Instructions for use

CMV RNA ELITe MGB® Kit

---

reagentes para transcrição reversa de ARN e PCR em tempo real

ELITechGroup
A BRUKER COMPANY

REF RTS115ING

UDI 08033891487324

CE 0123

IVD

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

<table>
<tr><th>Rev.</th><th>Aviso de alteração</th><th>Data (dd/ /mm/aa)</th></tr>
<tr><td>05</td><td>Atualização do parágrafo: “Outros produtos necessários”
Atualização do parágrafo: “Notificação para os utilizadores”
Atualização do parágrafo: “Referências”</td><td>04/09/25</td></tr>
<tr><td>04</td><td>Extensão da utilização do produto por um período de 60 dias após a primeira abertura.
Alteração de tubos e tampas para melhoria do processo.</td><td>03/06/25</td></tr>
<tr><td>03</td><td>Alargamento da utilização com o ELITe BeGenius
Novos gráficos e definição de conteúdos das instruções de utilização.</td><td>29/11/24</td></tr>
<tr><td>02</td><td>Atualização para conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746 em matéria de requisitos de dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVDR).
NOTE
Os números de lote indicados na tabela seguinte, e que ainda se encontram no mercado como Research Use Only (RUO) (utilização apenas para pesquisa), não serão objeto de recolha. Estes produtos podem ser utilizados de acordo com o prazo de validade abaixo indicado. Se tiver estes lotes, utilize-os de acordo com a utilização prevista descrita nas instruções de utilização RUO e apenas em associação com os respetivos produtos STD115ING e CTR115ING (também em formato RUO). Entre em contacto com o pessoal da ELITechGroup para obter instruções de utilização RUO.
<table>
<tr><th>REF. PRODUTO</th><th>Número de lote</th><th>Data de expiração</th></tr>
<tr><td>RTS115ING</td><td>U0524-001</td><td>31/03/2025</td></tr>
<tr><td>RTS115ING</td><td>U1123-075</td><td>31/01/2025</td></tr>
</table>
Não utilize o novo produto RTS115ING comercializado como CE-IVDR juntamente com os respetivos produtos STD115ING e CTR115ING ainda em formato RUO
A utilização do novo produto RTS115ING comercializado como CE-IVDR requer a utilização dos respetivos protocolos de ensaio CE-IVD. Entre em contacto com a equipa da ELITechGroup para obter todas as informações adicionais necessárias.</td><td>03/06/24</td></tr>
<tr><td>00–01</td><td>desenvolvimento de novo produto e alterações subsequentes</td><td>-</td></tr>
</table>

ÍNDICE

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA 4
2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO 4
3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO 4
4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO 5
5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO 5
6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS 5
7 AVISOS E PRECAUÇÕES 6
8 AMOSTRAS E CONTROLOS 7
9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius 9
10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius 17
11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO 24
12 REFERÊNCIAS 34
13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO 35
14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS 36
15 SÍMBOLOS 39
16 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES 39
17 NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA 39
Appendix A QUICK START GUIDE 41

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **CMV RNA ELITe MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de transcrição reversa e PCR em tempo real de ácidos nucleicos quantitativa para a deteção e a quantificação do **mARN do virião do citomegalovírus humano (ARN do CMV)**, extraído de amostras clínicas não-celulares.

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®**, sistemas automatizado e integrado para a extração, transcrição reversa, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de plasma colhido em EDTA.

O produto destina-se a ser utilizado como auxiliar na monitorização da infeção por CMV em indivíduos infetados por CMV submetidos a terapia antiviral com inibidores do complexo terminase do CMV.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Este produto não se destina a ser utilizado para detetar a presença, a exposição ou o rastreio de agentes transmissíveis no sangue, componentes sanguíneos, células, tecidos, órgãos ou quaisquer dos seus derivados, a fim de avaliar a sua adequação para transfusão, transplante ou administração de células. Este produto não se destina a ser utilizado para o rastreio de CMV em mulheres grávidas.

2 PRINCÍPIOS DO ENSAIO

Este é um ensaio quantitativo de transcrição reversa e PCR em tempo real de um passo para a deteção de ARN do CMV de amostras, retrotranscritas e, em seguida, amplificadas usando uma mistura de reação completa que contém primers e sondas com tecnologia ELITe MGB®.

As sondas ELITe MGB são ativadas quando hibridizam com os correspondentes produtos da PCR. **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** monitorizam o aumento da fluorescência e calculam os ciclos de limite (Ct) e as temperaturas de fusão (Tm). A quantidade de ARN do CMV é calculada com base numa curva de calibração armazenada.

Nas sondas ELITe MGB, os fluoróforos são inativados no estado de cadeia única de espiral aleatória da sonda. Os fluoróforos são ativados no duplex amplicon / sonda dado que o inativador está espacialmente separado do fluoróforo. Ressalva-se que o fluoróforo não é clivado durante a PCR e pode ser utilizado para a análise da dissociação e o cálculo da temperatura de fusão.

3 DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **CMV RNA ELITe MGB Kit** fornece os seguintes componentes:

- **CMV-RNA PCR Mix,** uma mistura de PCR otimizada e estabilizada que contém primers e sondas específicos para:

- UL21.5 mRNA (região de splicing), detetado no canal **ARN do CMV;** a sonda é estabilizada por MGB, extinto pelo Eclipse Dark Quencher® e é marcada com corante FAM.

- Internal Control (**IC**), específico para uma região do ARN genómico**MS2**do fago, detetado no Canal**IC;**a sonda é estabilizada pelo MGB, extinta pelo Eclipse Dark Quencher e identificada pelo corante AquaPhluor® 525 (AP525).

A**CMV RNA PCR Mix**também contém tampão, cloreto de magnésio, trifosfatos de nucleótido e hot-start DNA Polimerase. Cada tubo contém**600 µL**de solução e é suficiente para**24 testes**, se processar, pelo menos, 5 amostras por sessão.

- **RT EnzymeMix,** uma mistura otimizada e estabilizada de enzimas para a transcrição reversa. Cada tubo contém**20 µL**de solução e é suficiente para**48 testes**, se processar, pelo menos, 5 amostras por sessão.

O**CMV RNA ELITe MGB Kit**contém reagentes suficientes para**96 testes no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius**, com 20 µL de**CMV RNA PCR Mix**e 0,3 µL de**RT EnzymeMix**usados por reação.

4 MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Table 1

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
CMV RNA PCR Mix ref. RTS115ING	Mistura de reagentes para a transcrição reversa e PCR em tempo real em tubo com **tampa NATURAL**	4 x 600 µL	-
RT EnzymeMix ref. RTS003-RT	Enzimas de transcriptase reversa no tubo com a **tampa com a inserção PRETA**	2 x 20 µL	-

5 MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

- Câmara de fluxo laminar.

- Luvas de nitrilo sem pó descartáveis ou material semelhante.

- Misturador de vórtice.

- Microcentrífuga de bancada (~5.000 RPM).

- Microcentrífuga de bancada (~13.000 RPM).

- Micropipetas e pontas esterilizadas com filtro de aerossóis ou pontas esterilizadas de deslocação positiva (intervalo de volume: 0,5 - 1000 µL).

- Tubos com tampa de parafuso esterilizados de 2,0 mL (Sarstedt, ref. 72.694.005).

- Tubos com tampa de parafuso esterilizados de 0,5 mL (Sarstedt, ref. 72.730.005).

- Água de grau de biologia molecular.

6 OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração da amostra, o controlo interno da extração e inibição, o positive control e o negative control de amplificação, os standards de ADN e os consumíveis **não** são fornecidos com este produto.

Para a extração automática de ácidos nucleicos, transcrição reversa, a PCR em tempo real e a interpretação dos resultados das amostras, são necessários os produtos seguintes:

Table 2

Instrumentos e software	Produto e reagentes
ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A., EG SpA ref. INT030) **ELITe InGenius Software** versão 1.3.0.19 (ou superior) **CMVRNA ELITe_STD**, protocolo do ensaio com parâmetros para a análise dos Calibradores **CMVRNA ELITe_PC**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Positive Control **CMVRNA ELITe_NC**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control **CMVRNA ELITe_PL_600_50**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma	**CMV RNA ELITe Standard** (EG SpA, ref. STD115ING) **CMV RNA - ELITe Positive Control** (EG SpA, ref. CTR115ING) **CPE - Internal Control** (EG SpA, ref. CTRCPE) **ELITe InGenius SP 1000** (EG SpA, ref. INT033SP1000) Consumíveis **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (ver instruções de utilização do ELITe InGenius e do ELITe BeGenius)
ELITe BeGenius (EG SpA ref. INT040) **ELITe BeGenius Software** versão 2.3.0 (ou superior) **CMVRNA ELITe_Be_STD**, protocolo do ensaio com parâmetros para a análise dos Calibradores **CMVRNA ELITe_Be_PC**, Protocolo de Ensaio com parâmetros para análise do Positive Control **CMVRNA ELITe_Be_NC**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise do Negative Control **CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50**, protocolo de ensaio com parâmetros para análise de amostra de plasma	

7 AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto foi concebido para utilização exclusiva in-vitro.

7.1 Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem infeciosas. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Tubos, pontas e outros 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.

Manuseie e elimine todos os reagentes e todos os materiais usados na realização do ensaio como se fossem infeciosos. 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 resíduos líquidos que contenham ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação. Não permita que os reagentes de extração entrem em contacto com hipoclorito de sódio (lixívia).

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 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.

7.2 Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem profissionais qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos na amostra ou à contaminação da amostra por produtos da PCR.

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, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os reagentes devem ser manuseados sob uma câmara de fluxo laminar. 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, estar livres de DNases e RNases e livres de ADN e ARN.

Os produtos da extração têm de ser manuseados com vista a impedir a dispersão no meio ambiente e a evitar a contaminação da área de trabalho do instrumento.

A PCR Cassette deve ser manuseada com cuidado e nunca deve ser aberta, para evitar a difusão e a contaminação por transferência.

7.3 Avisos e precauções específicos para os componentes

Table 3

Componente	Temperatura de armazenamento	Utilização a partir da primeira abertura	Ciclos de congelação/ /descongelação
CMV RNA PCR Mix	-20 °C ou menos (ao abrigo da luz solar)	60 dias	até cinco
RT EnzymeMix	-20°C ou inferior	60 dias	até dez vezes, durante até dez minutos a +2 / +8 ° C

8 AMOSTRAS E CONTROLOS

8.1 Amostras

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** com amostras clínicas não celulares identificadas e manuseadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes:

Table 4

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte / armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	**+2 / +8 °C**	**-20 ±10 °C**	**-70 ±15 °C**
Plasma	EDTA	≤ 24 horas	≤ 24 horas	≤ 1 mês	Não testado

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

NOTE

As amostras de sangue total para a preparação do plasma devem ser colhidas em EDTA, transportadas e armazenadas à temperatura ambiente ou a +2 / +8 °C durante um máximo de 24 horas antes da centrifugação.

Para realizar os testes de amostras no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius, devem ser usados os seguintes protocolos de ensaio. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os ELITe MGB Kits e o ELITe InGenius ou ELITe BeGenius com as matrizes indicadas.

Table 5 Protocolos de ensaio para CMV RNA ELITe MGB Kit

Amostra	Instrumento	Nome do protocolo de ensaio	Relatório	Características
plasma EDTA	**ELITe InGenius**	**CMVRNA ELITe_PL_600_50**	cópias/mL /	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
	ELITe BeGenius	**CMVRNA ELITe_Be_PL_ 600_50**	cópias/mL	Volume de entrada da extração: 600 µL Volume de eluição da extração: 50 µL Internal Control: 10 µL Fator de diluição: 1,0 Volume de PCR Mix: 20 µL Volume de entrada de PCR da amostra: 20 µL

Para todos os protocolos, 600 µL de amostra de plasma devem ser transferidos para o **Extraction Tube** (Tubo de extração) (para o ELITE InGenius) ou para o tubo Sarstedt de 2 mL (para o ELITE BeGenius).

NOTE

A pipetagem de amostras para o **Extraction Tube** (Tubo de extração) ou para o tubo Sarstedt de 2 mL pode **gerar contaminação.** Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção “Advertências e precauções”.

Os ácidos nucleicos purificados podem ser deixados à temperatura ambiente durante 16 horas e armazenados a -20 ºC ou abaixo durante não mais de um mês.

Não use plasma colhido em heparina, a qual é um conhecido inibidor da transcrição reversa e da PCR

Consulte "Substâncias Potencialmente Interferentes" na secção 11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 24 para verificar os dados relativos a substâncias interferentes.

8.2 Calibradores e controlos da PCR

A curva de calibração tem de ser gerada e aprovada para cada lote de reagente de PCR.

- Para a curva de calibração, utilize os quatro níveis de produto **CMV RNA ELITe Standard** (não fornecido com este kit) com os protocolos do ensaio **CMVRNA ELITe_STD** ou **CMVRNA ELITe_Be_STD**.

Os resultados do controlo da PCR têm de ser gerados e aprovados para cada lote de reagente de PCR.

- Para o Positive Control, use o produto **CMV RNA - ELITe Positive Control** (não fornecido com este kit) com os protocolos de ensaio **CMVRNA ELITe_PC** ou **CMVRNA ELITe_Be_PC**.
- Para o Negative Control, utilize água de grau biológico molecular (não fornecida com este kit) com os protocolos de ensaio **CMVRNA ELITe_NC** ou **CMVRNA ELITe_Be_NC**.

NOTE

O **ELITe InGenius** e o **ELITe BeGenius** permitem a geração e o armazenamento da curva de calibração e a validação do controlo de PCR para cada lote de reagente de PCR.

As curvas de validação expiram após **60 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar a calibração. Os resultados do controlo da PCR expiram após **15 dias** e, nesse momento, é necessário voltar a executar os Positive Controls e Negative Controls.

Os Calibradores e os Controlos da PCR devem ser novamente testados se ocorrer algum dos seguintes eventos:

- se for usado um novo lote de reagentes,
- os resultados da análise de controlo da qualidade se encontrarem fora da especificação (ver o parágrafo seguinte),
- for realizada qualquer reparação ou manutenção significativa no **ELITe InGenius** ou **ELITe BeGenius**.

8.3 Controlos da qualidade

Recomenda-se a verificação do procedimento de extração e PCR. Podem ser usadas amostras arquivadas ou material de referência certificado. Os controlos externos devem ser usados em conformidade com as organizações de acreditação locais, estatais e federais, consoante aplicável.

9 PROCEDIMENTO do ELITe InGenius

O procedimento para uso do**CMV RNA ELITe MGB Kit** com o **ELITe InGenius** é composto por três passos:

Table 6

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
		C) Execução da calibração (PCR Only [Apenas PCR])
		D) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação da Curva de calibração
		2) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		3) Validação dos resultados das amostras
		4) Elaboração do relatório do resultado da amostra

9.1 PASSO 1 – Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe InGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),
- - no menu “Calibração” na página inicial, verifique se os Calibradores (**Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote **PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu “Controlos” na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control**, **Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,

- selecione o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilize os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA. (ver “Amostras e Controlos”).

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

9.2 PASSO 2 – Configuração da sessão

O**CMV RNA ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe InGenius** para realizar:

A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),

B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),

C. Execução de calibração (apenas PCR),

D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).

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

NOTE

O **ELITe InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão do centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

1. Descongele os tubos de **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (5 ou mais testes por sessão). Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto descongela, dado que este reagente é fotossensível.

2. Use os tubos **RT EnzymeMix** necessários. Cada tubo é suficiente para **48 testes** em condições otimizadas (5 ou mais testes por sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

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

3. Prepare um tubo de 2 mL (Sarstedt, ref. 72.694.005, não incluído no kit) para a **mistura de reação completa** e identifique-o com um marcador de tinta permanente.

4. Calcule os volumes necessários de **PCR Mix** e **RT EnzymeMix** para preparar a **mistura de reação completa** com base no número de amostras (N) a serem analisadas, conforme descrito na tabela seguinte.

Table 7

Número de amostras (N)	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. Prepare a **mistura de reação completa** transferindo para o tubo de 2 mL identificado os volumes calculados dos dois componentes. Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

A **mistura de reação completa** pode ser usada dentro de **7** horas se mantida num bloco refrigerado (durante 2 sessões de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão). A mistura de reação completa **não pode** ser armazenada para reutilização.

NOTE

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

Para configurar um dos quatro tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI:

Table 8

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	**B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])**
1	**Identifique amostras** e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Para este ensaio, 600 µL da amostra devem ser transferidos para um Extraction Tube (Tubo de extração) anteriormente identificado. **Descongele** os **tubos de CPE** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	**Descongele o tubo de eluição** contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”.
3	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) apresentado é de 1000 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 50 µL.	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) apresentado é de 1000 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 50 µL.
4	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.	Para cada amostra, atribua um Track e introduza a “SampleID” (SID) digitando ou lendo o código de barras da amostra.
5	**Selecione** o **Assay Protocol** (Protocolo de ensaio) na coluna “Assay” (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o **Assay Protocol** (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay” (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
6	Certifique-se de que o "Protocol" (Protocolo) apresentado é: “Extract + PCR”(Extrair + PCR).	Selecione “PCR Only” (apenas PCR) na coluna “Protocol”.
7	Selecione a posição de carregamento da amostra como “Extraction Tube” ”(Tubo de extração) na coluna “Sample Position” (Posição da amostra). Certifique-se de que o “**Dilution factor**” (Fator de diluição) é “**1,7**”.	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna “Sample Position” (Posição da amostra) é “Elution Tube (bottom row)” (Tubo de eluição [linha inferior]). Certifique-se de que o “**Dilution factor**” (Fator de diluição) é “**1,7**”.
8	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
9	**Carregue a CPE** e a **mistura de reação completa** no “Inventory Block” (Gestor do reagente) consultando a “Load List” (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote do CPE e PCR Mix, data de expiração e número de reações por cada tubo.	**Carregue** a **mistura de reação completa** no “Inventory Block” (Gestor do reagente) consultando a “Load List” (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote da mistura de PCR, data de validade e o número de reações para cada tubo.
10	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.

Table 8 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])
11	Verifique as pontas nos “Tip Racks” (Suporte de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua “Tip Racks”, se necessário.	Verifique as pontas nos “Tip Racks” (Suporte de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua “Tip Racks”, se necessário.
12	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
13	**Carregue** a PCR Cassette, os cartuchos de extração Elite InGenius SP 1000 e todos os consumíveis e amostras necessários para serem extraídos.	**Carregue** a PCR Cassette e os Elution Tubes (Tubos de eluição com as amostras extraídas.
14	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
15	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
16	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

Table 9

	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
1	**Descongele** os **tubos de Q-PCR Standard** necessários (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q--PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	**Descongele os tubos de Positive Control** à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. **Prepare** o **Negative Control** transfirindo pelo menos 50 µL de água de grau biológico molecular para um “Elution tube” (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Selecione “**Perform Run**”(Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “**Perform Run**”(Executar) a partir do ecrã “Home”.
3	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) apresentado é de 1000 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 50 µL.	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) apresentado é de 1000 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 50 µL.
4	Para o Q-PCR Standard, atribua a “Track” (Track), **selecione** o **Assay Protocol** (Protocolo de ensaio) (ver "Amostras e Controlos") na coluna “Assay” (Ensaio) e introduza o número de lote e a data de expiração do reagente.	Para os controlos atribua o “Track”, **selecione** o **Assay Protocol** (Protocolo de ensaio) na coluna “Assay” (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos"). Introduza o número do lote e a data de validade do Positive Control e da água de grau biológico molecular.
5	Certifique-se de que “PCR Only” (apenas PCR) está selecionado na coluna “Protocol”.	Certifique-se de que “PCR Only” (apenas PCR) está selecionado na coluna “Protocol”.
6	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna “Sample Position” (Posição da amostra) é “Elution Tube (bottom row)” (Tubo de eluição [linha inferior]).	Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna “Sample Position” (Posição da amostra) é “Elution Tube (bottom row)” (Tubo de eluição [linha inferior]).
7	**Carregue** a **mistura de reação completa** no “Inventory Block” (Gestor do reagente) consultando a “Load List” (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote da mistura de PCR, data de validade e o número de reações para cada tubo.	**Carregue** a **mistura de reação completa** no “Inventory Block” (Gestor do reagente) consultando a “Load List” (Lista de carregamentos) e introduza o número de lote da mistura de PCR, data de validade e o número de reações para cada tubo.
8	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
9	Verifique as pontas nos “**Tip Racks**” (Suporte de Ponta) na "Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua “Tip Racks”, se necessário.	Verifique as pontas nos “Tip Racks” (Suporte de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua “Tip Racks”, se necessário.
10	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
11	**Carregue** a PCR Cassette e os tubos de Q - PCR Standard.	**Carregue** a PCR Cassette, e os tubos de Positive Control e Negative Control.
12	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
13	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
14	Prima "Start" (Iniciar)	Prima "Start" (Iniciar).

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

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no **Elution tube** (Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C ou menos durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

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

NOTE

No final da execução, o restante **Q - PCR Standard** pode ser removido do instrumento, fechado e guardado a -20 °C ou menos. Evite derramar o Q - PCR Standard.

NOTE

Os **Q-PCR Standard** podem ser usados para 4 sessões separadas de 2 horas cada.

NOTE

No final da execução o restante **Positive Control** deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame do **Positive Control**. O restante **Negative Control** deve ser eliminado.

NOTE

O **Positive Control** pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

NOTE

No final da execução, a **PCR Cassette** e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

9.3 PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

O **ELITe InGenius** monitoriza os sinais de fluorescência do alvo e do controlo interno para cada reação e aplica automaticamente os parâmetros do Assay Protocol (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” (Exibição dos resultados). Neste ecrã são mostrados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” (Relatório da amostra) ou “Track Report” (Relatório da calha)). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

O sistema **ELITe InGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELITe InGenius** gera os resultados com o**CMV RNA ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

1. Validação da Curva de calibração,
2. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control,
3. Validação dos resultados da amostra,
4. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

Validação da Curva de calibração

O ELITe InGenius **software** interpreta os resultados do PCR para o alvo das reações do Calibrador com os parâmetros do protocolo de ensaio **ELITe_STD**. A Ct resultante versus a concentração produz a curva da calibração.

As curvas de calibração, específicas para o lote de reagentes PCR, são registadas na base de dados (Calibração). Podem ser visualizadas e aprovadas pelos utilizadores "Administrador" ou "Analista", seguindo as instruções da interface gráfica do utilizador.

A curva da calibração expira **após 60 dias**.

NOTE

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 de amplificação 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.

Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control da amplificação

O **ELITe InGenius software** interpreta os resultados da PCR para os alvos das reações de Positive Control e Negative Control com os parâmetros dos protocolos de ensaio **ELITe_PC** e **ELITe_NC**. Os valores de Ct resultantes são convertidos em concentrações e usados para validar o sistema (lote de reagente e instrumento).

Os resultados do positive control e negative control, específicos para o lote de reagente de PCR usado, são registados na base de dados (Controlos). Podem ser visualizados e aprovados pelos utilizadores “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista), seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Positive Control e Negative Control expiram **após 15 dias**.

O **software ELITe InGenius** processa os resultados do Positive Control e do Negative Control e gera os Gráficos de Controlo. No caso do Positive Control, são utilizados quatro resultados aprovados para preparar o Gráfico de Controlo inicial. Para controlos subsequentes, os resultados são analisados pelo software para garantir que os desempenhos do sistema se encontram dentro dos critérios de aceitação, mostrados nos traçados do Gráfico de controlo. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

Se o resultado do Positive Control e Negative Control não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem “Failed” (Reprovado) no ecrã “Controls” (Controlos). Neste caso, os resultados não podem ser aprovados e as execuções de Positive Control e Negative Control têm de ser repetidas.

NOTE

Se o Positive Control e Negative Control forem inválidos e as amostras tiverem sido incluídas na mesma execução, as amostras podem ser aprovadas mas os resultados não são válidos. Neste caso, o Controlo(s) e amostras falhados têm todos de ser repetidos.

Validação dos resultados da amostra

O **software ELITe InGenius** interpreta os resultados de PCR para o alvo (canal **CMV RNA**) e o Internal Control (canal **IC**) com os parâmetros do protocolo de ensaio **CMVRNA ELITe_PL_600_50**. Os valores de Ct do alvo resultante são convertidos em concentração.

Os resultados são mostrados no ecrã “Result Display”.

Os resultados da amostra podem ser aprovados quando forem cumpridas as três condições reportadas na tabela abaixo.

Table 10

1) Curva de calibração	**Estado**
CMV RNA Q-PCR Standard	APROVADO
2) Positive Control	**Estado**
CMV RNA Positive Control	APROVADO

Table 10 (continued)

3) Negative Control	Estado
CMV RNA Negative Control	APROVADO

Os resultados da amostra são automaticamente interpretados pelo **software ELITe InGenius** usando os parâmetros do Assay Protocol (Protocolo do ensaio). Estão listadas na tabela abaixo as possíveis mensagens de resultado.

Para cada amostra o sistema comunica uma combinação das seguintes mensagens a especificar se os ARNs dos patogénicos foram detetados ou não detetados.

Table 11

Resultado da execução da amostra	Interpretação
CMV RNA:RNA detected, quantity equal to “XXX” copies/mL (ARN do CMV:ARN detetado, quantidade igual a “XXX” cópias/mL)	**ARN do CMV foi detetado** na amostra no intervalo de medição de ensaio, a sua concentração é mostrada.
CMV RNA:RNA detected, quantity below “LLoQ” copies/ /mL (ARN do CMV:ARN detetado, quantidade abaixo “LLoQ” cópias/mL)	**ARN do CMV foi detetado** na amostra, a sua concentração é inferior ao ensaio Limite inferior de quantificação.
CMV RNA:RNA detected, quantity beyond “ULoQ” copies/mL (ARN do CMV:ARN detetado, quantidade além de “ULoQ” cópias/mL)	**ARN do CMV foi detetado** na amostra, a sua concentração é superior ao ensaio Limite superior de quantificação.
CMV RNA:RNA not detected or below LoD copies/mL (ARN do CMV:ARN não detetado ou abaixo de LdD cópias/mL)	**ARN do CMV não foi detetado** na amostra. A amostra é negativa para ARN do alvo ou a sua concentração está abaixo do limite de deteção do ensaio.
Invalid-Retest Sample (Inválido-Testar novamente a amostra).	**Resultado do ensaio inválido** devido a falha do Internal Control (p. ex., extração incorreta, transferência de inibidores). O teste deve ser repetido.

NOTE

A quantificação do ARN do CMV só pode ser expressa em cópias/mL e não pode ser comparada com a unidade internacional da OMS, uma vez que esta norma se refere ao ADN genómico do CMV.

Amostras reportadas como “Invalid-Retest Sample” (Inválido-Testar novamente a amostra): neste caso, o ARN do Positive Control não foi detetado eficientemente devido a problemas nos passos de colheita, extração, transcrição reversa ou

PCR da amostra (por ex. amostragem incorreta, degradação ou perda do ARN durante a extração ou inibidores no eluato), o 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” (Extrair+PCR) (ver 14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS page 36).

Amostras reportadas como “CMV RNA: RNA Not detected or below LoD copies/mL” (ARN do CMV: ARN não detetado ou abaixo de LdD cópias/mL) são adequadas para análise mas não foi detetado ARN do CMV. Neste caso, a amostra pode ser negativa para ARN do CMV ou o ARN do CMV está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver 11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 24).

Amostras positivas do ARN do CMV a uma concentração abaixo do Limite de Deteção (e Limite Inferior da Quantificação) do ensaio, se detetado, são reportadas como “CMV RNA: RNA detected, quantity below LLoQ copies/mL” (ARN do CMV: ARN detetado, quantidade inferior a LLoQ cópias/mL) (ver 11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 24).

São detetadas amostras positivas de ARN do CMV no Intervalo de Medição Linear (ver 11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO page 24) que são reportadas como “CMV RNA: RNA detected, quantity equal to “XXX” copies / mL” (ARN de CMV:ARN detetado, quantidade igual a “XXX” cópias/mL).

Amostras positivas de ARN do CMV que estão acima do Limite Superior de Quantificação são reportadas como “CMV RNA: RNA detected, quantity beyond ULoQ copies/mL” (ARN de CMV:ARN detetado, quantidade além de ULoQ cópias/mL) e não são adequadas para quantificação. Se necessário a amostra pode ser diluída antes da extração ou PCR e novamente testada de forma a serem obtidos resultados dentro do intervalo de medição linear do ensaio.

NOTE
Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Os resultados da execução da Amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) pelos utilizadores “Administrator” (Administrador) ou “Analyst” (Analista), seguindo as instruções na GUI. A partir da janela “Result Display” (Exibição de resultados) é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como “Sample Report” (Relatório de amostra) e “Track Report” (Relatório de calha).

Elaboração do relatório do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e os relatórios podem ser exportados como "Sample Report" (Relatório da amostra) e "Track Report" (Relatório da calha).

O “Sample Report” (Relatório da amostra) apresenta os detalhes dos resultados pela amostra selecionada (SID).

O “Track Report” (Relatório do track) apresenta os detalhes do resultado pelo Rastreio selecionado.

O "Sample Report" (Relatório da amostra) e o "Track Report" (Relatório da calha) podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

10 PROCEDIMENTO do ELITe BeGenius

O procedimento para uso do**CMV RNA ELITe MGB Kit** com o **ELITe BeGenius** é composto por três passos:

Table 12

PASSO 1	Verificação da prontidão do sistema	
PASSO 2	Preparação da sessão	A) Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR])
		B) Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR])
		C) Execução da calibração (PCR Only [Apenas PCR])
		D) Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
PASSO 3	Revisão e aprovação de resultados	1) Validação da Curva de calibração
		2) Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control
		3) Validação dos resultados das amostras
		4) Elaboração do relatório do resultado da amostra

PASSO 1 - Verificação da disponibilidade do sistema

Antes de iniciar a sessão:

- ligue o **ELITe BeGenius** e inicie sessão no modo “**CLOSED**” (fechado),

- no menu “Calibrações” na página inicial, verifique se os Calibradores (**Q - PCR Standard**) estão aprovados e válidos (Estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja calibradores válidos para o lote **PCR Mix**, realize a calibração conforme descrito nas secções seguintes,
- no menu “Controlos” na página inicial, verifique se os controlos de PCR (**Positive Control, Negative Control**) estão aprovados e válidos (estado) para o lote de **PCR Mix** a ser utilizado. Caso não haja controlos de PCR válidos disponíveis para o lote da **PCR Mix** execute os controlos de PCR conforme descrito nas secções seguintes,
- selecione o tipo de execução, seguindo as instruções na interface gráfica do utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilize os Protocolos de ensaio fornecidos pela EG SpA (ver “Amostras e Controlos”).

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

PASSO 2 – Configuração da sessão

O**CMV RNA ELITe MGB Kit** pode ser usado no **ELITe BeGenius** para realizar:

A. Execução da amostra (Extract + PCR [Extrair+PCR]),

B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [Apenas PCR]),

C. Execução de calibração (apenas PCR),

D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [apenas PCR]).

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

NOTE

O **ELITe BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite descarregar a informação da sessão do centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

Antes de configurar uma execução:

1. Descongele os tubos de **PCR Mix** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada tubo é suficiente para **24 testes** em condições otimizadas (5 ou mais testes por sessão). Misture suavemente por vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

Proteja a **PCR Mix** da luz enquanto descongela, dado que este reagente é fotossensível.

2. Use os tubos **RT EnzymeMix** necessários. Cada tubo é suficiente para **48 testes** em condições otimizadas (5 ou mais testes por sessão). Misture e, em seguida, centrifugue os conteúdos durante 5 segundos e mantenha-os em gelo ou no bloco refrigerado.

NOTE

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

3. Prepare um tubo de 2 mL (Sarstedt, ref. 72.694.005, não incluído no kit) para a **mistura de reação completa** e identifique-o com um marcador de tinta permanente.
4. Calcule os volumes necessários de **PCR Mix** e **RT EnzymeMix** para preparar a **mistura de reação completa** com base no número de amostras (N) a serem analisadas, conforme descrito na tabela seguinte.

Table 13

Número de amostras (N)	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

Table 13 (continued)

Número de amostras (N)	PCR Mix	RT EnzymeMix
N = 12	290 µL	4,4 µL
13 ≤ N ≤ 18	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0,3 µL
19 ≤ N ≤ 23	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0,3 µL
N = 24	580 µL	8,7 µL

5. Prepare a **mistura de reação completa** transferindo para o tubo de 2 mL identificado os volumes calculados dos dois componentes. Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.

NOTE

A **mistura de reação completa** pode ser usada dentro de **7** horas se mantida num bloco refrigerado (durante 2 sessões de 3 horas cada e o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão). A mistura de reação completa **não pode** ser armazenada para reutilização.

NOTE

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

Para configurar um dos quatro tipos de execução, siga os passos abaixo diante da GUI:

Table 14

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])
1	**Identifique amostras** e, se necessário, descongele à temperatura ambiente, misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Para este ensaio, 600 µL da amostra devem ser transferidos para um tubo Sarstedt de 2 mL (não fornecido) previamente identificado. Qualquer volume em excesso será deixado no tubo pelo ELITe InGenius **Descongele** os **tubos de CPE** necessários à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. Cada tubo é suficiente para 12 extrações.	Se necessário, **descongele os tubos de eluição** contendo os ácidos nucleicos extraídos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.
2	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”.	Selecione “**Perform Run**” (Executar) a partir do ecrã “Home”.
3	Retire os Suportes da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os “Racks” de “Lane 1, 2 and 3” (L1, L2, L3) da “Cooler Unit” e coloque-os na mesa de preparação
4	Selecione o “Run mode”: “**Extract + PCR”** (Extrair + PCR).	Selecione o “Run mode”: “PCR Only”.
5	**Carregue as amostras** no “Sample Rack” (Suporte de amostras). (**Nota;** quando os tubos secundários “2 mL Tubes” (Tubos de 2 mL) forem carregados, use adaptadores azuis para o “Sample Rack” (Suporte de amostras).	**Carregue as amostras**no “Elution Rack”(Rack de eluição).

Table 14 (continued)

	A. Execução da amostra (Extract + PCR) [Extrair+PCR]	B. Execução de amostras eluídas (PCR Only [apenas PCR])
6	Insira o “Sample Rack” (Suporte de amostras) na “Cooler Unit” começando a partir da “Lane 5” (L5). Insira a “Sample ID” (Identificação da amostra) (SID) para cada “Position” usada. Se forem carregados tubos secundários, assinale “2 mL Tube” (Tubo de 2 mL). Se os tubos secundários não possuírem código de barras, digite manualmente a “Sample ID”).	Insira o “Elution Rack” (rack de eluição) na “Cooler Unit” começando pela “Lane 3” (L3) Para cada “Position” insira a “Sample ID” (Identificação da amostra), a “Sample matrix” (Matriz da amostra), o “Extraction kit” (Kit de extração) e o “Extracted eluate vol.” (Volume de eluato extraído).
7	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
8	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 600 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 50 µL.	Certifique-se de que o “Extraction Input Volume” (Volume inicial de extração) é de 600 µL e que o “Extracted Elute Volume” (“Volume de eluição do extraído”) é de 50 µL.
9	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay” (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o Assay Protocol (Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay” (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
10	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
11	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6	Quando forem processadas mais de 12 amostras, repita o procedimento a partir do ponto 6
12	Coloque os “Elution tubes" (Tubo de eluição) no “Elution Rack" (rack de eluição) (os tubos de eluição podem ser etiquetados com código de barras para melhorar a capacidade de localização).	Não aplicável
13	Insira o “Elution Rack” na “Cooler Unit” começando a partir da “Lane 3” (L3). Quando mais de 12 amostras forem processadas, repita usando a “Lane 2” (L2).	Não aplicável
14	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Não aplicável
15	**Carregue CPE**e a**mistura de reação completa**no “Reagent/Elution Rack” (Rack de reagente/eluição).	**Carregue a mistura de reação completa**no “Reagent/ /Elution Rack” (Rack de reagente/eluição).
16	Insira o “Reagent/Elution Rack” na “Cooler Unit” na “Lane 2” (L2) se estiver disponível, ou na “Lane 1” (L1). Para cada PCR Mix e/ou CPE, insira o “S/N” (número de série), o “Lot No.” (número de lote), a “Exp. Date” (data de expiração) e o “T/R” (número de reações).	Insira o “Reagent/Elution Rack” na “Cooler Unit” na “Lane 2” (L2) se estiver disponível, ou na “Lane 1” (L1). Para cada PCR Mix, insira o “S/N” (número de série), o “Lot No.” (número de lote), a “Exp. Date” (data de expiração) e o “T/R” (número de reações).
17	Selecione “Next” (Próximo) para continuar	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
18	Verifique as pontas nos “Tip Rack(s)” (Suporte de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua o suporte (s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos “Tip Rack(s)” (Suporte de Ponta) na “Inventory Area” (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
19	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
20	Coloque o “**PCR Rack**” (Rack de PCR) com a “**PCR Cassette**” na Inventory Area (área dos reagentes).	Coloque o “**PCR Rack**” (Rack de PCR) com a “**PCR Cassette**” na Inventory Area (área dos reagentes).
21	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.	Selecione “Next” (Próximo) para continuar.
22	Carregue o “**Extraction Rack**” (Rack de extração) com os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 1000” e os consumíveis de extração necessários.	Não aplicável
23	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
24	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

Table 15

	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
1	**Descongele**os**tubos de Q-PCR Standard**necessários (Cal1: Q-PCR Standard 10^2, Cal2: Q-PCR Standard 10^3, Cal3: Q-PCR Standard 10^4, Cal4: Q-PCR Standard 10^5) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração.	**Descongele os tubos de Positive Control**à temperatura ambiente durante 30 minutos. Misture suavemente e, em seguida, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos e mantenha em gelo ou no bloco de refrigeração. **Prepare**o**Negative Control**transfirindo pelo menos 50 µL de água de grau biológico molecular para um "Elution tube" (Tubo de eluição), fornecido com o ELITe InGenius SP 200 Consumable Set.
2	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home".	Selecione "Perform Run" (Executar) a partir do ecrã "Home" (Página inicial)
3	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.	Retire os "Racks" de "Lane 1, 2 and 3" (L1, L2, L3) da "Cooler Unit" e coloque-os na mesa de preparação.
4	Selecione o "Run mode: PCR Only".	Selecione o "Run mode": "PCR Only".
5	**Carregue os tubos de standard de Q-PCR**no "Elution Rack" (Rack de eluição).	**Carregue**os**tubos de Positive Control e Negative Control**no "Elution Rack" (Rack de eluição).
6	**Insira**o**"Elution Rack"**(Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	**Insira**o**"Elution Rack"**(Rack de eluição) na "Cooler Unit" (Unidade refrigeradora) começando a partir da "Lane 3" (Via 3) (L3). Se necessário, para cada "Position" (Posição) introduza o "Reagent name" (Nome do reagente) e o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
7	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
8	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 600 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 50 µL.	Certifique-se de que o "Extraction Input Volume" (Volume inicial de extração) é de 600 µL e que o "Extracted Elute Volume" ("Volume de eluição do extraído") é de 50 µL.
9	Selecione o**Assay Protocol**(Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").	Selecione o**Assay Protocol**(Protocolo de Ensaio) na coluna "Assay" (Ensaio) (ver "Amostras e Controlos").
10	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
11	**Carregue**a**mistura de reação completa**no "Reagent/ /Elution Rack"(Rack de reagente/eluição).	**Carregue**a**mistura de reação completa**no "Reagent/ /Elution Rack"(Rack de reagente/eluição).
12	**Insira**o "**Reagent/Elution Rack**" (Rack de reagente/ /eluição) na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2). Para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).	Insira o "**Reagent/Elution Rack**" (Rack de reagente/ /eluição) na "Cooler Unit" na "Lane 2" (L2). Para cada PCR Mix, insira o "S/N" (número de série), o "Lot No." (número de lote), a "Exp. Date" (data de expiração) e o "T/R" (número de reações).
13	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
14	Verifique as pontas nos "Tip Rack(s)" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte (s) de pontas, se necessário.	Verifique as pontas nos "Tip Rack(s)" (Suporte de Ponta) na "Inventory Area" (área dos reagentes) e substitua o suporte(s) de pontas, se necessário.
15	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.
16	**Coloque**o "**PCR Rack**" (Rack de PCR) com a "**PCR Cassette**" na Inventory Area (área dos reagentes).	**Coloque**o "**PCR Rack**" (Rack de PCR) com a "**PCR Cassette**" na Inventory Area (área dos reagentes).
17	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.	Selecione "Next" (Próximo) para continuar.

Table 15 (continued)

	C. Execução da calibração (PCR only [Apenas PCR])	D. Execução de Positive Control e Negative Control (PCR Only [Apenas PCR])
18	Feche a porta do instrumento.	Feche a porta do instrumento.
19	Prima "Start" (Iniciar).	Prima "Start" (Iniciar).

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

NOTE

No final da execução a restante amostra extraída no**Elution tube**(Tubo de eluição) deve ser removida do instrumento, tapada, identificada e guardada a -20 °C ou menos durante não mais de um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

NOTE

A**mistura de reação completa**pode ser mantida no bloco refrigerado até 7 horas (2 sessões de 3 horas cada e durante o tempo necessário para iniciar uma terceira sessão). Misture suavemente e, em seguida, centrifugue os conteúdos durante 5 segundos antes de dar início à sessão seguinte. A mistura de reação completa**não pode**ser guardada para reutilização.

NOTE

No final da execução, a restante**Q - PCR Standard**pode ser removida do instrumento, fechada e guardada a -20 °C ou menos. Evite derramar o Q - PCR Standard.

NOTE

Os**Q-PCR Standard**podem ser usados para 4 sessões separadas de 2 horas cada.

NOTE

No final da execução o restante**Positive Control**deve ser removido do instrumento, tapado e guardado a -20 °C ou menos. Evite o derrame do Positive Control. O restante**Negative Control**deve ser eliminado.

NOTE

O**Positive Control**pode ser usado para 4 sessões separadas de 3 horas cada.

NOTE

No final da execução, a**PCR Cassette**e os outros consumíveis têm de ser eliminados seguindo todos os regulamentos governamentais e ambientais. Evite derramar os produtos de reação.

PASSO 3 - Revisão e aprovação dos resultados

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

At the end of the run, the “Results Display” screen is automatically shown. Neste ecrã são mostrados os resultados e informações sobre a execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios (“Sample Report” (Relatório da amostra) ou “Track Report” (Relatório da calha)). Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

NOTE

O sistema **ELITe BeGenius** pode ser ligado ao “Laboratory Information System” (Sistema de Informações Laboratoriais - LIS), que permite carregar os resultados da sessão no centro de dados laboratoriais. Consulte o manual do instrumento para obter mais informações.

O **ELITe BeGenius** gera os resultados com o **CMV RNA ELITe MGB Kit** através do seguinte procedimento:

1. Validação da Curva de calibração,
2. Validação dos resultados do Positive Control e Negative Control,
3. Validação dos resultados da amostra,
4. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

NOTE

Para mais informações, consulte o mesmo parágrafo do **Procedimento do ELITe InGenius**.

11 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

11.1 Limite de deteção (LdD)

O limite de deteção (LdD) do ensaio foi determinado com amostras de plasma no ELITe InGenius com recurso a diluição de material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim). Foi efetuada uma análise de regressão Probit aos resultados e o LdD foi definido como a concentração correspondente a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 16 Limite de deteção para amostras de plasma e ELITe InGenius

Alvo	LdD	intervalo de confiança de 95%	
		Limite inferior	Limite superior
ARN do CMV	0,19 PFU/mL	0,15 PFU/mL	0,29 PFU/mL
	30 cópias/mL	N.A.	N.A.

O valor do LdD calculado foi verificado através de testes a amostras de plasma enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) à concentração indicada. Os resultados obtidos confirmaram a concentração declarada para o alvo.

O valor do LdD calculado, 30 cópias/mL, foi verificado em associação com o ELITe BeGenius através de testes a amostras de plasma enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (NoToVir) à concentração indicada. Os resultados obtidos confirmaram a concentração declarada para o alvo.

11.2 Intervalo de medição linear

O intervalo de medição linear do ensaio foi determinado com amostras de plasma no ELITe InGenius e no ELITe BeGenius utilizando diluições de material de referência de ARN do CMV (NoToVir). foi realizada uma regressão linear dos resultados e foi verificado o intervalo de medição linear.

Os resultados são comunicados nas figuras seguintes.

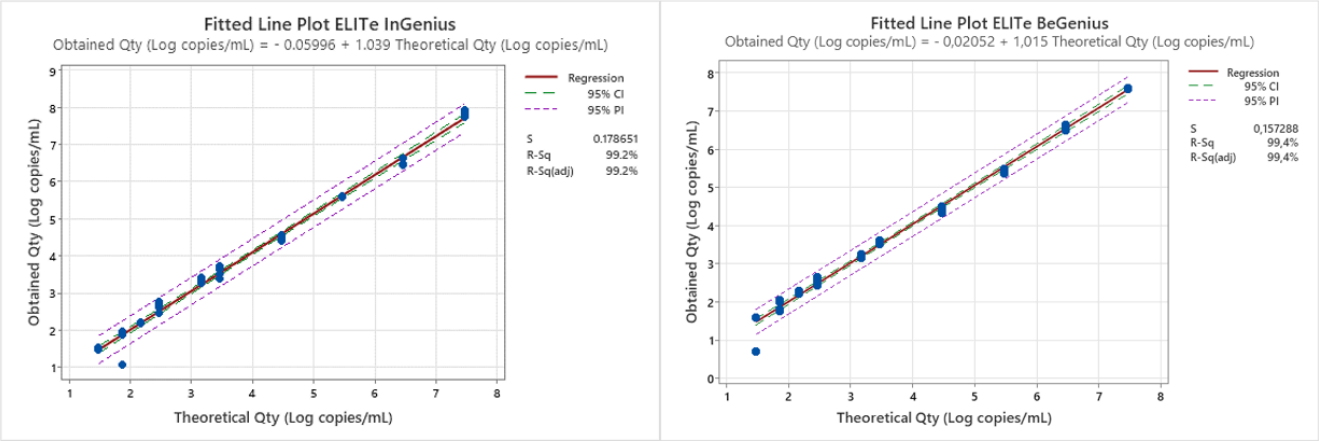


Fig. 1

Os resultados finais estão resumidos na tabela seguinte.

Table 17 Intervalo de medição linear para amostras de plasma ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Limite inferior de quantificação (LIdQ)	Limite superior de quantificação (LSdQ)
30 cópias/mL	29.392.000 cópias/mL

Os resultados obtidos pelo ELITe InGenius e o ELITe BeGenius foram analisados por regressão ortogonal e linear para calcular a correlação entre os métodos.

Os resultados estão resumidos na figura seguinte

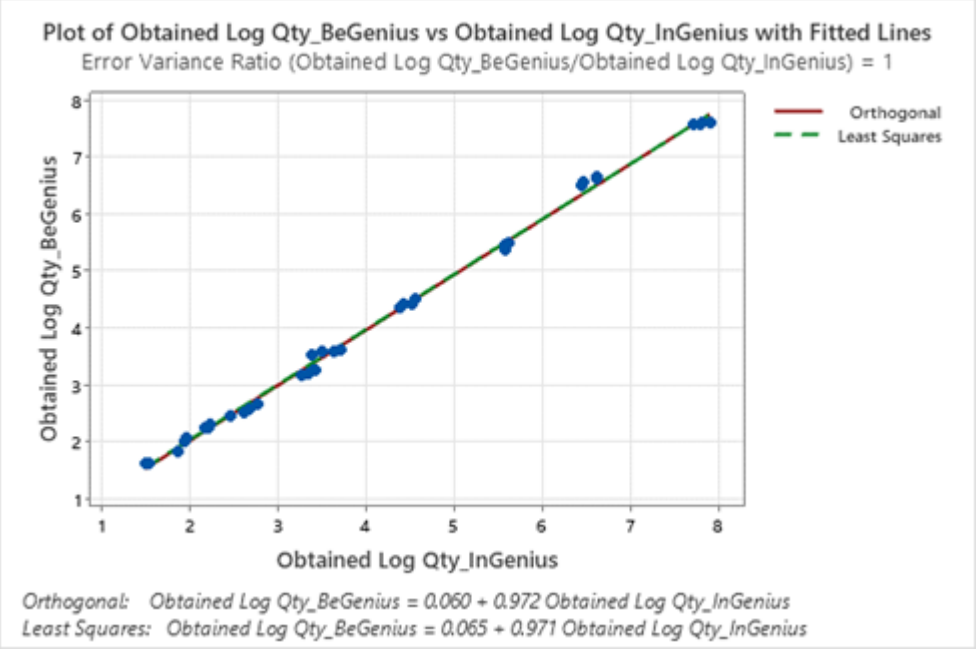


Fig. 2

A análise de regressão ortogonal gerou uma interceção igual a 0,060 (95% CI: -0,015; 0,135) e um declive igual a 0,972 (95% CI: 0,956; 0,989). A análise de regressão linear gerou um R2 de 0,997.

11.3 Incerteza da curva de standard

O valor da incerteza da curva de standard foi calculado combinando os erros aleatórios (DP) das quantificações de todos os níveis e multiplicando o fator de cobertura k = 2 (incerteza combinada alargada) e é igual a 0,1588 Log cópias / reação.

Table 18

Níveis da curva de standard	Teórico Log c/rxn	SD	Incerteza combinada alargada
CMV RNA Standard 10^5	5,0000	0,0273	0,1588
CMV RNA Standard 10^4	4,0000	0,0234	
CMV RNA Standard 10^3	3,0000	0,0329	
CMV RNA Standard 10^2	2,0000	0,0627	

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

A inclusividade do ensaio, como eficiência de deteção e quantificação de diferentes genótipos e estirpes de CMV foi avaliada por análise *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos.

A análise revelou a conservação da sequência e a ausência de mutações significativas nas sequências de CMV disponíveis. Por isso, é esperada uma deteção e quantificação eficientes para os diferentes genótipos e estirpes de CMV.

A inclusividade do ensaio foi verificada, em associação com o ELITe InGenius, ao testar os diferentes materiais de referência de CMV (ATCC e Universidade de Turim) a baixa concentração.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 19

Estirpe CMV	Pos./Rep.	Resultado
AD169	3 / 3	ARN do CMV detetado,
Towne	3 / 3	ARN do CMV detetado
Davis	3 / 3	ARN do CMV detetado
Merlin	3 / 3	ARN do CMV detetado

Todas as amostras foram corretamente detetadas como positivas para ARN do CMV pelo CMV RNA ELITe MGB Kit no ELITe InGenius.

11.5 Marcadores potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A reatividade cruzada potencial do ensaio com ADN genómico do CMV e outros organismos não pretendidos foi avaliada através da análise *in silico* de sequências disponíveis na bases de dados de nucleótidos. A análise revelou incompatibilidades **significativas** com o ADN genómico do CMV; por conseguinte, não é de esperar qualquer reatividade cruzada. A análise não demonstrou homologias significativas com outros organismos não pretendidos; por conseguinte, não se espera reatividade cruzada.

A potencial reatividade cruzada com outros organismos que podem ser encontrados nas amostras clínicas deplasmatambém foi verificada, em associação com oELITe InGenius, através de testes a um painel de materiais de referência certificados (ATCC e NIBSC) em título alto.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 20

Amostra	Pos./Rep.	Resultado
HIV1	0 / 3	Sem reatividade cruzada
EBV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HAV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HBV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HHV6	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HSV1	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HSV2	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HEV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
RSV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
VZV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Vírus Influenza A (H1N1)	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Vírus Influenza B (Florida)	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Vírus do dengue tipo 3	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Adenovírus 2	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Vírus West Nile	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Echovírus 4	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Parvovírus B19	0 / 3	Sem reatividade cruzada
HCV	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Aspergillus fumigatus	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Staphylococcus aureus	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Candida albicans	0 / 3	Sem reatividade cruzada

Todos os marcadores potencialmente interferentes testados revelaram que não há reatividade cruzada para a amplificação do alvo ARN do CMV utilizando oCMV RNA ELITe MGB Kit.

11.6 Marcadores potencialmente interferentes: Inibição

A potencial inibição do ensaio causada por outros organismos que podem ser encontrados em amostras clínicas de plasma foi verificada através do teste de um painel de materiais de referência certificados (ATCC e NIBSC) em título alto, enriquecidos com material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) a uma concentração de 3x o LdD.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 21

Amostra	Pos./Rep.	Resultado
HIV1	3 / 3	Ausência de inibição
EBV	3 / 3	Ausência de inibição
HAV	3 / 3	Ausência de inibição

Table 21 (continued)

Amostra	Pos./Rep.	Resultado
HBV	3 / 3	Ausência de inibição
HHV6	3 / 3	Ausência de inibição
HSV1	3 / 3	Ausência de inibição
HSV2	3 / 3	Ausência de inibição
HEV	3 / 3	Ausência de inibição
RSV	3 / 3	Ausência de inibição
VZV	3 / 3	Ausência de inibição
Vírus Influenza A (H1N1)	3 / 3	Ausência de inibição
Vírus Influenza B (Florida)	3 / 3	Ausência de inibição
Vírus do dengue tipo 3	3 / 3	Ausência de inibição
Adenovírus 2	3 / 3	Ausência de inibição
Vírus West Nile	3 / 3	Ausência de inibição
Echovírus 4	3 / 3	Ausência de inibição
Parvovírus B19	3 / 3	Ausência de inibição
HCV	3 / 3	Ausência de inibição
Aspergillus fumigatus	3 / 3	Ausência de inibição
Staphylococcus aureus	3 / 3	Ausência de inibição
Candida albicans	3 / 3	Ausência de inibição

Todos os organismos potencialmente interferentes testados revelaram que não há inibição da deteção e quantificação do alvo de ARN do CMV usando o CMV RNA ELITe MGB Kit.

11.7 Substâncias potencialmente interferentes: Reatividade cruzada

A reatividade cruzada do ensaio com substâncias potencialmente interferentes (endógenas e exógenas) que podem ser encontradas nas amostras clínicas de plasma foi avaliada através da análise de um painel de substâncias em concentração relevante.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 22

Amostra	Pos./Rep.	Resultado
Plasma ictérico	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Plasma lipémico	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Sangue altamente hemolítico	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Sangue mediamente hemolítico	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Sangue hemolítico baixo	0 / 3	Sem reatividade cruzada

Table 22 (continued)

Amostra	Pos./Rep.	Resultado
Plasma heparinizado	0 / 3	Amostra inválida
Plasma em EDTA	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Azitromicina	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Ciclosporina A	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Valganciclovir	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Cidofovir	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Abacavir	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Ganciclovir	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Foscarnet	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Ribavirina	0 / 3	Sem reatividade cruzada
Letermovir	0 / 3	Sem reatividade cruzada

O teste mostrou que todas as substâncias não reagem de forma cruzada com a amplificação do alvo ARN do CMV utilizando o CMV RNA ELITe MGB Kit.

A heparina foi confirmada como sendo capaz de inibir o ensaio, uma vez que estas amostras resultaram “Inválidas” devido à falha do Controlo Interno (IC Ct > 32) em vez de “Negativas”.

11.8 Substâncias potencialmente interferentes: Inibição

A inibição do ensaio com substâncias potencialmente interferentes (endógenas e exógenas) que podem ser encontradas em amostras clínicas de plasma foi avaliada, em associação com o ELITe InGenius, através da análise de um painel de substâncias em concentrações relevantes adicionadas ao material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) a uma concentração de 3x o LdD.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 23

Amostra	Pos./Rep.	Resultado
Plasma ictérico	3 / 3	Ausência de inibição
Plasma lipémico	3 / 3	Ausência de inibição
Sangue altamente hemolítico	3 / 3	Ausência de inibição
Sangue mediamente hemolítico	3 / 3	Ausência de inibição
Sangue hemolítico baixo	3 / 3	Ausência de inibição
Plasma heparinizado	0 / 3	Amostra inválida
Plasma em EDTA	3 / 3	Ausência de inibição
Azitromicina	3 / 3	Ausência de inibição
Ciclosporina A	3 / 3	Ausência de inibição
Valganciclovir	3 / 3	Ausência de inibição
Cidofovir	3 / 3	Ausência de inibição

Table 23 (continued)

Amostra	Pos./Rep.	Resultado
Abacavir	3 / 3	Ausência de inibição
Ganciclovir	3 / 3	Ausência de inibição
Foscarnet	3 / 3	Ausência de inibição
Ribavirina	3 / 3	Ausência de inibição
Letermovir	3 / 3	Ausência de inibição

O teste demonstrou que todas as substâncias, com exceção da heparina, não inibem a deteção e quantificação do alvo ARN do CMV utilizando o CMV RNA ELITe MGB Kit

A heparina foi confirmada como sendo capaz de inibir o ensaio. No entanto, devido à falha do Controlo Interno (IC Ct > 32), estas amostras resultaram “Inválidas” em vez de falsamente “Negativas”.

11.9 Contaminação cruzada

A possível contaminação cruzada durante a análise foi avaliada, em associação com o ELITe InGenius, através da análise de 30 amostras de plasma negativas para o ARN do CMV, alternadas com 30 amostras de plasma com material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) em título alto.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 24

Amostras	N	Negativo	Positivo	Concordância
Plasma enriquecido com ARN do CMV a ~$1x10^6$ cópias/mL	30	0	30	100%
Plasma negativo para ARN do CMV	30	30	0	100%

Nenhuma das amostras negativas para ARN do CMV testadas deu resultados falsos positivos. Neste teste, não foi detetada contaminação cruzada dentro de uma sessão nem entre sessões.

11.10 Taxa de falha geral do sistema

A taxa de falha de todo o sistema foi avaliada, em associação com o ELITe InGenius, através da análise de um painel de amostras enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) a uma concentração de 3x o LdD.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte

Table 25

Amostras	N	Negativo	Positivo	Taxa de falha de todo o sistema
Plasma enriquecido para ARN do CMV	50	0	50	0%

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

11.11 Repetibilidade

A repetibilidade intra-sessão e inter-sessão do ensaio foi avaliada no ELITe InGenius através da análise de um painel de amostras de plasma, incluindo uma amostra negativa e duas amostras enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) em concentrações de 3x o LdD e de 10x o LdD.

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) são mostrados nas tabelas seguintes.

Table 26 Repetibilidade intra-sessão do ELITe InGenius (dia 1)

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	8 / 8	33,19	0,43	1,30	100%
10x o LdD	8 / 8	31,69	0,09	0,27	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) são mostrados nas tabelas seguintes.

Table 27 Repetibilidade inter-sessão do ELITe InGenius (dia 1 e dia 2)

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	16 / 16	33,19	0,34	1,03	100%
10x o LdD	16 / 16	31,62	0,18	0,56	100%

Nos testes de repetibilidade em associação com o ELITe InGenius, o CMV RNA ELITe MGB Kit detetou o alvo ARN do CMV conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV inferior a 5%.

A repetibilidade intra-sessão e inter-sessão do ensaio foi avaliada no ELITe BeGenius através da análise de um painel de amostras de plasma, incluindo uma amostra negativa e duas amostras enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (NoToVir) em concentrações de 3x o LdD e de 10x o LdD.

Um exemplo dos resultados da repetibilidade intra-sessão (em um dia) são mostrados nas tabelas seguintes.

Table 28 Repetibilidade intra-sessão do ELITe BeGenius (dia 1)

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	8 / 8	36,17	0,87	2,40	100%
10x o LdD	8 / 8	33,64	0,28	0,82	100%

Um exemplo dos resultados da repetibilidade inter-sessão (em dois dias) são mostrados nas tabelas seguintes.

Table 29 Repetibilidade inter-sessão do ELITe BeGenius (dia 1 e dia 2)

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	16 / 16	35,82	0,79	2,22	100%
10x o LdD	16 / 16	33,54	0,29	0,86	100%

Nos testes de repetibilidade em associação com o ELITe BeGenius, o CMV RNA ELITe MGB Kit detetou o alvo ARN do CMV conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV inferior a 5%.

11.12 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade inter-lote e inter-instrumento do ensaio foi avaliada no ELITe InGenius através da análise de um painel de amostras de plasma, incluindo uma amostra negativa e duas amostras enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) em concentrações de 3x o LdD e de 10x o LdD.

Um resumo dos resultados de reprodutibilidade inter-lote (com três lotes) é mostrado nas tabelas abaixo.

Table 30 Reprodutibilidade inter-lote do ELITe InGenius

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 48	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	48 / 48	33,18	0,33	0,99	100%
10x o LdD	48 / 48	31,47	0,31	1,00	100%

Um resumo dos resultados de reprodutibilidade inter-instrumento (com três instrumentos) é mostrado nas tabelas abaixo.

Table 31 Reprodutibilidade inter-instrumento do ELITe InGenius

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 24	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	24 / 24	34,53	0,56	1,63	100%
10x o LdD	24 / 24	32,28	0,31	0,97	100%

Nos testes de reprodutibilidade em associação com o ELITe InGenius, o CMV RNA ELITe MGB Kit detetou o alvo ARN do CMV conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV inferior a 5%.

A reprodutibilidade inter-lote e inter-instrumento do ensaio foi avaliada no ELITe BeGenius através da análise de um painel de amostras de plasma, incluindo uma amostra negativa e duas amostras enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (NoToVir) em concentrações de 3x o LdD e de 10x o LdD.

Um exemplo de resultados de reprodutibilidade inter-lote (num instrumento, com dois lotes) é apresentado nas tabelas abaixo.

Table 32 Reprodutibilidade inter-lote do ELITe BeGenius

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 8	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	8 / 8	34,96	0,16	0,46	100%
10x o LdD	8 / 8	32,80	0,25	0,75	100%

Um resumo dos resultados de reprodutibilidade inter-instrumento (com dois instrumentos) é mostrado nas tabelas abaixo.

Table 33 Reprodutibilidade inter-instrumento do ELITe BeGenius

Amostra	Pos./Rep.	Ct médio	SD	% CV	Concordância
Negativo	0 / 16	N.A.	N.A.	N.A.	100%
3x o LdD	16 / 16	34,48	0,58	1,67	100%
10x o LdD	16 / 16	32,58	0,34	1,05	100%

Nos testes de reprodutibilidade em associação com o ELITe BeGenius, o CMV RNA ELITe MGB Kit detetou o alvo ARN do CMV conforme esperado e apresentou uma variabilidade máxima dos valores de Ct do alvo como %CV inferior a 5%.

11.13 Especificidade do diagnóstico: Confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, avaliada pela concordância da percentagem negativa com método de referência, foi avaliada através da análise de amostras clínicas de plasma negativas para ADN do CMV testadas por um laboratório externo com um método de referência de diagnóstico molecular com marcação CE IVD (EG SpA).

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.

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

Table 34

Amostras	N	Positivo	Negativo	Inválido	Especificidade do diagnóstico
Plasma de sangue total negativo para o ADN do CMV	100	0	100	0	100%

A especificidade de diagnóstico do CMV RNA ELITe MGB Kit foi igual a 100%.

O valor de corte do Internal Control Ct está definido em 32 para a matriz de plasma validada.

11.14 Sensibilidade de diagnóstico: Confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, avaliada pela concordância de percentagem positiva com o método de referência e com o material de referência, foi avaliada através da análise de:

- Amostras clínicas de plasma positivas para o ADN do CMV de 8 pacientes transplantados submetidos a terapia antiviral com inibidor do complexo terminase do CMV (Letermovir, PREVYMIS™, Merck & Co.), testadas por um laboratório externo com um método de referência com marcação CE IVD (EG SpA) após tratamento com DNase (I. Cassaniti et al. 2021),
- amostras clínicas de plasma enriquecidas com material de referência de ARN do CMV (Universidade de Turim) em concentrações de 3x, 5x, 10x, 30x e 50x o LdD.

Dado que oELITe BeGeniustem desempenhos analíticos equivalentes aoELITe 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 oELITe InGeniustambém se aplica aoELITe BeGenius.

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

Table 35

Amostras	N	Positivo	Negativo	Inválido	Sensibilidade de diagnóstico
Plasma positivo para o ADN do CMV após tratamento com DNase	10	9	1	0	90%
Plasma enriquecido com ARN do CMV	70	70	0	0	100%
Todas as amostras de plasma	80	79	1	0	98,75%

A sensibilidade de diagnóstico geral doCMV RNA ELITe MGB Kitfoi igual a 98,75%.

11.15 Sensibilidade de diagnóstico: Concordância do método

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, em concordância com o método de referência utilizando o valor Kappa de Cohen, foi avaliada através da análise do ADN do CMV negativo e amostras clínicas de plasma positivas para o ADN do CMV de 27 pacientes transplantados submetidos a terapia antiviral com inibidor do complexo terminase do CMV (Letermovir, PREVYMIS™, Merck & Co.), testadas por um laboratório externo com um método de referência com marcação CE IVD (EG SpA) após tratamento com DNase (I. Cassaniti et al. 2021).

Dado que oELITe BeGeniustem desempenhos analíticos equivalentes aoELITe 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 oELITe InGeniustambém se aplica aoELITe BeGenius.

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

Table 36

		ADN do CMV após tratamento com DNase		
		Pos	**Neg**	**Total**
CMV RNA ELITe MGB Kit	**Pos**	9	2	11
	Neg	1	81	82
	Total	10	83	93

OCMV RNA ELITe MGB Kitgerou uma área sob a curva (AUC) de 96,8% e um valor Kappa de Cohen igual a 0,839, o que corresponde a uma concordância perfeita com os resultados obtidos para o ADN do CMV em plasma tratado com DNase.

NOTE

Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matrizes e instrumentos estão registados no Ficheiro técnico do produto “CMV RNA ELITe MGB Kit”, FTP 115ING.

12 REFERÊNCIAS

W. D. Rawlinson et al. (1993) *J. Virology* 67: 5502 - 5513

D. Wang et al. (2004) *PNAS* 101: 16642 - 16647

W. A. Bresnahan (2000) *Science* 288: 2373 - 2376

A. E. Greijer et al. (2000) *J. Virology* 74: 9078 - 9082

E. Terhune et al. (2004) *J. Virology* 78: 10390 - 10398

E. Sarcinella et al. (2004) *Virus Research* 104: 129 - 137

E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35 : e30

G. Gerna et al. (2019) *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20: 1429 - 1438

I. Cassaniti et al. (2021) *Am. J. Transplantat.* 21: 1622 - 1628

C. N. Kotton et al. (2025) *Transplantation* 1; 109(7):1066-1110

G. Piccirilli et al. (2024) *J. Clinical Microbiology* 62(5): e0163023.

13 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Utilize este produto apenas com as seguintes amostras clínicas: Plasma colhido em EDTA.

Atualmente, não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com outras amostras clínicas.

O plasma colhido em EDTA deve ser separado do sangue total armazenado à temperatura ambiente ou +2 / +8 ° C durante um máximo de 24 horas.

Não use o ARN extraído de amostras que contêm heparina com este produto: a heparina inibe a reação de amplificação de ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Este produto não se destina a ser utilizado para detetar a presença, a exposição ou o rastreio de agentes transmissíveis no sangue, componentes sanguíneos, células, tecidos, órgãos ou quaisquer dos seus derivados, a fim de avaliar a sua adequação para transfusão, transplante ou administração de células.

Este produto não se destina a ser utilizado para o rastreio de CMV em mulheres grávidas.

Os resultados obtidos com este produto dependem da identificação, colheita, transporte, armazenamento e processamento corretos das amostras. Para evitar resultados incorretos, é por isso necessário ter cuidado durante estes passos e seguir cuidadosamente as instruções de utilização fornecidas com o produto.

Devido à sua elevada sensibilidade analítica, o método de PCR em tempo real usado neste produto é sensível a contaminação cruzada a partir de amostras clínicas positivas, dos controlos positivos e dos produtos de PCR. A contaminação cruzada causa resultados falsos positivos. O formato do produto foi concebido para limitar a contaminação cruzada. 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 infeciosas 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 equipamento de proteção individual que seja adequado para o processamento de amostras biológicas potencialmente infeciosas 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 equipamento de proteção individual e instrumentos específicos para preparação da sessão de trabalho, para evitar falsos resultados positivos.

Para evitar resultados incorretos, este produto deve ser manuseado por profissionais qualificados e com formação em técnicas de biologia molecular, como extração, transcrição reversa, PCR e deteção de ácidos nucleicos.

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 antes de mudar para um novo produto.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o ARN alvo não foi detetado no ARN extraído da amostra; no entanto, 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 deleções na região do ARN do alvo abrangida pelos primers do produto e pelas 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 têm de ser interpretados em combinação com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Tal como acontece com qualquer outro dispositivo médico de diagnóstico, existe um risco residual de obter resultados inválidos ou errados 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. No entanto, este risco residual associado à utilização prevista do produto foi ponderado em relação aos potenciais benefícios para o paciente e foi considerado aceitável.

14 RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Table 37

Reação do Q-PCR Standard, curva standard ou reação do Controlo Positivo 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 respetivos componentes.	Não utilize a mistura de reação completa durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Não deixe a RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 ºC durante mais de 10 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Degradação dos Q-PCR Standards ou do Controlo Positivo.	Não use o Q-PCR Standard para mais de 4 sessões independentes (2 horas cada na área de extração ou na Cooler Unit). Não use o Positive Control para mais de 4 sessões independentes (3 horas cada na área de extração ou na Cooler Unit). Use novas alíquotas dos Q-PCR Standards ou do Controlo positivo (Positive Control).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 38

Reação de Negative Control 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 do Negative Control.	Não use o Negative Control para mais do que 1 sessão. Utilize uma nova alíquota de água de grau de biologia molecular.

Table 38 (continued)

Reação de Negative Control inválida	
Causas possíveis	**Soluções**
Contaminação da mistura de reação completa ou dos respetivos componentes.	Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Contaminação da área de extração, dos Racks, do Inventory Block (Gestor do reagente) ou da Cooler Unit	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos e as pontas utilizadas.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 39

Reação da amostra inválida	
Causas possíveis	**Soluções**
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa, do controlo interno e da amostra. Verifique os volumes da mistura de reação completa, do controlo interno 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 componentes.	Não utilize a mistura de reação completa durante mais de 3 sessões consecutivas (7 horas no bloco de refrigeração da Inventory Area (área dos reagentes) ou na Cooler Unit). Não deixe a PCR Mix à temperatura ambiente durante mais do que 30 minutos. Não deixe a RT EnzymeMix a temperaturas superiores a -20 ºC durante mais de 10 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Degradação do modelo do Controlo Interno.	Utilize uma nova alíquota de Controlo Interno.
Inibição devido a substâncias interferentes 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” (Apenas PCR). Repita a extração com uma diluição 1:2 em água de grau de biologia molecular da amostra numa sessão “Extract + PCR” (Extrair+ PCR).
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Table 40

Curva de dissociação anómala	
Causas possíveis	**Soluções**
Ausência de um pico definido. Pico definido mas Tm diferente do de outras amostras e dos Standards e Positive Control.	Verifique a presença de Ct do alvo inferior a 30. A elevada quantidade de produto de amplificação no final da reação pode interferir com a análise da curva de fusão. Repita a amplificação da amostra para confirmar a presença do alvo com uma possível mutação. O alvo da amostra deve ser sequenciado para confirmar a mutação.

Table 41

Erro no cálculo de Ct	
Causas possíveis	**Soluções**
Concentração demasiado alta do alvo na amostra ou amostra com sinal de fluorescência anómalo.	Se for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR: - selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo positivo. Se não for observada uma amplificação significativa no gráfico de PCR, selecione o rastreio relacionado com a amostra e aprove manualmente o resultado como sendo negativo, ou deixe-o como inválido. Se for necessário um valor Ct: - repita a amplificação de amostra eluída com uma diluição 1:10 em água de grau de biologia molecular numa sessão “PCR Only” (apenas PCR). - repita a extração da amostra com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular numa sessão “Extract + PCR” (Extrair + PCR).

Table 42

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	**Soluções**
Contaminação entre amostras durante os passos pré-analíticos.	Limpar a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio (lixívia) a 3% nova ou ADN/ARN mais limpo após usar a pipeta em cada amostra. Não usar pipetas Pasteur. As pipetas devem ser do tipo de deslocação positiva ou ser usadas com pontas com filtro de aerossóis. Introduzir as amostras nas últimas posições dos instrumentos, tal como indicado nas GUI. Siga a sequência de carregamento indicada pelo software.
Contaminação pelo ambiente laboratorial.	Limpe todas as superfícies em contacto com o operador e as amostras (incluindo as pipetas) com uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (lixívia) nova ou produto de limpeza de ADN/ARN. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Prepare novamente a mistura de reação completa e/ou utilize uma nova alíquota de reagentes ou CPE.

15 SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo.
	Limite máximo da temperatura.
LOT	Código de lote.
	Prazo de validade (último dia do mês).
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.
CE 0123	Cumprimento dos requisitos dos Regulamentos IVDR 2017/746/CE relativo a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Certificação emitida pela TÜV Süd Product Service GmbH,Alemanha.
UDI	Identificação única do dispositivo
	Contém suficiente para "N" testes.
	Consultar as instruções de utilização.
CONT	Conteúdo.
	Manter afastado da luz solar.
	Fabricante.

16 NOTIFICAÇÃO PARA OS UTILIZADORES

Qualquer incidente grave ocorrido relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e às autoridades competentes do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o paciente se encontram localizados. Para informar a ELITechGroup S. p. A., o fabricante deste dispositivo, utilize o seguinte endereço de e-mail: egspa.vigilance@elitechgroup.com.

Um "Resumo da segurança e desempenho" será disponibilizado ao público através da base de dados europeia para dispositivos médicos (Eudamed) quando este sistema informático estiver operacional. Antes da notificação de total funcionalidade da Eudamed ter sido publicada, o “Resumo da Segurança e Desempenho” foi disponibilizado ao público mediante pedido por e-mail para emd.support@elitechgroup.com, em tempo útil.

17 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 EG 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 dos números de patente dos 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529, e os números de patente EP 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como pedidos que estejam atualmente pendentes.

O "Método de deteção e quantificação do citomegalovírus humano através de ARNs de viriões" está coberto pela patente italiana 102020000007357 e por pedidos pendentes.

As tecnologias ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® estão cobertas por patentes e pedidos pendentes.

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, unicamente para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

MGB®, Eclipse Dark Quencher®, AquaPhluor®, ELITe MGB®, o logotipo ELITe MGB®, ELITe InGenius® e ELITe BeGenius® são marcas registadas do ELITechGroup na União Europeia. AcroMetrix™ é uma marca comercial registada da Thermo Fisher Scientific Inc. PREVYMIS™ é uma marca comercial da Merck & Co.

Appendix A CMV RNA ELITe MGB Kit usado em associação com as plataformas Genius series®



CAUTION

Este documento é uma versão simplificada das instruções de utilização oficiais. Consulte o documento completo antes da utilização: www.elitechgroup.com

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto **CMV RNA ELITe MGB® Kit** consiste num dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* que se destina a ser usado por profissionais de saúde como um ensaio de transcrição reversa e PCR em tempo real de ácidos nucleicos quantitativa para a deteção e a quantificação do **mARN do virião do citomegalovírus humano (ARN do CMV)**, extraído de amostras clínicas não-celulares.

O ensaio é validado em associação com os instrumentos **ELITe InGenius®** e **ELITe BeGenius®**, sistemas automatizado e integrado para a extração, transcrição reversa, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados, usando amostras humanas de plasma colhido em EDTA.

O produto destina-se a ser utilizado como auxiliar na monitorização da infeção por CMV em indivíduos infetados por CMV submetidos a terapia antiviral com inibidores do complexo terminase do CMV.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com todas as observações clínicas e resultados laboratoriais relevantes.

Este produto não se destina a ser utilizado para detetar a presença, a exposição ou o rastreio de agentes transmissíveis no sangue, componentes sanguíneos, células, tecidos, órgãos ou quaisquer dos seus derivados, a fim de avaliar a sua adequação para transfusão, transplante ou administração de células. Este produto não se destina a ser utilizado para o rastreio de CMV em mulheres grávidas.

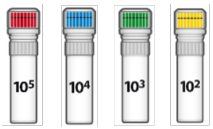
Sequência amplificada

Sequência	Gene	Fluoróforo	Canal
Alvo	UL21.5 mRNA (região de splicing)	FAM	ARN do CMV
Internal Control	fago MS2	AP525	IC

Matrizes validadas

- **Plasma** colhido em EDTA

Conteúdo do Kit e produtos relacionados

CMV RNA ELITe MGB Kit (RTS115ING)		CMV RNA ELITe Standard (STD115ING)	CMV RNA - ELITe Positive Control (CTR115ING)
 X 4	 x 2	 X 2	 X 2
CMV RNAPCR Mix 4 tubos de 600 µL 96 reações por kit 5 ciclos de congelação--descongelação	RT EnzymeMix 2 tubos de 20 µL 96 reações por kit 10 ciclos de congelação--descongelação	Pronta a utilizar, 4 níveis: 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 2 conjuntos de 4 tubos de 160 µL 4 ciclos de congelação--descongelação	Positive Control pronto a usar 2 tubos de 160 µL 8 reações por kit 4 ciclos de congelação--descongelação
Prazo de conservação máximo: **18 meses** Temperatura de armazenamento: **-20 °C**		Prazo de conservação máximo: **24 meses** Temperatura de armazenamento: **-20 °C**	Prazo de conservação máximo: **24 meses** Temperatura de armazenamento: **-20 °C**

Outros produtos necessários não fornecidos no kit

- Instrumento ELITe InGenius: INT030.
- Instrumento ELITe BeGenius: INT040.
- ELITe InGenius SP 1000: INT033SP1000.
- CPE - Internal Control: CTRCPE
- Consumíveis **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** (ver instruções de utilização do ELITe InGenius e do ELITe BeGenius)

Protocolo do ELITe InGenius e do ELITe BeGenius

Table 43

› Volume de entrada da extração › Volume CPE › Volume de eluição da extração › Volume de entrada de PCR da amostra	600 µL 10 µL 50 µL 20 µL	› Volume de PCR Mix › Frequência dos controlos › Frequência da calibração › Unidade do resultado quantitativo	20 µL 15 dias 60 dias cópias/mL

Desempenhos ELITe InGenius e ELITe BeGenius

Matriz	Limite de deteção	Sensibilidade	Especificidade
Plasma EDTA	30 cópias/mL	**98,75%** *80 amostras testadas*	**100%** *100 amostras testadas*

Preparação da amostra

Este produto destina-se a ser usado no instrumento **ELITe InGenius** e **ELITe BeGenius** com amostras clínicas não celulares identificadas e manuseadas de acordo com as diretrizes laboratoriais, e colhidas, transportadas e armazenadas sob as condições seguintes:

Table 44

Amostra	Requisitos de colheita	Condições de transporte / armazenamento			
		+16 / +26 °C (temperatura ambiente)	**+2 / +8 °C**	**-20 ±10 °C**	**-70 ±15 °C**
Plasma	EDTA	≤ 24 horas	≤ 24 horas	≤ 1 mês	Não testado

Procedimentos ELITe InGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador (GUI) do software ELITe InGenius para configurar a execução. Todos os passos: extração, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

Antes da análise

1. Ligue o ELITe InGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo "**CLOSED**" (Fechado).	**2.** Verifique os calibradores: **Q-PCR Standard** no menu "Calibration" (Calibração). Verifique os controlos: **Positive Control** e **Negative Control** no menu "Controls" (Controlos). Nota: Todos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	**3.** Descongele a **PCR Mix** (ao abrigo da luz) e os tubos de **CTRCPE**. Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s. Mantenha o **RT EnzymeMix** em gelo ou bloco de refrigeração.

4. Prepare a mistura de reação completa

Número de amostras (N)	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. Submeta a vórtice suave
Centrifugue durante 5 s
Mantenha mistura de reação completa em gelo. Não exponha à luz direta.

Procedimento 1 - Execução completa: Extract + PCR (Extrair+PCR) (p. ex., amostras)

1. Selecione "Perform Run" (Executar) no ecrã tátil.	**2.** Verifique os volumes de extração: Entrada: "1000 µL", eluição: "50 µL".	**3.** Leia os códigos de barras das amostras com um leitor de códigos de barras manual ou escreva a identificação da amostra.
4. Selecione o "Assay Protocol" (Protocolo do ensaio): CMVRNA ELITe_PL_600_50	**5.** Selecione o método "Extract + PCR" (Extrair+PCR) e a posição da amostra "Extraction Tube" (Tubo de extração). ". Certifique-se de que o "Dilution factor" (Fator de diluição) é "1,7"	**6.** Carregue a mistura de reação completa no Inventory Block (Gestor do reagente).
7. Carregar: PCR cassette, Cartucho de extração, Tubo de eluição, Cassete de pontas, Racks do tubo de extração.	**8.** Feche a porta. Iniciar a execução.	**9.** Visualize, aprove e guarde os resultados.

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, standards, controlos)

1. a 4. Siga o procedimento 1 descrito acima (selecione a opção Protocolos de ensaio: CMVRNA ELITe_PC e CMVRNA ELITe_NC ou CMVRNA ELITe_STD ou CMVRNA ELITe_PL_600_50)	**5.** Selecione o método “PCR Only” (Apenas PCR) e a posição da amostra “Elution Tube” (Tubo de eluição)	**6.** Carregue a mistura de reação completa no Inventory Block (Gestor do reagente)
7. Carregar: Rack de PCR Cassette e suporte de tubos de eluição com o ácido nucleico extraído	**8.** Feche a porta. Iniciar a execução	**9.** Visualize, aprove e guarde os resultados

Procedimentos ELITe BeGenius

O utilizador é guiado passo a passo pela interface gráfica do utilizador (GUI) do software ELITe BeGenius para configurar a execução. Todos os passos: extração, PCR em tempo real e a interpretação dos resultados são realizados automaticamente. Estão disponíveis dois modos operacionais: execução completa (Extract + PCR (Extrair+PCR)) ou PCR Only (Apenas PCR).

Antes da análise

1. Ligue o ELITe BeGenius. Inicie sessão com o nome de utilizador e a palavra-passe. Selecione o modo “**CLOSED**” (Fechado).	**2.** Verifique os calibradores: **Q-PCR Standard** no menu “Calibration” (Calibração). Verifique os controlos: **Positive Control** e **Negative Control** no menu “Controls” (Controlos). Nota: todos devem ter sido executados, aprovados e não ter expirado.	**3.** Descongele a **PCR Mix** (ao abrigo da luz) e os tubos de **CTRCPE**. Submeta a vórtice suave. Centrifugue durante 5 s. Mantenha o **RT EnzymeMix** em gelo ou bloco de refrigeração.

4. Prepare a mistura de reação completa:

Número de amostras (N)	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
13 ≤ N ≤ 18	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0,3 µL
19 ≤ N ≤ 23	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0,3 µL
N = 24	580 µL	8,7 µL

5. Submeta a vórtice suave
Centrifugue durante 5 s.
Mantenha mistura de reação completa em gelo. Não exponha à luz direta.

Procedimento 1 - Execução completa: Extract + PCR (Extrair+PCR) (p. ex., amostras)

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “Extract + PCR” (Extrair +PCR)	**2.** Insira o rack de amostras com as amostras com código de barras na Cooler Unit. A leitura do código de barras já se encontra ativada	**3.** Verifique os volumes de extração: Entrada: “1000 µL”, eluato: “50 µL”
4. Selecione o “Assay Protocol” (Protocolo do ensaio): (CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50) **Nota:** Se for realizada uma segunda extração, repita os passos 2 a 4	**5.** Imprima as etiquetas para colocar um código de barras nos tubos de eluição vazios. Carregue os tubos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	**6.** Carregue a mistura de reação completa e o Internal Control no “Reagent/Elution Rack” (Rack de reagente/eluição) e insira-o na Cooler Unit
7. Carregue o “PCR Rack” (Rack de PCR) com “PCR Cassette” e o “Extraction Rack” (Rack de extração) com os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200” e os consumíveis de extração necessários	**8.** Feche a porta. Iniciar a execução	**9.** Visualize, aprove e guarde os resultados

NOTE

Se for necessário um modo Apenas extração, consulte o manual do utilizador do instrumento para obter informações sobre o procedimento.

Procedimento 2: PCR Only (Apenas PCR) (p. ex., eluatos, standards, controlos)

1. Selecione “Perform Run” (Executar) no ecrã tátil e, a seguir, clique no modo de execução “PCR Only” (Apenas PCR)	**2.** Carregue os tubos com código de barras do ácido nucleico extraído ou dos controlos no rack de eluição e insira-o na Cooler Unit	**3.** Verifique os volumes de extração: Entrada: “1000 µL”, eluato: “50 µL”
4. Selecione o “Assay protocol” (Protocolo de ensaio) de interesse (CMVRNA ELITe_Be_PC e (CMVRNA ELITe_Be_NC ou (CMVRNA ELITe_Be_STD ou (CMVRNA ELITe_Be_PL_600_50)	**5.** Carregue a mistura de reação completa no “Reagent/Elution Rack” (Rack de reagente/eluição) e insira-o na Cooler Unit	**6.** Carregue o “PCR Rack” (suporte de PCR) com a "PCR Cassette”
7. Feche a porta. Iniciar a execução	**8.** Visualize, aprove e guarde os resultados	

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