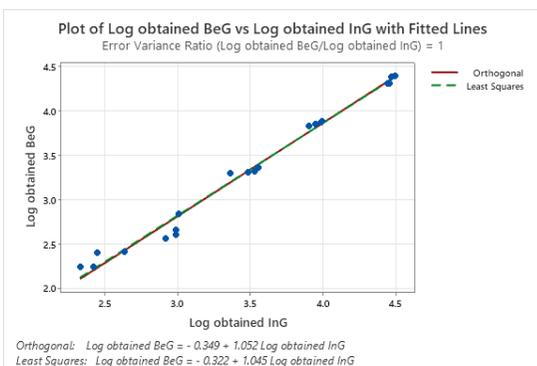
Os resultados obtidos pelo **ELiTe InGenius** e **ELiTe BeGenius** e os métodos de referência foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação entre os métodos.

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.

HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING



A análise de regressão ortogonal gerou uma interseção igual a 0,3494 (95% CI: - 0,5546; - 0,1442) e um declive igual a 1,0523 (95% CI: 0,9943 – 1,1103). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,985.

Reprodutibilidade com material de referência

A capacidade de reprodução dos resultados do ensaio comparada com os resultados obtidos com recurso a outros métodos em laboratórios diferentes, foi verificada através de testes ao painel de estudo de proficiência "Programa EQA de ARN do vírus Hepatite C QCMD 2020 (Qnostics).

Cada ponto do painel foi testado no sistema ELiTe InGenius no modo "Extract + PCR".

Os valores de quantidade do consenso dos sistemas comerciais de amplificação em tempo real foram comparados com os resultados do ensaio, para avaliar a precisão como bias.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Painel HCV QCMD 2020		Resultados do consenso	Resultados de testes	Diferença (cons. – teste)
ID da amostra	Conteúdo da amostra	Registo IU/mL	Registo IU/mL	
HCVRNA101S-01	Genótipo HCV 3a	3,3040	3,5794	-0,2754
HCVRNA101S-02	Genótipo HCV 3a	2,3130	2,2375	0,0755
HCVRNA101S-03	Genótipo HCV 1b	2,8600	3,0532	-0,1932
HCVRNA101S-04	Genótipo HCV 1b	2,8370	2,7850	0,0520
HCVRNA101S-05	HCV negativo	não detetado	não detetado	N.A.
HCVRNA101S-06	Genótipo HCV 1b	3,8500	3,8352	0,0148
HCVRNA101S-07	Genótipo HCV 1b	3,3730	3,4432	-0,0702
HCVRNA101S-08	Genótipo HCV 1b	1,7880	1,6812	0,1068

Neste teste, o ensaio detetou corretamente todos os membros do painel. As sete amostras positivas foram quantificadas dentro do intervalo de consenso $\pm 0,5$ Registo IU/mL.

Sensibilidade de diagnóstico: correlação do método

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como correlação dos resultados obtidos com diferentes métodos, foi avaliada através da análise de pacientes clínicos positivos para ARN de HCV sujeitos a terapia antiviral e dentro do intervalo de medição do Kit HCV ELiTe MBG e de métodos de referência de diagnóstico molecular com marcação CE IVD ("cobas® HCV para utilização nos sistemas 4800" e "cobas® HCV para utilização nos sistemas 6800", Roche Diagnostics, Cobas HCV). Dado que o ELiTe BeGenius tem desempenhos analíticos equivalentes ao ELiTe InGenius, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a sensibilidade do diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELiTe InGenius também se aplica ao ELiTe BeGenius.

O estudo de correlação foi realizado em dois locais diferentes nas seguintes 128 amostras de plasma colhido em EDTA:

- local 1: 96 amostras clínicas positivas para ARN de HCV de plasma colhido em EDTA,
- local 2: 32 amostras clínicas positivas para ARN de HCV de plasma colhido em EDTA,

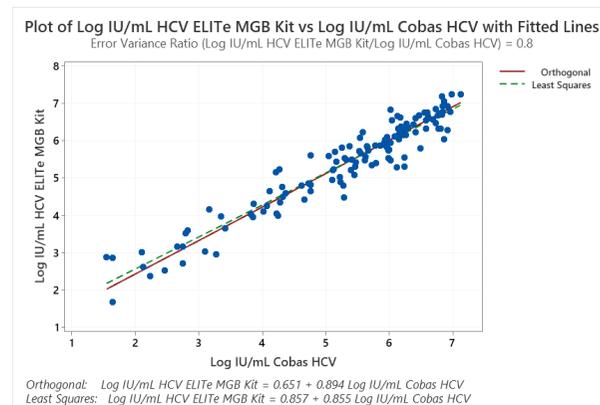
HCV ELiTe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, transcrição reversa, amplificação, deteção e interpretação de resultados pelos produtos ELiTechGroup S.p.A. e pelos métodos de referência. Os resultados obtidos pelo Kit HCV ELiTe MBG e os métodos de referência foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação entre os métodos.

Os resultados estão resumidos na figura seguinte.



Neste teste, a análise da regressão Deming gerou um declive igual a 0,894 (95% CI: 0,846 - 0,941) e uma interseção igual a 0,651 (95% CI: 0,391 – 0,911). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,916.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como percentagem de acordo negativo dos resultados obtidos com diferentes métodos, foi avaliada através da análise de amostras clínicas negativas para ARN de HCV testadas por métodos de referência de diagnóstico molecular com marcação CE IVD ("cobas® HCV para utilização nos sistemas 4800" e "cobas® HCV para utilização nos sistemas 6800", Roche Diagnostics, Cobas HCV). Dado que o ELiTe BeGenius tem desempenhos analíticos equivalentes ao ELiTe InGenius, os desempenhos de diagnóstico do ensaio realizados nos dois instrumentos também foram considerados equivalentes. Por conseguinte, a especificidade de diagnóstico do ensaio obtido em associação com o ELiTe InGenius também se aplica ao ELiTe BeGenius.

O estudo de especificidade de diagnóstico foi realizado em dois locais diferentes nas seguintes 135 amostras de plasma colhido em EDTA:

- local 1: 100 amostras clínicas negativas para ARN de HCV de plasma colhido em EDTA.
- local 2: 35 amostras clínicas negativas para ARN de HCV de plasma colhido em EDTA.

Cada amostra foi testada através da realização de todo o procedimento de análise, extração, transcrição reversa, amplificação, deteção e interpretação de resultados pelos produtos ELiTechGroup S.p.A.. Os resultados obtidos pelo Kit HCV ELiTe MBG foram analisados para calcular a percentagem de acordo negativo com os métodos de referência.

Os resultados, após análise da discrepância, estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Positivo	Negativo	Invlido	Especificidade do diagnóstico
Plasma negativo para ARN de HCV colhido em EDTA	135	0	135	0	100%

Neste teste, todas as amostras foram confirmadas negativas. A especificidade de diagnóstico do Kit HCV ELiTe MBG foi igual a 100%.

O valor-limite da Ct do controlo interno (Ct CI) está definido para 31.

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e os instrumentos estão registados na Secção 7 do Ficheiro técnico do produto "HCV ELITe MGB Kit", FTP 601ING.

REFERÊNCIAS

- P. Halfon et al. (2006) *J Clin Microbiology* **44**: 2507 – 2511
 E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**: e30
 K. Linnet et al. (2004) *Clin. Chem.* **50**: 732 - 740.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: Plasma colhido em EDTA ou ACD, Soro.

Plasma colhido em EDTA ou em ACD e Soro podem ser obtidos a partir de sangue total armazenado a +2/+25 °C durante um máximo de 24 horas.

Não use Plasma colhido em heparina com este produto: a heparina inibe a reação de amplificação de ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não use Plasma hemolítico com este produto: a hemoglobina inibe a reação de amplificação de ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Neste momento não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas, como sangue total.

Este produto não se destina a ser usado como teste de rastreio da presença de HCV no sangue ou em produtos sanguíneos nem como um teste de diagnóstico para confirmar a presença de infeção por HCV.

Os resultados obtidos com este produto dependem de uma identificação, uma recolha, um armazenamento de transporte e um processamento adequados das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com os produtos.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de amplificação em Tempo real usado neste produto é sensível a contaminações cruzadas a partir de amostras positivas, dos controlos positivos e dos mesmos produtos de amplificação. Contaminações cruzadas causadas por falsos resultados positivos. O formato do produto é capaz de limitar contaminações cruzadas. No entanto, as contaminações cruzadas podem ser evitadas simplesmente através de boas práticas laboratoriais e do cumprimento destas instruções de utilização.

Este produto deve ser manuseado por pessoal qualificado e com formação no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário e áreas de trabalho que sejam adequados para o processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de preparações químicas classificadas como perigosas, para evitar acidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador e outras pessoas.

Este produto requer o uso de vestuário especial e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Este produto deve ser manuseado por pessoal profissional, qualificado e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

É necessário ter áreas separadas para a preparação da mistura de reação completa e da extração/amplificação/deteção de produtos de amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Devido a diferenças inerentes entre tecnologias, é recomendado que os utilizadores realizem estudos de correlação do método para calcular diferenças tecnológicas antes de mudar para uma nova

HCV ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

tecnologia.

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ARN alvo não foi detetado no ARN extraído da amostra; mas não pode negligenciar-se o facto de o ARN alvo ter um título mais baixo que o limite de deteção do produto (Ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto podem, por vezes, ser inválidos devido a uma falha do Controlo Interno. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada, começando pela extração, o que pode originar um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos, inserções ou eliminações na região do ARN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção e quantificação do ARN alvo.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados tendo em conta todos os dados clínicos e outros testes laboratoriais efetuados ao doente.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos obtidos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou ainda mais reduzido. Em alguns casos, este risco residual pode contribuir para decisões erradas com potenciais efeitos perigosos para o doente.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Reação de Q-PCR Standard ou reação de Positive Control inválida	
Curva standard inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa, dos Q-PCR Standards e do Positive Control. Verifique os volumes da mistura de reação completa, dos Q-PCR Standards e do Positive Control.
Erro na preparação da mistura de reação completa.	Verifique os volumes dos reagentes usados durante a preparação da mistura de reação completa.
Degradação da mistura de reação completa ou dos seus subcomponentes.	Não use a mistura de reação completa durante mais de três sessões (7 horas na Área do Inventário). Não deixe a RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Não deixe a mistura de reação completa à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos. Utilize uma nova alíquota de subcomponentes.
Degradação dos Q-PCR Standards ou do Controlo Positivo.	Não use o Q-PCR Standard durante mais de 2 sessões independentes (2 horas cada na área de Extração). Não use o Controlo Positivo (Positive Control) para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na área de extração). Use novas alíquotas dos Q-PCR Standards ou do Controlo positivo (Positive Control).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Reação de Controlo Negativo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e do Negative Control. Verifique os volumes da mistura de reação completa e do Negative Control.
Contaminação da mistura de reação completa ou dos respetivos subcomponentes.	Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Contaminação do Negative Control.	Não use o Controlo Negativo para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.
Contaminação da área de extração, de Racks ou do Inventory Block.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e da amostra. Verifique os volumes da mistura de reação completa e da amostra.
Erro na preparação da mistura de reação completa.	Verifique os volumes dos reagentes usados durante a preparação da mistura de reação completa.
Degradação da mistura de reação completa ou dos seus subcomponentes.	Não use a mistura de reação completa durante mais de três sessões (7 horas na Área do Inventário). Não deixe a mistura de reação completa à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos. Não deixe a RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de subcomponentes.
Degradação do modelo de Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias que interferem na amostra.	Repita a amplificação com uma diluição de 1:2 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR only". Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de qualidade para biologia molecular da amostra numa sessão "Extract + PCR" (Extração + PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

HCV ELITE MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

REF RTK601ING

Erro 30103	
Causas possíveis	Soluções
Concentração demasiado alta do alvo na amostra.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - seleccione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado. Se for necessário um valor Ct: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (apenas PCR) ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR" (Extração + PCR).

Erro TH, Erro SDM, Erro Ct	
Causas possíveis	Soluções
Amostra com formato anómalo do traçado.	Se for observada uma amplificação significativa no lote PCR que produz o erro: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "PCR Only" (apenas PCR) ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extract + PCR" (Extração + PCR).

HCV ELITe MGB® Kit
reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em
tempo real

REF RTK601ING

SÍMBOLOS

REF

Número do catálogo.



Limite máximo da temperatura.

LOT

Código do lote.



Usar até (último dia do mês).

IVD

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.



Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Certificação publicada pela DEKRA Certification B.V., Holanda.



Contém suficiente para "N" testes.



Atenção, consulte as instruções de utilização.

CONT

Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

HCV ELITe MGB® Kit
reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em
tempo real

REF RTK601ING

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes produzidos pela Thermo Fisher Scientific e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Thermo Fisher Scientific. O preço de compra deste produto inclui direitos exclusivos, não transmissíveis, de utilização apenas desta quantidade do produto exclusivamente para atividades do comprador que estejam diretamente relacionadas com diagnósticos em humanos. Para obter mais informações sobre a aquisição de uma licença deste produto para outros fins que não os acima indicados, contacte o Licensing Department, Thermo Fisher Scientific. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais números de patente dos EUA 6.127.121, 6.485.906, 6.660.845, 6.699.975, 6.727.356, 6.790.945, 6.949.367, 6.972.328, 7.045.610, 7.319.022, 7.368.549, 7.381.818, 7.662.942, 7.671.218, 7.715.989, 7.723.038, 7.759.126, 7.767.834, 7.897.736, 8.008.522, 8.067.177, 8.163.910, 8.389.745, 8.969.003, 8.980.855, 9.056.887, 9.085.800, 9.169.256 e números de patente EP 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 bem como os pedidos que estejam atualmente pendentes.

A tecnologia ELITe InGenius e ELITe BeGenius está protegida por patentes e pedidos de patentes.

Esta licença limitada permite à pessoa ou entidade legal à qual este produto foi fornecido, usar o produto e os dados gerados pela utilização do produto, apenas para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

TaqMan™ é uma marca comercial da Thermo Fisher Scientific.
cobas® é uma marca comercial registada da Roche Diagnostics.
ELITe MGB®, o logotipo ELITe MGB® e ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas comerciais registadas do ELITechGroup na União Europeia.



Caution, this document is a simplified version of the official instruction for use. This document is available only in English. Please refer to the complete document before use: www.elitechgroup.com

Intended use

The “HCV ELITe MGB® Kit” product is quantitative nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the detection and the quantification of the RNA of Hepatitis C Virus (HCV) in RNA samples extracted from clinical specimens.

The assay is able to detect the RNA of HCV belonging to 1, 2, 3, 4, 5 and 6 genotypes.

The assay is validated in association with “ELITe InGenius®” and “ELITe BeGenius®” system starting from human plasma collected in EDTA or in ACD and serum samples.

The product is intended for use as an aid in the management of HCV-infected individuals undergoing antiviral therapy, together with patient’s clinical data and other laboratory test results.

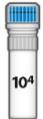
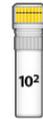
Amplified sequence

Sequence	Gene	Fluorophore	Channel
Target	HCV (5' UTR region)	FAM	HCV
Internal Control	MS2 phage	AP525	IC

Validated matrix

- › Plasma EDTA
- › Plasma ACD
- › Serum

Kit content

HCV ELITe MGB Mix		HCV ELITe Standard		HCV - ELITe Positive Control	HCV Internal Control			
 X 4	 X 2					X 1	 X 2	 X 8
HCV PCR Mix 4 tubes of 600 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles	RT Enzyme Mix 2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	Ready-to-use Calibrators: 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² 1 set of 4 tubes of 160 µL 2 freeze-thaw cycles		Ready-to-use PC 2 tubes of 160 µL 8 reactions per kit 4 freeze-thaw cycles	Ready-to-use IC 8 tubes of 160 µL 96 extractions per kit 12 freeze-thaw cycles			

Maximum shelf-life: **18 months**

Storage Temperature: **-20 °C**

Material required not provided in the kit

- › ELITe InGenius instrument: INT030
- › ELITe InGenius SP 1000 Extraction Cartridge: INT033SP1000
- › ELITe InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITe InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS
- › ELITe InGenius Waste Box: F2102-000
- › Filter Tips 300: TF-350-L-R-S
- › 1000 µL Filter Tips Tecan : 30180118

ELITe InGenius protocol

› Sample volume	600 µL	› Unit of quantitative result	International Unit: IU/mL
› HCV CPE volume	10 µL	› Conversion factor to IU	2.4 IU/copy
› Total elution volume	50 µL	› Frequency of controls	15 days
› PCR elution input volume	20 µL	› Frequency of calibration	60 days
› HCV PCR Mix volume	20 µL		

Performance

Matrix	Limit of Detection	Method Correlation	Diagnostic Specificity
Plasma / Serum	26 IU / mL 11 copies / mL	R² = 0.916 128 quantified samples	100% 135 confirmed samples / 135 tested samples

reference methods:

“cobas® HCV for use on the 4800 Systems” and

“cobas® HCV for use on the 6800 Systems”, Roche Diagnostics.

Sample preparation

Plasma samples collected in EDTA or ACD and Serum samples must be identified according to laboratory guidelines, transported and stored at room temperature (~+25 °C) for a maximum of three days or at +2 / +8 °C for a maximum of five days. Otherwise, they must be frozen and stored at ~-20 °C for a maximum of one month or at ~-70 °C for six months. Do not use Plasma collected in heparin in order to prevent inhibition of amplification reaction and frequent invalid results.

ELITE InGenius Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius.
Log in with username and password.
Select the mode "Closed".

2. Verify calibrators: **HCV Q-PCR Standard** in the "Calibration" menu.
Verify controls: **HCV Positive Control** and **HCV Negative Control** in the "Controls" menu.
Note: Both must have been run, approved and not expired.

3. Thaw the **HCV PCR Mix** and the **HCV CPE** tubes.
Vortex gently.
Spin down 5 sec.
Keep the **RT EnzymeMix** in ice

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HCV PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL

5. Vortex gently
Spin down 5 sec
Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen

2. Verify the extraction volumes:
Input: "1000 µL", elution: "50 µL"

3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID

4. Select the "Assay protocol" of interest: HCV ELITE_PL_600_50 or HCV ELITE_Se_600_50

5. Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube

6. Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the inventory block

7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube"

6. Load the complete reaction mixture in the inventory block

7. Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid

8. Close the door
Start the run

9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above

5. Select the method "Extraction Only" and set the sample position: Extraction Tube

6. Load the Internal Control in the inventory block

7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction Tube racks

8. Close the door
Start the run

9. Archive the eluate sample

ELITE BeGenius Procedures

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

Before analysis

- Switch on ELITE InGenius. Log in with username and password. Select the mode "Closed".
- Verify calibrators: **HCV Q-PCR Standard** in the "Calibration" menu. Verify controls: **HCV Positive Control** and **HCV Negative Control** in the "Controls" menu.
Note: Both must have been run, approved and not expired.
- Thaw the **HCV PCR Mix** and the **HCV CPE** tubes. Vortex gently. Spin down 5 sec. Keep the **RT EnzymeMix** in ice

4. Prepare the complete reaction mixture

Sample Number (N)	HCV PCR Mix	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0.3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 11$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0.3 \mu\text{L}$
$N = 12$	290 μL	4.4 μL

- Vortex gently
Spin down 5 sec
Keep the complete reaction mixture in ice. Do not expose to direct light.

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

- Select "Perform Run" on the touch screen
- Verify the extraction volumes: Input: "600 μL ", elution: "50 μL "
- Scan the sample barcodes with handheld barcode reader or type the sample ID
- Select the "Assay protocol" of interest: HCV ELITE_Be_PL_600_50 or HCV ELITE_Be_Se_600_50
- Select the method "Extract + PCR" and the sample position: Extraction Tube
- Load the complete reaction mixture and the Internal Control in the inventory block
- Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip Cassette, Extraction Tube racks
- Close the door
Start the run
- View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

- 1 to 4:** Follow the Complete Run procedure described above
- Select the method "PCR only" and set the sample position "Elution Tube"
- Load the complete reaction mixture in the inventory block
- Load: PCR cassette rack and the Elution tube rack with the extracted nucleic acid
- Close the door
Start the run
- View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

- 1 to 4:** Follow the Complete Run procedure described above
- Select the method "Extraction Only" and set the sample position: Extraction Tube
- Load the Internal Control in the inventory block
- Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette, Extraction Tube racks
- Close the door
Start the run
- Archive the eluate sample