



ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITALIA

Uffici: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Sito internet: www.elitechgroup.com

NOTICE of CHANGE dated 13/01/2026

IMPORTANT COMMUNICATION FOR THE USERS OF PRODUCT:

«Respiratory Viral PLUS ELITE MGB[®] Kit» Ref. RTS160ING

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

- Replacement of 2mL tube 953-217 and white cap 953-223 with 2mL tube 953-065 related to PCR Mix component tubes.
- Update of the paragraph "Symbols" with the symbol "Consult instructions for use".
- Update of the paragraph "Notice to purchaser: limited license".

Composition and use of the product remain unchanged.

PLEASE NOTE



LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT



THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT



CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT



LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT



A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT



DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



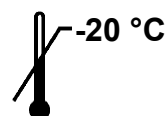
ELITechGroup S.p.A.
C.so Svizzera, 185
10149 Torino ITÁLIA

Escritórios: Tel. +39-011 976 191 Fax +39-011 936 76 11
E-mail: emd.support@elitechgroup.com
Site WEB: www.elitechgroup.com

Respiratory Viral PLUS ELITe MGB® Kit

reagentes para transcrição reversa de ARN e amplificação
em tempo real de cADN

REF RTS160ING



ÍNDICE

UTILIZAÇÃO PREVISTA	página 1
PRINCÍPIOS DO ENSAIO	página 2
DESCRIÇÃO DO PRODUTO	página 3
MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO	página 3
OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS	página 4
AVISOS E PRECAUÇÕES	página 4
AMOSTRAS E CONTROLOS	página 5
PROCEDIMENTO	página 6
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	página 13
REFERÊNCIAS	página 17
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	página 18
RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	página 19
SÍMBOLOS	página 21
NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA	página 22

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O produto «**Respiratory Viral PLUS ELITe MGB® Kit**» faz parte de um ensaio qualitativo de transcrição reversa e amplificação de ácidos nucleicos multiplex para a deteção e identificação do ARN do **Vírus Influenza A (FluA)**, **Vírus Influenza B (FluB)**, **Vírus sincicial respiratório (RSV)** e **Metapneumovírus humano (hMPV)** em amostras clínicas.

O ensaio é validado em associação com o sistema **ELITe InGenius®** e com esfregaços respiratórios e amostras de Lavagem broncoalveolar (LBA).

O produto está previsto para utilização como auxiliar no diagnóstico de infeções respiratórias, em conjunto com os dados clínicos do paciente e outros resultados de testes laboratoriais.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O ensaio consiste numa transcrição reversa multiplex e numa reação de amplificação em tempo real (método de um passo).

A partir do ARN extraído de cada amostra sujeita a teste, são realizadas diferentes reações de transcrição reversa e amplificação na Cassete PCR para amplificar os seguintes alvos:

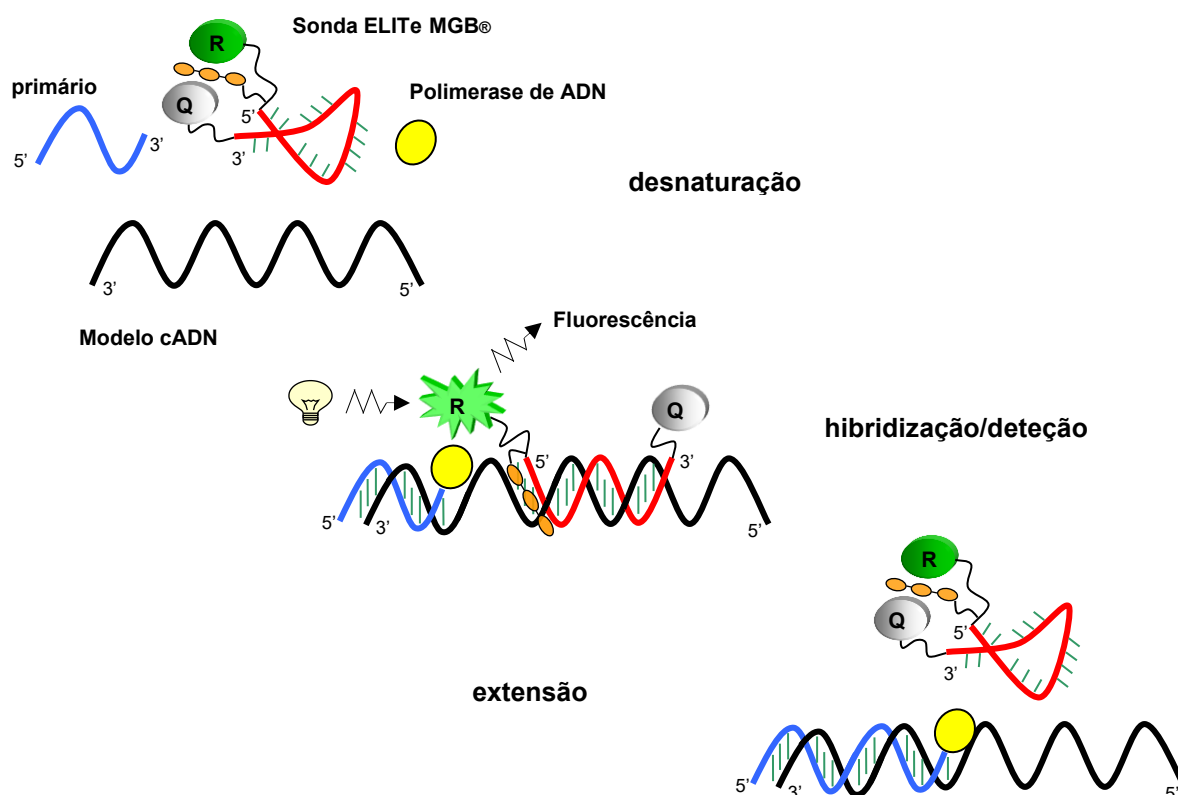
- Sequência do gene da proteína matriz de FluA, detetada pela sonda específica no Canal **FluA** (Canal 5),
- Sequência do gene da proteína matriz de FluB, detetada pela sonda específica no Canal **FluB** (Canal 1),
- Sequência do gene da proteína matriz de RSV, detetada pela sonda específica no Canal **RSV** (Canal 4),
- Sequência do gene da proteína fusão de hMPV, detetada pela sonda específica no Canal **hMPV** (Canal 6).

A mistura PCR também amplifica o Controlo Interno da extração e inibição com base numa região do ARN genómico do fago MS2 e detetado pela sonda específica no Canal **CI** (Canal 2).

As sondas com tecnologia ELITE MGB®, etiquetada com fluoróforos diferentes, são ativadas quando hibridizadas com o produto específico da reação de amplificação. A emissão de fluorescência é medida e registada pelo instrumento. No final do ciclo de amplificação, os diagramas da fluorescência são analisados para identificar os ciclos do limiar (Ct). A interpretação do resultado permite detetar a presença dos patogénicos de interesse na amostra inicial.

O ensaio foi validado com o **ELITE InGenius**, um sistema integrado e automático para extração, amplificação e deteção de ácidos nucleicos e interpretação de resultados.

Na imagem seguinte é resumidamente mostrado o mecanismo de ativação e a emissão de fluorescência da sonda da tecnologia ELITE MGB®. Tenha em atenção que a sonda não é hidrolisada durante o ciclo de amplificação.



DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» fornece os seguintes componentes:

- **Mistura RV PLUS PCR**

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

A Mistura RV PLUS PCR contém os primários e sonda específicos para:

- a sequência do gene da **proteína matriz** de FluA. A sonda **FluA** é etiquetada com fluoróforo AP639, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- a sequência do gene da **proteína matriz** de FluB. A sonda **FluB** é etiquetada com fluoróforo FAM, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- a sequência do gene da **proteína matriz** de RSV. A sonda **RSV** é etiquetada com fluoróforo AP593, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- a sequência do gene da **proteína fusão** de hMPV. A sonda **hMPV** é etiquetada com fluoróforo AP690, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,
- a sequência do ARN genómico do **fago MS2** do Controlo Interno (CI) exógeno. A sonda **CI** é etiquetada com fluoróforo AP525, estabilizada pelo grupo MGB® e extinta por uma humidade não fluorescente,

A Mistura RV PLUS PCR contém igualmente o tampão, o cloreto de magnésio, os trifosfatos nucleótidos, os estabilizadores e a enzima de polimerase de Taq ADN com ativação térmica (arranque a quente).

- **RT EnzymeMix**

Um mistura otimizada e estabilizada de enzimas para transcrição reversa, **pré-aliquotada em dois tubos de teste** (tampa com inserção PRETA). Cada tubo contém **20 µL** de solução, suficiente para **48 testes** em associação com o **ELITE InGenius**.

O produto é suficiente para **96 testes em associação com o sistema ELITE InGenius**, incluindo comandos.

MATERIAIS FORNECIDOS NO PRODUTO

Componente	Descrição	Quantidade	Classificação dos perigos
RV PLUS PCR Mix	mistura de reagentes para transcrição reversa e amplificação em tempo real tampa NATURAL	4 x 600 µL	-
RT EnzymeMix	Transcriptase reversa tampa com inserção PRETA	2 x 20 µL	-

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS NO PRODUTO

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

OUTROS PRODUTOS NECESSÁRIOS

Os reagentes para extração do ARN das amostras a serem analisadas, o Controlo Interno da extração e inibição, o controlo positivo de amplificação e os consumíveis **não** estão incluídos neste produto.

Para a extração de ARN automática, a transcrição reversa, a amplificação em tempo real e a interpretação dos resultados, no instrumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e os seguintes Protocolos de ensaio específicos (ELITechGroup S.p.A.) são necessários:

- parâmetros para amplificação de controlo positivo «**RV PLUS ELITE_PC**»,
- parâmetros para amplificação de controlo negativo «**RV PLUS ELITE_NC**»,
- parâmetros para amostras de esfregaço respiratório a ser analisado «**RV PLUS ELITE_RsS_200_100**»,
- parâmetros para amostras de LBA a ser analisado «**RV PLUS ELITE_BAL_200_100**».

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

- cartuchos de extração «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- consumíveis para extração «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- cassetes de amplificação «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- pontas «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, ref. TF-350-L-R-S),
- caixas «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Como modelo do Controlo Interno de extração e inibição, é necessário o produto genérico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE). Esta é uma solução estabilizada contendo ADNs plasmídeos e ARN genómico em fago.

Como modelo do Controlo positivo da amplificação, é necessário o produto específico «**Respiratory Viral PLUS - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTR160ING). Esta é uma solução estabilizada contendo ADNs plasmídeos.

Como dispositivo de recolha de amostras de esfregaços respiratórios, é necessário o produto genérico «**UTM® Kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 360C ou 305C) ou um dispositivo equivalente.

AVISOS E PRECAUÇÕES

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

Avisos e precauções gerais

Manuseie e elimine todas as amostras biológicas como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com as amostras biológicas. Evite salpicos ou vaporizações. Os materiais que entrarem em contacto com as amostras biológicas devem ser tratados durante, pelo menos, 30 minutos com 3% de hipoclorito de sódio 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 capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite o contacto direto com os reagentes. Evite salpicos ou vaporizações. Os desperdícios devem ser manuseados e eliminados em conformidade com as normas de segurança adequadas. Os materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Os desperdícios líquidos que contenham ácidos ou devem ser neutralizados antes da eliminação.

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

Nunca deve pipetar soluções com a boca.

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

Lave cuidadosamente as mãos após manusear amostras e reagentes.

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

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

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

Não use o produto após a data de validade indicada.

Use apenas os reagentes fornecidos com o produto e os recomendados pelos fabricantes.

Não use reagentes de lotes diferentes.

Não use reagentes de outros fabricantes.

Avisos e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular requerem colaboradores qualificados e com formação, para evitar o risco de resultados incorretos, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou à contaminação da amostra por produtos de amplificação.

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

É necessário ter disponíveis áreas separadas para o teste de biologia molecular e o teste de cultura microbiológica. Nunca manuseie a cultura líquida ou sólida na área designada para as reações de extração/amplificação.

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

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

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

Avisos e precauções específicos para os componentes

A **RV PLUS PCR Mix** deve ser guardada a -20 °C num local escuro.

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

RT EnzymeMix

A **RT EnzymeMix** deve ser guardada a -20 °C.

A **RT EnzymeMix** não deve ser exposta a temperaturas superiores a -20 °C durante mais de 10 minutos. Pode ser congelada e descongelada para um máximo de **dez sessões**: quaisquer ciclos de congelação/descongelação adicionais podem causar um menor desempenho do produto.

AMOSTRAS E CONTROLOS

Amostras

O produto deve ser utilizado com as seguintes amostras clínicas:

Esfregaço respiratório

As amostras de esfregaço respiratório para extração de ácido nucleico devem ser recolhidas num meio UTM de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (+18/+25 °C) durante o máximo de 24 horas ou a +2/+8 °C durante um máximo de cinco dias; caso contrário, deverão ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um máximo de um mês ou a -70 °C para períodos mais longos. Os 200 µL do meio devem ser transferidos para o Tubo de sonicação fornecido no «Conjunto de consumíveis ELITE InGenius SP 200».

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

Nota: A utilização da pipeta em amostras do tubo principal do esfregaço para o Tubo de sonicação pode **gerar contaminação**. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção “Advertências e precauções”.

Nota: Para realizar a extração de ARN do esfregaço respiratório pelo sistema ELITE InGenius e o software ELITE InGenius versão 1.3 (ou versões mais recentes), use o Protocolo do ensaio **RV PLUS ELITE_RsS_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE** (Controlo interno) a 10 µL por extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Lavagem broncoalveolar (BAL)

As amostras de lavagem broncoalveolar (LBA) devem ser recolhidas numa solução fisiológica esterilizada ou PBS esterilizado de acordo com as diretrizes laboratoriais, transportadas e armazenadas à temperatura ambiente (+18/+25 °C) durante um máximo de 24 horas ou a +2/+8 °C durante um máximo de cinco dias; caso contrário, deverão ser congeladas e guardadas a -20 °C durante um máximo de um mês ou a -70 °C para períodos mais longos. Os 200 µL do meio devem ser transferidos para o Tubo de sonicação fornecido no «Conjunto de consumíveis ELITE InGenius SP 200».

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

Nota: A utilização da pipeta em amostras do tubo principal do esfregaço para o tubo de extração pode **gerar contaminação**. Utilize as pipetas adequadas e siga todas as recomendações reportadas na secção “Advertências e precauções”.

Nota: Para realizar a extração de ARN da LBA pelo sistema **ELITE InGenius** e o software **ELITE InGenius** versão 1.3 (ou versões mais recentes), use o Protocolo do ensaio **RV PLUS ELITE_BAL_200_100**. Este protocolo processa 200 µL da amostra, adiciona o **CPE** (Controlo interno) a 10 µL por extração e elui os ácidos nucleicos em 100 µL.

Substâncias interferentes

As quantidades de ADN e/ou ARN genómico humano superior a 1 µg por reação podem inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação em tempo real.

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

Controlos de amplificação

Antes da análise de qualquer amostra, é absolutamente obrigatório criar e aprovar os controlos de amplificação para o lote do reagente de amplificação que será usado nos testes:

- como Controlo positivo da amplificação, use o reagente **Respiratory Viral PLUS – ELITE Positive Control** (não fornecido com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio **RV PLUS ELITE_PC**,
- como Controlo negativo da amplificação, use água de qualidade para biologia molecular (não fornecida com este kit) em associação com o Protocolo do ensaio **RV PLUS ELITE_NC**.

Nota: O sistema **ELITE InGenius** requer resultados aprovados e válidos dos controlos da amplificação para cada lote de reagente de amplificação guardado na respetiva base de dados.

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

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

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

Controlos da qualidade

É recomendada a validação planeada do procedimento de extração e amplificação. Podem ser usadas amostras testadas ou material de referência certificado.

PROCEDIMENTO

O procedimento para utilização do **Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit** com o sistema **ELITE InGenius** consiste em três passos:

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

Verificação da prontidão do sistema

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

- ligar o instrumento **ELITE InGenius** e selecionar o modo de início de sessão “**CLOSED**” (Fechado),
- verificar que os controlos da amplificação (Controlos, Controlo positivo RV PLUS, Controlo negativo RV PLUS) foram executados em associação com o lote do reagente de amplificação a ser usado e que os resultados são aprovados e válidos (Estado). Se não existirem resultados de controlo da amplificação aprovados ou válidos, crie os mesmos como descrito nos parágrafos seguintes,
- escolha o tipo de execução, seguindo as instruções na Interface Gráfica do Utilizador (GUI) para a preparação da sessão e utilizando os Protocolos de ensaio fornecidos pela ELITechGroup S.p.A. Estes protocolos IVD foram especificamente validados com os kits ELITE MGB®, o instrumento **ELITE InGenius** e a matriz citada.

Os Protocolos de ensaio disponíveis para teste da amostra com o produto «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» estão descritos na tabela seguinte:

Protocolo de ensaio para o Respiratory Viral ELITE MGB® Kit			
Nome	Matriz	Relatório	Características
RV PLUS ELITE_RsS_200_100	Esfregaço respiratório	Positivo/ Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 10 µL
RV PLUS ELITE_BAL_200_100	BAL	Positivo/ Negativo	Volume de entrada da extração: 200 µL Volume de eluição da extração: 100 µL Controlo interno: 10 µL Sonicação: NÃO Fator de diluição: 1 Volume de mistura PCR: 20 µL Volume de entrada PCR de amostra: 10 µL

Se o Protocolo de ensaio de interesse não estiver carregado no sistema, contacte o serviço de Apoio ao cliente ELITechGroup na sua localidade.

Preparação da sessão

O produto **Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit** pode ser usado com o sistema **ELITE InGenius** para realizar:

- Execução integrada (Extração + PCR),
- Execução de amplificação (apenas PCR),
- Execução de amplificação para Controlo positivo e Controlo negativo (apenas PCR),

Todos os parâmetros necessários para a sessão estão incluídos no Protocolo de ensaio disponível no instrumento e são automaticamente recuperados quando o Protocolo de ensaio é selecionado.

Nota: O sistema **ELITE InGenius** pode ser ligado ao “Location Information Server” (Servidor de informação da localização - LIS) através do qual é possível carregar a informação da sessão de trabalho. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

- Se necessário, descongele à temperatura ambiente (+18/ 25 °C) os tubos de teste que contêm as amostras a serem analisadas. Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos, centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha em gelo,
- Descongele durante 30 minutos à temperatura ambiente (+18/25 °C) os tubos de teste **RV PLUS PCR Mix** (tampa BRANCA) necessários para a sessão, lembrando-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente **24 testes**. Misture por meio de vórtice a baixa velocidade durante 10 segundos três vezes e centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha num bloco frio,
- Remova os tubos **RT EnzymeMix** (tampa PRETA) necessários para a sessão, lembrando-se que o conteúdo de cada tubo de teste é suficiente para preparar **48 testes**. Agite suavemente os tubos, centrifugue durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e mantenha num bloco frio,

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

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

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

Número de amostras (N)	Mistura RV PLUS PCR	RT EnzymeMix
$1 \leq N \leq 5$	$(N + 1) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 1) \times 0,3 \mu\text{L}$
$6 \leq N \leq 12$	$(N + 2) \times 20 \mu\text{L}$	$(N + 2) \times 0,3 \mu\text{L}$

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

Nota: A mistura de reação completa deve ser preparada no momento para cada sessão de trabalho e **não pode** ser reutilizada nem armazenada.

Estão descritos a seguir os passos principais para a preparação dos três tipos de execução.

A. Execução integrada

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

1. Descongele os tubos CPE para a sessão. Cada tubo é suficiente para 12 extrações. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Selecione “Realizar execução” a partir do ecrã “Início”.
3. Certifique-se de que o “Volume de entrada de extração” é de 200 μL e que o Volume de eluição extraído é de 100 μL .
4. Para cada Rastreio de interesse preencha a “ID da amostra” (SID) digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
5. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Ensaio” (por ex., RV PLUS ELITe_RsS_200_100).
6. Certifique-se de que o “Protocolo” apresentado é: “Extração + PCR”.
7. Selecione a posição de carregamento da amostra “Tubo de sonicação” na coluna “Posição da amostra”. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
8. Carregue a CPE e a **mistura de reação completa** no “Bloco de inventário” selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique no botão “Seguinte” para continuar a preparação.
9. Carregue e verifique os Suportes de pontas na “Área de inventário” selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique no botão “Seguinte” para continuar a preparação.
10. Carregue as “Cassetes PCR”, os cartuchos de extração “ELITe InGenius SP 200”, todos os consumíveis necessários e as amostras a serem extraídas nas posições especificadas no passo 7, seguindo as instruções na GUI. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
11. Feche a porta do instrumento.
12. Pressione “Iniciar” para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITe InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

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

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

Nota: No final da execução, a mistura de reação completa **não pode** ser reutilizada nem armazenada.

B. Execução de amplificação

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

1. Selecione “Realizar execução” a partir do ecrã “Início”.
2. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o “Volume de entrada de extração” é de 200 µL e que o “Volume de eluição extraído” é de 100 µL.
3. Para cada Rastreio de interesse preencha a SID digitando ou digitalizando o código de barras da amostra.
4. Selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Ensaio” (por ex., RV PLUS ELITE_RsS_200_100).
5. Selecione “Apenas PCR” na coluna “Protocolo”.
6. Certifique-se de que a posição de carregamento da amostra na coluna “Posição da amostra” é “Tubo de eluição (fila inferior)”. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
7. Carregue a **mistura de reação completa** no “Bloco de inventário” selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
8. Carregue e verifique os Suportes de pontas na “Área de inventário” selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
9. Carregue as “Cassetes PCR” e as amostras de Ácido nucleico extraídas seguindo as instruções na GUI. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
10. Feche a porta do instrumento.
11. Pressione “Iniciar” para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução a restante amostra extraída no “Tubo de eluição” deve ser removida do instrumento, tapada e guardada a -20 °C durante um mês. Evite derramar a Amostra extraída.

Nota: No final da execução as Cassetes PCR com os produtos de reação e os consumíveis devem ser removidas do instrumento e eliminadas sem contaminações ambientais. Evite quaisquer derrames dos produtos de reação.

Nota: No final da execução, a mistura de reação completa **não pode** ser reutilizada nem armazenada.

C. Execução de amplificação para Controlo positivo e Controlo negativo

Para preparar a execução de amplificação para o Controlo positivo e Controlo negativo, realize os passos seguintes em conformidade com a GUI:

1. Descongele o tubo de **Controlo positivo RV PLUS** para a sessão. Cada tubo é suficiente para 4 sessões. Misture suavemente, centrifugue o conteúdo durante 5 segundos.
2. Transfira pelo menos 50 µL de água de qualidade para biologia molecular para um “Tubo de eluição”, fornecido com o Conjunto de consumíveis ELITE InGenius SP 200.
3. Selecione “Realizar execução” a partir do ecrã “Início”.
4. No Rastreo de interesse, selecione o Protocolo de ensaio a ser usado na coluna “Ensaio”.
5. Mesmo que não seja efetuada qualquer extração, certifique-se de que o “Volume de entrada de extração” é de 200 µL e que o “Volume de eluição extraído” é de 100 µL.
6. Para o controlo positivo, selecione “RV PLUS ELITE_PC” na coluna “Ensaio” e preencha o número do lote e a data de validade do **Controlo positivo RV PLUS**,
7. Para o controlo negativo, selecione “RV PLUS ELITE_NC” e preencha o número do lote e a data de validade da água de qualidade para biologia molecular.
8. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
9. Carregue a **mistura de reação completa** no “Bloco de inventário” selecionado seguindo as instruções na GUI. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
10. Carregue/verifique os Suportes de pontas na “Área de inventário” selecionada seguindo as instruções na GUI. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
11. Carregue as “Cassetes PCR”, o tubo **Controlo positivo RV PLUS** e o tubo de controlo negativo seguindo as instruções na GUI. Clique em “Seguinte” para continuar a preparação.
12. Feche a porta do instrumento.
13. Pressione “Iniciar” para iniciar a execução.

Após a conclusão do processo, o sistema **ELITE InGenius** permite aos utilizadores ver, aprovar, guardar os resultados e imprimir e guardar o relatório.

Nota: No final da execução o restante Controlo positivo deve ser removido do instrumento, tapado, identificado e guardado a -20 °C. Evite derramar a amostra extraída. O restante Controlo negativo deve ser eliminado.

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

Nota: No final da execução, a mistura de reação completa **não pode** ser reutilizada nem armazenada.

Revisão e aprovação de resultados

No final da execução, é automaticamente apresentado o ecrã “Exibição dos resultados”. Neste ecrã são mostrados os resultados da amostra/Controlo e a informação relativa à execução. A partir deste ecrã é possível aprovar o resultado, imprimir ou guardar os relatórios (“Relatório da amostra” ou “Relatório do rastreio”). Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

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

O sistema **ELITE InGenius** gera os resultados com o produto **Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit** através do seguinte procedimento:

- A. Validação dos resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação,
- B. Validação dos resultados da amostra,
- C. Elaboração do relatório do resultado da amostra.

A. Validação dos resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes patogénicos (canais **FluA**, **FluB**, **RSV** e **hMPV**) na reação de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolo de ensaio “RV PLUS ELITE_PC” e “RV PLUS ELITE_NC”.

Os resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação usado, são registados na base de dados (Controlos). Podem ser visualizados e aprovados por pessoal qualificado como o “Administrador” ou “Analista”, seguindo as instruções na GUI.

Os resultados do Controlo positivo e Controlo negativo da amplificação, específicos para o lote de reagente de amplificação, irão expirar **após 15 dias**.

Os resultados das execuções de amplificação de Controlo positivo e Controlo negativo são usados pelo software do instrumento para preparar os “Gráficos de controlo” para monitorizar os desempenhos do passo de amplificação. Consulte o manual de utilizador do instrumento para obter mais informações.

Nota: Se o resultado do Controlo positivo ou Controlo negativo da amplificação não cumprir os critérios de aceitação, é mostrada a mensagem “Falhou” no ecrã “Controlos” e não é possível aprovar o mesmo. Neste caso, foi repetida a reação do Controlo positivo ou Controlo negativo da amplificação.

Nota: Se o Controlo positivo ou o Controlo negativo for executado em conjunto com amostras a serem testadas e o respetivo resultado for inválido, toda a sessão é inválida. Neste caso, também deve ser repetida a amplificação de todas as amostras.

B. Validação dos resultados da amostra

Os sinais de fluorescência emitidos pelas sondas dos genes patogénicos (canais **FluA**, **FluB**, **RSV** e **hMPV**) e pela sonda do Controlo Interno (canal **CI**) nas reações de amplificação da amostra são analisados automaticamente e interpretados pelo software do instrumento com os parâmetros incluídos nos Protocolos de ensaio RV PLUS ELITE_RsS_200_100 e RV PLUS ELITE_BAL_200_100.

Os resultados são mostrados nos relatórios gerados pelo instrumento (“Exibição dos resultados”).

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

1) Controlo positivo	Estado
RV PLUS Positive Control	APROVADO
2) Controlo negativo	Estado
RV PLUS Negative Control	APROVADO

Para cada amostra, o resultado do ensaio é automaticamente interpretado pelo sistema como estabelecido pelo algoritmo do **software ELITE InGenius®** e os parâmetros do 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.

Resultado da execução da amostra	Interpretação
FluA:ARN detetado.	O ARN de FluA foi detetado na amostra.
FluB:ARN detetado.	O ARN de FluB foi detetado na amostra.
RSV:ARN detetado.	O ARN de RSV foi detetado na amostra.
hMPV:ARN detetado.	O ARN de hMPV foi detetado na amostra.
FluA:ARN não detetado ou inferior ao LoD.	O ARN de FluA não foi detetado na amostra. A amostra é negativa para este patogénico ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
FluB:ARN não detetado ou inferior ao LoD.	O ARN de FluB não foi detetado na amostra. A amostra é negativa para este patogénico ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
RSV:ARN não detetado ou inferior ao LoD.	O ARN de RSV não foi detetado na amostra. A amostra é negativa para este patogénico ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
hMPV:ARN não detetado ou inferior ao LoD.	O ARN de hMPV não foi detetado na amostra. A amostra é negativa para este patogénico ou a sua concentração está abaixo do Limite de deteção do ensaio.
Inválido-Voltar a testar a amostra.	Resultado do ensaio inválido causado por falha do Controlo Interno devido a extração incorreta, transferência de inibidores. O teste deve ser repetido.

As amostras reportadas como “Inválido-Voltar a testar a amostra” pelo **software ELITE InGenius** não são adequadas para interpretação dos resultados. Neste caso, o ARN do Controlo Interno não foi detetado eficientemente devido a problemas no passo de amplificação ou extração (degradação do ARN, perda de ARN durante a extração ou transferência de inibidores na eluição), que pode causar resultados incorretos.

Quando o volume da eluição é suficiente, a amostra extraída pode ser novamente testada através de uma execução da amplificação no modo “Apenas PCR”. No caso de um segundo resultado inválido, a amostra deve ser novamente testada começando a partir da extração de uma nova alíquota utilizando o modo “Extração + PCR”.

Amostras reportadas como “FluA:ARN não detetado ou inferior ao LoD”, “FluB:ARN não detetado ou inferior ao LoD”, “RSV:ARN não detetado ou inferior ao LoD” e “hMPV:ARN não detetado ou inferior ao LoD” são adequadas para análise mas não foi possível detetar os ARN alvo. Neste caso não pode excluir-se que os ARN alvo estão presentes a uma concentração abaixo do limite de deteção do ensaio (ver “Características de desempenho”).

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

Os resultados da execução da amostra são guardados na base de dados e, se válidos, podem ser aprovados (Exibição dos resultados) por pessoal qualificado como “Administrador” ou “Analista”, seguindo as instruções na GUI. A partir da janela “Exibição dos resultados” é possível imprimir e guardar os resultados da execução da amostra como “Relatório da amostra” e “Relatório do rastreio”.

C. Exportação do resultado da amostra

Os resultados da amostra são guardados na base de dados e podem ser exportados como “Relatório da amostra” e “Relatório do rastreio”.

O “Relatório da amostra” apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho ordenada pela amostra selecionada (SID).

O “Relatório do rastreio” apresenta os detalhes de uma sessão de trabalho pelo Rastreio selecionado.

O “Relatório da amostra” e o “Relatório do rastreio” podem ser impressos e assinados por pessoal autorizado.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade analítica: Limite de detecção (LoD)

O Limite de detecção (LoD) do Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit foi definido em associação com os esfregaços respiratórios no UTM, a lavagem broncoalveolar (LBA) e o sistema ELITE InGenius.

O LoD foi definido através do teste a um painel de amostras de esfregaço respiratório recolhidas no UTM (COPAN Italia S.p.A.) reforçado pelo material de referência de Vírus Influenza A (FluA), Vírus Influenza B (FluB), Vírus sincicial respiratório (RSV) e Metapneumovírus humano (hMPV) (Qnostics e Vircell) a um título conhecido. Foram preparados seis níveis de diluição a partir de uma concentração superior ao valor LoD esperado. Cada nível de diluição foi processado em 12 réplicas no sistema ELITE InGenius no modo “Extração + PCR”. O LoD foi calculado por análise de regressão Probit dos dados com a concentração a corresponder a 95% de probabilidade de um resultado positivo.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Limite de detecção (cópias/mL) para amostras de esfregaço respiratório e o ELITE InGenius			
Alvo	LoD	intervalo de 95% de confiança	
		Limite inferior	Limite superior
FluA	433	318	837
FluB	409	317	725
RSV	359	267	688
hMPV	333	288	496

O valor do LoD calculado foi verificado através de testes a 20 réplicas de esfregaços respiratórios e de amostras de LBA reforçadas com materiais de referência FluA, FluB, RSV e hMPV (Qnostics e Vircell) nas concentrações apresentadas. Os resultados obtidos suportam as concentrações apresentadas para FluA, FluB, RSV e hMPV para as amostras de esfregaço respiratório. Para as amostras de LBA, o LoD foi confirmado para FluB, RSV e hMPV, para FluA foi verificado a 500 cópias/mL.

Eficiência da detecção (inclusividade)

A eficiência de detecção de diferentes estirpes ou isolados de FluA, FluB, RSV e hMPV do produto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit foi avaliada por meio da análise in silico de sequências disponíveis na base de dados de nucleótidos EBI ENA. As regiões escolhidas para a hibridização dos primários e as sondas fluorescentes foram verificadas no alinhamento das sequências para o gene da matriz (FluA, FluB e RSV) e o gene da nucleoproteína (hMPV). As regiões de hibridização mostraram conservação da sequência e a ausência de mutações significativas, pelo que é de esperar uma amplificação eficiente de todos os organismos analisados.

A eficiência de detecção de diferentes estirpes ou isolados de FluA, FluB, RSV e hMPV também foi avaliada através da análise de um painel de materiais certificados a uma baixa concentração (cerca de 100 cópias/reação).

Amostras de ARN genómico certificado de ATCC (EUA) e Zeptomatrix (EUA), foram diluídas e analisadas em triplicado em associação com o sistema ELITE InGenius no modo “Apenas PCR”.

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Inclusividade				
Amostras	Fornecedor	Pos./Rep.	Ct média	Resultado
FluA H1N1	ATCC	3/3	33,65	Positivo
FluA H3N2	ATCC	3/3	33,49	Positivo
FluA H1N1 (2009)	Zeptomatrix	3/3	30,78	Positivo
FluB Florida (Yamagata)	ATCC	3/3	35,92	Positivo
FluB Wisconsin (Yamagata)	ATCC	3/3	36,22	Positivo
FluB Victoria	Qnostics	3/3	31,07	Positivo
RSVA2	ATCC	3/3	35,84	Positivo
RSVA	Vircell	3/3	36,12	Positivo
RSVB	Vircell	3/3	31,12	Positivo
hMPVA	Zeptomatrix	3/3	33,39	Positivo
hMPVB	Zeptomatrix	3/3	32,46	Positivo

Todas as amostras testadas foram detetadas como positivas para o patogénico correto pelo Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit.

Marcadores potencialmente interferentes (reatividade cruzada)

A potencial reatividade cruzada com outros organismos não pretendidos do ensaio foi avaliada pela comparação *in silico* das sequências disponíveis nas bases de dados de nucleótidos.

As regiões escolhidas para a hibridização dos primários e as sondas fluorescentes foram verificadas no alinhamento das sequências de outros organismos. A análise das regiões de hibridização revelou a ausência de homologias significativas e não indicou uma potencial reatividade cruzada.

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

As amostras de ADN ou ARN genómico de diferentes marcadores potencialmente interferentes (ATCC, ZeptoMetrix) foram analisadas em três réplicas em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "Apenas PCR". Aos ADN e ARN de cada organismo foram adicionados 500 ng por reação de ADN genómico humano (Promega) para imitar a amostra clínica extraída.

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Marcadores potencialmente interferentes: reatividade cruzada		
Organismos	Estirpe	Resultado
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC, 118	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Candida albicans</i>	ATCC, 3147	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC, Rosenbach	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Escherichia coli</i>	ATCC, H10407	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Bordetella pertussis</i>	Tohama I	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Bordetella parapertussis</i>	12822	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC, Rd	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC, R6	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC, Philadelphia-1	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC, FH	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ATCC, AR-39	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	isolado clínico	Negativo, sem reatividade cruzada
CMV	ATCC, AD-169	Negativo, sem reatividade cruzada
Echovírus 4	ATCC, Pesascek	Negativo, sem reatividade cruzada
ADV	ATCC, Adenoid 6	Negativo, sem reatividade cruzada
<i>P. jirovecii</i>	isolado clínico	Negativo, sem reatividade cruzada
Coronavírus SARS	Zeptomatrix	Negativo, sem reatividade cruzada
Coronavírus OC43	Zeptomatrix, OC43	Negativo, sem reatividade cruzada
Coronavírus E229	Zeptomatrix, E229	Negativo, sem reatividade cruzada
SARS-CoV-2	Zeptomatrix	Negativo, sem reatividade cruzada
Rinovírus 1A	Zeptomatrix, 1A	Negativo, sem reatividade cruzada
Vírus Parainfluenza 1	Zeptomatrix, Tipo 1	Negativo, sem reatividade cruzada
Vírus Parainfluenza 2	Zeptomatrix, Tipo 2	Negativo, sem reatividade cruzada
Vírus Parainfluenza 3	Zeptomatrix, Tipo 3	Negativo, sem reatividade cruzada
Coxsackievírus A9	ATCC, A9	Negativo, sem reatividade cruzada

Todas as amostras testadas foram detetadas como positivas para o patogénico correto pelo Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit.

Marcadores potencialmente interferentes (interferência)

A ausência de inibição devido a outros organismos não pretendidos encontrados em amostras respiratórias também foi verificada através de testes a um painel de ADN e ARN genómico certificado do ATCC.

As amostras de ADN e ARM genómico a uma elevada concentração foram reforçadas pelo ADN genómico de FluA, FluB, RSV, hMPV a uma baixa concentração (cerca de 100 cópias por reação) e analisadas em triplicado para cada marcador potencialmente interferente em associação com o sistema ELITE InGenius no modo "Apenas PCR".

Os resultados finais são comunicados na tabela seguinte.

Marcadores potencialmente interferentes: interferência		
Organismos	Estirpe	Resultado
Coronavírus SARS	Zeptomatrix	Positivo, sem inibição
Coronavírus OC43	Zeptomatrix, OC43	Positivo, sem inibição
Coronavírus E229	Zeptomatrix, E229	Positivo, sem inibição
SARS-Cov-2	Zeptomatrix, USA-WA1/2020	Positivo, sem inibição
Rinovírus 1A	Zeptomatrix, 1A	Positivo, sem inibição
Vírus Parainfluenza 1	Zeptomatrix, Tipo 1	Positivo, sem inibição
Vírus Parainfluenza 2	Zeptomatrix, Tipo 2	Positivo, sem inibição
Vírus Parainfluenza 3	Zeptomatrix, Tipo 3	Positivo, sem inibição
Coxsackievírus A9	ATCC, A9	Positivo, sem inibição

Todos os patogénicos de interesse foram corretamente detetados na presença dos organismos potencialmente interferentes listados acima quando testados pelo Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit.

Substâncias interferentes

Um painel de substâncias potencialmente interferentes às respetivas concentrações relevantes mais elevadas foi testado com o produto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit. As substâncias testadas foram Mucina, Sangue completo humano, o antibiótico Azithromycin, o corticosteroide Beclometasone, o anti-histamínico Ebastine e o mucolítico Hidroclorato de Ambroxol.

As substâncias foram adicionadas individualmente às amostras de esfregaço respiratório reforçadas pelos materiais de referência de FluA, FluB, RSV e hMPV a uma concentração de 3x LoD. As amostras foram processadas em 3 réplicas no sistema ELITE InGenius® no modo "Extração + PCR".

Os resultados são comunicados na tabela seguinte.

Teste de substâncias interferentes, %CV para os alvos						
Substância	Concentração	Pos./Rep.	FluA	FluB	RSV	hMPV
Sangue completo	10% v/v	3/3	2,56	1,92	1,14	3,88
Mucina	1% w/v (10 mg/mL)	3/3	3,94	0,83	0,76	1,17
Azitromicina	0,2 µg/mL	3/3	2,93	1,29	2,17	1,31
Ambroxol	0,6 µg/mL	3/3	2,01	0,62	2,17	0,75
Beclometasone	64 ng/mL	3/3	3,85	1,36	2,22	1,46
Ebastine	0,4 µg/mL	3/3	3,96	0,89	3,20	2,92

Todas as amostras tiveram resultado positivo para o alvo de interesse, como esperado. A percentagem %CV dos valores Ct foi inferior a 4%.

Capacidade de repetição

A Capacidade de repetição dos resultados obtidos pelo produto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit em associação com o sistema ELITE InGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de esfregaço respiratório. O painel incluiu amostras reforçadas com material de referência de FluA, FluB, RSV e hMPV (Qnostics e Viracell) a uma concentração de cerca de 3x LoD.

A Capacidade de repetição foi obtida através da análise de amostras de painel em três réplicas, em duas execuções por dia, com o mesmo lote de produto. Foram usados três lotes de produtos em três dias diferentes no mesmo instrumento pelo mesmo operador. As amostras foram processadas no sistema ELITE InGenius no modo "Extração + PCR". Os valores Ct dos alvos e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a Capacidade de repetição como imprecisão.

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de repetição inter-lote					
Amostra	Pos./Rep.	Ct média	SD	%CV	% positivo
3X LoD FluA	18/18	33,22	0,59	1,79	100%
3X LoD FluB	18/18	31,98	0,51	1,60	100%
3X LoD RSV	18/18	32,84	0,60	1,84	100%
3X LoD hMPV	18/18	32,38	0,69	2,12	100%
CI	72/72	29,27	0,34	1,17	100%

No teste da Capacidade de repetição, o ensaio detetou os alvos como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 3%.

Capacidade de reprodução

A Capacidade de reprodução dos resultados obtidos pelo produto Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit em associação com o sistema ELITE InGenius foi testada através da análise de um painel de amostras de esfregaço respiratório. O painel incluiu amostras reforçadas com material de referência de FluA, FluB, RSV e hMPV (Qnostics e Vircell) a uma concentração de cerca de 3x LoD.

A Capacidade de reprodução foi obtida através da análise de amostras de painel em três réplicas, em duas execuções por dia. Foram usados três lotes diferentes do produto em três dias diferentes, em três instrumentos diferentes e por três operadores diferentes. As amostras foram processadas no sistema ELITE InGenius no modo "Extração + PCR". Os valores Ct dos alvos e do Controlo Interno foram usados para calcular a %CV para avaliar a Capacidade de reprodução como imprecisão.

É mostrado nas tabelas seguintes um resumo dos resultados.

Capacidade de reprodução					
Amostra	Pos./Rep.	Ct média	SD	%CV	% positivo
3X LoD FluA	18/18	32,49	1,06	3,26	100%
3X LoD FluB	18/18	31,64	0,56	1,76	100%
3X LoD RSV	18/18	32,11	0,31	0,95	100%
3X LoD hMPV	17/17	33,64	1,06	3,16	100%
CI	72/72	28,83	0,39	1,36	100%

No teste da Capacidade de reprodução, o ensaio detetou os alvos como esperado e mostrou uma baixa %CV dos valores Ct que não excederam 4%.

Especificidade de diagnóstico: confirmação de amostras negativas

A especificidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas negativas, foi avaliada através da análise de amostras clínicas de esfregaço respiratório recolhidas no UTM (COPAN Italia S.p.A.) e da LBA negativa certificada por um ensaio com marcação CE IVD.

As amostras foram testadas pelo ensaio em associação com o sistema ELITE InGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras	N	Positivo	Negativo	Especificidade do diagnóstico
Esfregaço respiratório negativo recolhido no UTM	41	0	41	100%
LBA negativa	40	0	40	100%

Sensibilidade de diagnóstico: confirmação de amostras positivas

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio, como confirmação de amostras clínicas positivas, foi avaliada através da análise de amostras clínicas de esfregaço respiratório recolhidas no UTM (COPAN Italia S.p.A.) e da LBA positiva certificada por um ensaio com marcação CE IVD para FluA, FluB, RSV e hMPV.

A sensibilidade de diagnóstico do ensaio foi avaliada através da análise de amostras clínicas positivas e amostras clínicas negativas reforçadas por material certificado de FluA, FluB, RSV e hMPV. As amostras reforçadas de FluA, FluB, RSV e hMPV foram reforçadas a uma concentração de 3x, 5x, 10x LoD.

As amostras foram testadas pelo ensaio em associação com o sistema ELITE InGenius.

Os resultados estão resumidos na tabela seguinte.

Amostras de esfregaço respiratório recolhidas no UTM	N	Positivo	Negativo	Sensibilidade de diagnóstico
Positivo para FluA	31	28	3	95,6%
Reforçado por FluA	59	58	1	
Positivo para FluB	30	30	0	100%
Reforçado por FluB	29	29	0	
Positivo para RSV	34	33	1	98,4%
Reforçado por RSV	30	30	0	
Positivo para hMPV	17	17	0	100%
Reforçado por hMPV	27	27	0	

Amostras de LBA	N	Positivo	Negativo	Sensibilidade de diagnóstico
Positivo para FluA	28	28	0	96,5%
Reforçado por FluA	29	27	2	
Positivo para FluB	13	12	1	97,7%
Reforçado por FluB	30	30	0	
Positivo para RSV	18	18	0	100%
Reforçado por RSV	30	30	0	
Positivo para hMPV	3	3	0	100%
Reforçado por hMPV	28	28	0	

Nota: Os dados e resultados completos dos testes realizados para avaliação das características de desempenho do produto com matriz e o instrumento estão registados no Ficheiro técnico do produto "Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit", FTP 160ING.

REFERÊNCIAS

- W. Zhang et al. (1991) *J. Virol. Methods* 33: 165 - 189
J. Stockton et al. (1998) *J. Clin. Microbiol.* 36: 2990 - 2995
E. J. Kuypers et al. (2005) *J. Clin. Virology* 33: 299 -305
E. A. Lukhtanov et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* 35: e30

LIMITAÇÕES AO PROCEDIMENTO

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

Utilize este produto apenas com amostras clínicas de esfregaço respiratório e LBA.

Presentemente, não existem dados disponíveis relativos ao desempenho do produto com as seguintes amostras clínicas: saliva, gargarejos, aspirados nasofaríngeos, sobrenadante de cultura celular.

Não use este produto com quantidade de ADN ou ARN superior a 1 µg: uma elevada quantidade de ácidos nucleicos pode inibir a transcrição reversa e as reações de amplificação e pode causar resultados inválidos.

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

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

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

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

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

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

Um resultado negativo obtido com este produto significa que o ARN alvo não foi detetado no ARN extraído da amostra. Não pode excluir-se o facto de o ARN alvo ter um título inferior ao limite de deteção do produto (ver Características de desempenho). Neste caso, o resultado podia ser um falso negativo.

No caso de co-infeções, a sensibilidade de um alvo pode ser afetada pela amplificação de um segundo alvo.

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, que pode levar a um atraso na obtenção dos resultados finais.

Possíveis polimorfismos, eliminação e inserção na região do ARN alvo abrangidos pelos primários do produto e as sondas podem prejudicar a deteção do ARN alvo.

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

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

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Reação de Controlo positivo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e do controlo positivo. Verifique os volumes da mistura de reação completa e do controlo positivo.
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 use a mistura de reação completa durante mais de uma sessão (3 horas na área de inventário). Não deixe a mistura de reação completa à temperatura ambiente durante mais de 30 minutos. Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Degradação do controlo positivo.	Utilize uma nova alíquota de controlo positivo.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Reação de Controlo negativo inválida	
Causas possíveis	Soluções
Erro na configuração do instrumento.	Verifique a posição da mistura de reação completa e do controlo negativo. Verifique os volumes da mistura de reação completa e do controlo negativo.
Contaminação da mistura de reação completa ou dos respetivos componentes.	Prepare novamente a mistura de reação completa. Utilize uma nova alíquota de componentes.
Contaminação do controlo negativo	Utilize uma nova alíquota de água de qualidade para biologia molecular.
Contaminação da área de extração, de Suportes ou do Bloco de inventário.	Limpe as superfícies com detergentes aquosos, lave as batas de laboratório, substitua os tubos de ensaio e as pontas em utilização.
Erro do instrumento.	Contacte a Assistência técnica do ELITechGroup.

Elevada taxa anómala de resultados positivos na mesma sessão (reações com valores Ct recentes semelhantes)	
Causas possíveis	Soluções
Contaminação amostra-para-amostra durante as etapas pré-analíticas	Evitar qualquer contacto entre a micropipeta e a parede do tubo. Limpar a micropipeta com uma solução de hipoclorito de sódio 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 do ELITE InGenius. 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% nova ou ADN/ARN mais limpo. Realize um ciclo de descontaminação U.V. Utilize um novo tubo da Mistura PCR.

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

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

Erro TH	
Causas possíveis	Soluções
Amostra com concentração alvo demasiado alta.	Se for observada uma amplificação significativa no traçado PCR com linha de base negativa: - repita a amplificação com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular de amostra eluída numa sessão "Apenas PCR" ou - repita a extração com uma diluição 1:10 em água de qualidade para biologia molecular da amostra principal numa sessão "Extração + PCR".

SÍMBOLOS



Número do catálogo.



Limite máximo da temperatura.



Código do lote.



Usar até (último dia do mês).



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*.



Cumprimento dos requisitos da Diretiva Europeia 98/79/CE relativa a dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*.



Contém suficiente para "N" testes.



Consulte as instruções de utilização.



Conteúdo.



Manter afastado da luz solar.



Fabricante.

NOTA PARA O ADQUIRENTE: LICENÇA LIMITADA

Este produto contém reagentes produzidos pela Life Technologies Corporation e são vendidos ao abrigo de contratos de licenciamento celebrados entre a ELITechGroup S.p.A. e respetivas sucursais e a Life Technologies Corporation. 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, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Telefone: +1(760)603- 7200. Fax: +1(760)602-6500. E-mail: outlicensing@thermofisher.com.

Os reagentes de deteção ELITe MGB® são abrangidos por um ou mais dos números de patente dos EUA 7319022, 7348146, 7541454, 7671218, 7723038, 7767834, 8163910, 8969003, 9056887, 9085800, 9169256, 9328384, 10677728, 10738346, 10890529 e números de patente EP 2689031, 2714939, 2736916, 2997161 bem como pedidos que estejam atualmente 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, apenas para diagnóstico humano. Nem o ELITechGroup S.p.A. nem os respetivos licenciantes concedem quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, para quaisquer outros fins.

ELITe MGB®, o logótipo ELITe MGB® e o ELITe InGenius® são marcas comerciais registadas do ELITechGroup na União Europeia.

UTM® é uma marca comercial registada da COPAN Italia S.p.A.



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

A. Intended use

The «**Respiratory Viral PLUS ELITE MGB® Kit**» product is part of a qualitative multiplex nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the detection and identification of the RNA of **Influenza A Virus (FluA)**, **Influenza B Virus (FluB)**, **Respiratory Syncytial Virus (RSV)** and **human Metapneumovirus (hMPV)** in clinical samples.

The assay is validated in association with ELITE InGenius® system and with Respiratory swabs and Broncho-Alveolar Lavage (BAL) samples.

The product is intended for use as an aid in the diagnosis of respiratory infections, in conjunction with the patient's clinical data and other laboratory test results.

B. Amplified sequence

Target	Gene	Fluorophore
FluA	Matrix protein gene sequence of FluA	AP639
FluB	Matrix protein gene sequence of FluB	FAM
RSV	Matrix protein gene sequence of RSV	AP593
hMPV	Fusion protein gene sequence of hMPV	AP680
IC	genomic RNA of MS2 phage	AP525

C. Validated matrix

› Respiratory Swab

› BAL

D. Kit content

RV PLUS PCR Mix	RT EnzymeMix
 X 4	 X 2
4 tubes of 600 µL 96 reactions per kit 5 freeze-thaw cycles per tube	2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles per tube
› Maximum shelf-life: 18 months › Storage temperature: - 20°C	› Maximum shelf-life: 18 months › Storage temperature: - 20°C

E. Material required not provided in the kit

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › ELITE InGenius instrument: INT030 › ELITE InGenius SP 200 extraction cartridges: INT032SP200 › ELITE InGenius PCR Cassette amplification cartridges: INT035PCR › ELITE InGenius SP 200 Consumable Set consumables for extraction: INT032CS | <ul style="list-style-type: none"> › Respiratory Viral PLUS - ELITE Positive Control: CTR170ING › CPE – Internal Control: CTCPE › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000 › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S › 2 ml tube Sarstedt: 72.694.005 › Copan UTM® kit: 360C or 305C |
|---|---|

F. ELITE InGenius protocol

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> › Sample volume 200 µL › CPE Internal Control volume 10 µL › Total eluate volume 100 µL › PCR eluate input volume 10 µL › RV PLUS PCR Mix volume 20 µL | <ul style="list-style-type: none"> › Unit of qualitative result cp/mL › Frequency of controls 15 days |
|--|---|

G. Performance

Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
Respiratory Swab	FLUA: 433 cp/mL FLUB: 409 cp/mL	98.5% 252/257*	100% 41/41*
BAL	RSV: 359 cp/mL hMPV: 333 cp/mL	98.6% 176/179*	100% 40/40*

*confirmed samples/ tested samples

H. Master Mix Preparation preparation

Reagent	1 Test	Samples N.	Total reactions
RV PLUS PCR Mix	20 µL	1 to 5	N + 1 rxn
RT Enzyme Mix	0.3 µL	6 to 12	N + 2 rxn

I. Procedures

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

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls: RV PLUS pos. and neg. controls in the "Control menu" <i>NB:</i> Both have been run, approved and not expired	3. Thaw the CoV-2 PCR Mix, RT EnzymeMix tubes and the CPE Internal Control tubes Vortex gently Spin down 5 sec
---	---	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", eluate: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest	5. Select the sample position: Extraction tube	6. Load the complete mix and the Internal Control in the inventory block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip and Extraction tube racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"	6. Load the extracted nucleic acid tubes in the Elution tubes rack
7. Load the PCR cassette rack Load the PCR Mix in the inventory block	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: Secondary tube	6. Load the Internal Control in the inventory block
7. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip cassette and Extraction tube	8. Close the door Start the run	9. Archive the eluate sample